

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**AISLAMIENTO DE *Xylella fastidiosa* DE *Citrus sinensis* (L)  
Osb. Y *Vitis vinifera* Y ESTUDIO DE SU DIVERSIDAD  
GENÉTICA EN COSTA RICA**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de  
Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para  
optar al grado de *Magister Scientiae* en Ciencias Agrícolas y Recursos  
Naturales con énfasis en Biotecnología**

**ESTELA YAMILETH AGUILAR ALVAREZ**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica**

**2007**

---

**A mis padres, Rosario y Salomón  
mi hermana, Denia y mis sobrinas, Francis y Mónica por ser mi motivo  
principal**

## Agradecimientos

---

A Dios por bendecirme todos los días con tantas oportunidades de crecimiento en todos los aspectos de mi vida, por darme fuerza, entendimiento y no dejarme nunca sola.

A mis padres, Rosario y Salomón por apoyarme siempre en mi formación profesional, darme siempre su amor y enseñarme que con humildad y esfuerzo se puede alcanzar cualquier meta.

A mi hermana, Denia y su esposo David por darme siempre sus palabras de apoyo desde la distancia, estar pendiente de mí siempre y darme esos dos bellos motivos para hacer esto.

A mi casi madre, Xiomara Luna por haberme brindado el calor de su hogar en Costa Rica, su apoyo y las miles de palabras de aliento cuando en algún momento sentí que no podía.

A mis asesoras, Carmen Rivera y Lisela Moreira, por creer en mí y haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por todos los consejos y la paciencia.

A Ligia Medina, Nivia Ríos y Laura Garita, por ser tan buenas amigas y compañeras y por estar siempre dispuestas ayudarme, apoyarme y escucharme.

A Viviana Vásquez (QDDG) por haber sido un ejemplo de vida a seguir.

A Anita, Carlos, Fanny, Guido, Jerson, Mau, Rabselle, William y Zeidy por todas las sonrisas, los abrazos, las palabras de apoyo, que hicieron más ameno y fácil el trabajo del laboratorio.

A Federico y Heydi, por todos los consejos brindados en el desarrollo de este trabajo y por su buena amistad.

A los profesores del programa de posgrado, Felipe Arauz; Jorge Morera; Manuel Celedón; Ramiro Alizaga y Víctor Jiménez; que compartieron todos sus conocimientos y en algún momento despejaron mis dudas de manera amable y paciente.

A Andrea Esquivel, por ayudarme siempre de manera amable con los trámites académicos.

A Margot Chavéz y Miguel Cocom por transmitirme mucha paz y siempre tratar de acercarme a Dios.

A Romel Gonzáles, aunque ya no estemos juntos gracias por todo el cariño y el apoyo desde la distancia.

A mis amigos de Zamorano, Leonela, Rosa Ortega, Darmir, Ernesto, Edwin, María, Carito, Ana Samayoa, Patito y Deborah por estar siempre recordandome que tenía que culminar esta tarea.

A la Dra. María Mercedes Roca y el Dr. Alfredo Rueda por permitirme venir para concluir esto y darme tantas oportunidades de crecimiento profesional y sobre todo por confiar día a día en mi trabajo.

A la Organización de Estados Americanos y su programa de becas OEA-LASPAU, por financiar mi estadía y gastos universitarios en Costa Rica.

A la Fundación Costa Rica-Estados Unidos (CRUSA) por financiar mi proyecto de tesis.

A los agricultores que nos permitieron visitar sus fincas y recolectar muestras para el desarrollo de este estudio.

A todo el personal de Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular por brindarme siempre su ayuda y apoyo desinteresado.

## Hoja de aprobación

---

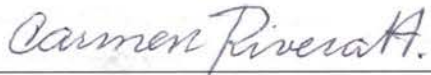
Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae* en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología.

Dr. Víctor Jiménez  
Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado




---

M.Sc. Carmen Rivera Herrero  
Directora de Tesis



---

M.Sc. Lisela Moreira Carmona  
Asesora de Tesis



---

Dr. Eric Guevara Berger  
Director del Programa de Posgrado  
En Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



---

Estela Yamileth Aguilar Alvarez  
Candidata



---

# Índice

---

Portada.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	v
Índice.....	vi
Resumen.....	ix
Índice de cuadros.....	xi
Índice de figuras.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xv
Introducción.....	1
Literatura citada.....	3
Objetivos.....	5

---

Capítulo I Revisión de literatura.....	6
I.1 <i>Xylella fastidiosa</i> : antecedentes históricos e importancia.....	7
I.2 Características del género <i>Xylella</i> .....	10
I.3 Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de la bacteria.....	12
I.4 Síntomas y patogénesis causados por <i>Xylella fastidiosa</i> .....	14
I.5 Vectores y transmisión de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	16
I.6 Detección y diagnóstico de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	17
I.7 Variabilidad genética de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	20
I.8 Clorosis variegada de los cítricos.....	22
I.9 Literatura citada.....	24

---

Capítulo II Aislamiento e identificación de <i>Xylella fastidiosa</i> a partir de árboles de <i>Citrus sinensis</i> (L) Obs. en Costa Rica.....	33
Resumen.....	34
II.1 Introducción.....	35
II.2 Materiales y métodos.....	36
II.2.A Recolección de muestras.....	36
II.2.B Diagnóstico de <i>Xylella fastidiosa</i> por DAS-ELISA.....	37
II.2.C Muestreo para aislamiento.....	38
II.2.D Aislamiento de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	38
II.2.E Crecimiento y purificación de colonias en medio sólido.....	38
II.2.F Observación de la morfología de la bacteria por microscopía electrónica de transmisión.....	39
II.2.G Extracción de ADN.....	39
II.2.H Amplificación de ADN por PCR.....	40
II.3 Resultados.....	40
II.3.A Diagnóstico <i>Xylella fastidiosa</i> en material vegetal.....	40
II.3.B Aislamiento de <i>Xylella fastidiosa</i> .....	40

II.3.C Crecimiento y purificación de colonias en medio sólido.....	42
II.3.D Microscopia electrónica de transmisión.....	44
II.3.E Extracción de ADN y análisis por PCR.....	44
II.4 Discusión.....	45
II.5 Literatura citada.....	50

---

<b>Capítulo III Confirmation of <i>Xylella fastidiosa</i> infecting grapevine (<i>Vitis vinifera</i>) in Costa Rica.....</b>	<b>53</b>
Abstract.....	54
III.1 Introduction.....	55
III.2 Materials and methods.....	56
III.2.A Collection of plant samples and tests of DAS-ELISA.....	56
III.2.B Bacterium isolation.....	57
III.2.C Colonies morphology and biochemical characteristics.....	57
III.2.D Bacterium morphology by transmission electron microscopy (TEM) .....	57
III.2.E DNA extraction and PCR.....	58
III.3 Results.....	58
III.3.A DAS-ELISA of collected plant samples.....	58
III.3.B Bacteria isolation and purification.....	59
III.3.C Morphological and biochemical characterization of colonies	59
III.3.D DNA extraction and amplification by PCR.....	60
III.4 Discussion.....	61
III.5 Literature cited.....	64

---

<b>Capítulo IV Variabilidad genética de aislamientos de <i>Xylella fastidiosa</i> obtenidos de vid, cítricos y café de Costa Rica.....</b>	<b>67</b>
Resumen.....	68
IV.1 Introducción.....	69
IV.2 Materiales y métodos.....	71
IV.2.A Aislamientos utilizados	71
IV.2.B Extracción de ADN y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN con los imprimadores 272-1int/272-2int y JB-1/JB-2.....	71
IV.2.C Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	72
IV.2.D Análisis de los datos generados por RFLPs.....	72
IV.2.E Secuenciación de productos de amplificación.....	73
IV.2.F PCR-RAPDs.....	73
IV.2.G Análisis de datos generados por PCR-RAPDs.....	73
IV.3 Resultados.....	76
IV.3.A Extracción de ADN y amplificación por PCR del ADN con los imprimadores 272-1 int/272-2 int y JB-1/JB-2.....	76
IV.3.B Digestión con enzimas de restricción.....	76
IV.3.C Análisis de datos generados por RFLPs.....	79

IV.3.D Secuenciación de productos de amplificación.....	81
IV.3.F PCR-RAPDs.....	82
IV.3.G Análisis de datos generados por PCR-RAPDs.....	87
IV.4 Discusión.....	90
IV.5 Literatura citada.....	95
<hr/>	
<b>Capítulo V Discusión general.....</b>	<b>100</b>
Literatura citada.....	108
<hr/>	
<b>Conclusiones y Recomendaciones.....</b>	<b>111</b>



## Resumen

---

*Xylella fastidiosa* es una bacteria patógena de plantas que causa enfermedades en diferentes cultivos de importancia económica. En 1987, en Brasil, se describió la clorosis variegada de los cítricos (CVC), una de las enfermedades más importantes causada por *X. fastidiosa* que afecta árboles de naranja dulce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], y provoca pérdidas económicas millonarias. En Costa Rica, en el año 2002, síntomas similares a los causados por CVC fueron observados en árboles de naranja dulce usados como sombra en plantaciones de café y como cercas que delimitan linderos. Un total de 35 de estos árboles de cítricos y 24 de vid, procedentes de ocho y 3 diferentes distritos respectivamente se evaluaron por “double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay” (DAS-ELISA) resultando 21 de cítricos y 19 de vid positivos. A partir de cuatro de estos árboles de cítricos y seis de vid, se obtuvieron seis aislados y siete aislados respectivamente en medio sólido, cuyas características morfológicas y bioquímicas coincidieron con las informadas en la literatura como propias de *X. fastidiosa*. La identidad de estos aislados se comprobó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los imprimadores 272-1/272-2int y RST31/RST33. Únicamente a partir de tres aislados de Grecia (provincia de Alajuela) se logró amplificar una banda de 500pb al utilizar los imprimadores 272-2int/CVC-1 que son específicos para cepas de *X. fastidiosa* que causan CVC. La variabilidad genética de estos aislados entre sí y en comparación con aislados de café de Costa Rica, vid de Estados Unidos y cítricos de Brasil se estudió utilizando las técnicas de polimorfismo de la amplificación aleatoria de ADN (RAPDs) y de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) de los productos obtenidos con los imprimadores JB-1/JB-2 y 272-1int/272-2int.

Los resultados obtenidos mostraron una clara separación entre sí de cepas aisladas de cítricos de Costa Rica, una asociación entre cepas de café de Costa Rica con cepas de vid de Estados Unidos y una asociación entre tres cepas de cítricos de Costa Rica con cepas de cítricos de Brasil. Los resultados del análisis molecular de varianza confirman los datos anteriores, ya que revelaron diferencias genéticas significativas entre los diferentes

hospederos o poblaciones, entre las subpoblaciones (plantas) de los hospederos y dentro de cada planta.

## Índice de cuadros

---

### Capítulo I

<b>Cuadro 1.</b> Enfermedades causadas por <i>X. fastidiosa</i> informadas en diferentes regiones del mundo.....	9
--	---

### Capítulo II

<b>Cuadro 1.</b> Número de árboles positivos para <i>Xylella fastidiosa</i> del total analizados por DAS ELISA procedentes de las diferentes localidades de Costa Rica.....	41
---	----

<b>Cuadro 2.</b> Número de tubos inoculados, contaminados, evaluados y positivos para la presencia de <i>X. fastidiosa</i> , en cada uno de los intentos de aislamiento.....	41
--	----

<b>Cuadro 3.</b> Promedio de la absorbancia de los tubos positivos en cada uno de los aislamientos obtenidos.....	42
---	----

<b>Cuadro 4.</b> Total de clones de <i>X. fastidiosa</i> purificados, obtenidos a partir de árboles de <i>C. sinensis</i> procedentes de diferentes localidades de Costa Rica...	43
--	----

### Capítulo III

<b>Table 1.</b> Number of <i>X. fastidiosa</i> positive samples from the total evaluated by DAS-ELISA.....	58
--	----

### Capítulo IV

<b>Cuadro 1.</b> Aislamientos de <i>Xylella fastidiosa</i> utilizados en este estudio.....	74
--	----

<b>Cuadro 2.</b> Valores de identidad de secuencias obtenidas con los imprimadores 272-1/272-2int y JB-1/JB-2 de seis aislamientos de <i>X. fastidiosa</i> .....	82
--	----

<b>Cuadro 3.</b> Frecuencia de bandas polimórficas amplificadas aleatoriamente (RADPs) en aislamientos de <i>X. fastidiosa</i> obtenidos de diferentes hospederos.....	84
--	----

<b>Cuadro 4.</b> Media de los valores de la diversidad genética ( $H$ ) de Nei para bandas polimórficas amplificadas aleatoriamente (RADPs) y el número de alelos polimórficos por el número total de alelos en aislamientos de <i>X. fastidiosa</i> obtenidos de diferentes hospederos.....	86
<b>Cuadro 5.</b> Estimación de la diversidad genética total de los aislamientos de <i>X. fastidiosa</i> y sus componentes (entre y dentro de cada hospedero) usando marcadores tipo RAPDs.....	87
<b>Cuadro 6.</b> Análisis molecular de varianza de aislamientos de <i>X. fastidiosa</i> de diferentes hospederos de Costa Rica y vid de Estados Unidos.....	87

# Índice de figuras

---

## Capítulo II

- Figura 1.** Hojas de árboles de *C. sinensis* mostrando diferentes síntomas causados por *X. fastidiosa*..... 37
- Figura 2.** Colonias de *X. fastidiosa* aisladas a partir de árboles de *C. sinensis* en medio PW sólido..... 43
- Figura 3.** Micrografía de célula de *X. fastidiosa* con forma de bacilo y pared celular rugosa aislada de tejido vegetal sintomático..... 44
- Figura 4.** Geles de agarosa de los diferentes productos de amplificación obtenidos con cada uno de los pares de imprimadores. **A-** 272-1int/272-2int, **b-** RST-31/RST-33, **c-** CVC-1/272-2int..... 45

## Capítulo III

- Figure 1.** Symptoms of Pierce's disease on leaves..... 56
- Figure 2.** Colonies of *X. fastidiosa* isolated from symptomatic grapevine plants..... 59
- Figure 3.** Electron microscopy of the bacterial cell from isolates of grapevine plants of Costa Rica..... 60
- Figure 4.** Gel electrophoresis of PCR products with different primers. **A)** Product of 500pb obtained with primers 272-1/272-2. **b)** Product of 733pb obtained with primers RST31/RST33..... 61

## Capítulo IV

- Figura 1.** Patrones producidos por la digestión con la enzima *Cfo*-I, del producto obtenido con los imprimadores 272-1int/272-2int de los diferentes aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de cítricos, café y vid de Costa Rica, vid de USA y cítricos de Brasil..... 77
- Figura 2.** Perfiles de restricción generados al digerir las muestras de *X. fastidiosa* con las enzimas *Cfo*-I, *Hinf*-I y *Alu*-I..... 78

<b>Figura 3.</b> Perfiles de restricción generados al digerir las muestras de <i>X. fastidiosa</i> con las enzimas a) <i>Hpa</i> -II, b) <i>Taq</i> -I, c) <i>Rsa</i> -I.....	78
<b>Figura 4.</b> Perfiles de restricción generados al digerir las muestras de <i>X. fastidiosa</i> con las enzimas a) <i>Sau</i> 3A-I, b) <i>Mse</i> -I.....	79
<b>Figura 5.</b> Dendrograma basado en una matriz de similitud de datos generados mediante RFLPs, analizados por el método UPGMA, representando 44 aislamientos de <i>X. fastidiosa</i> obtenidos de cítricos, café, vid de Costa Rica, vid de Estados Unidos y cítricos de Brasil.....	79
<b>Figura 6.</b> Secuencia de 416 nucleótidos obtenida del producto 272-1/272-2int de diferentes aislamientos de <i>X. fastidiosa</i> .....	80
<b>Figura 7.</b> Dendrograma basado en una matriz de similitud de datos generados mediante RAPDs, analizados por el método UPGMA, representando 42 aislamientos de <i>X. fastidiosa</i> obtenidos de cítricos, café y vid de Costa Rica, y vid de Estados Unidos.....	83

## Lista de abreviaturas

---

- °C: grados Celsius
- AD:** “alfalfa dwarf”
- ADN:** ácido desoxiribonucleico
- ALS:** “almond leaf scorch”
- BCYE:** “buffered charcoal-yeast extract medium”
- C:** citosina
- Cap:** capítulo
- cfu:** unidades formadoras de colonias o “colony forming unit”
- CHEF:** electroforesis de campo pulsante o “clamped homogeneous electrical field”
- CLS:** “coffee leaf scorch” o crespada del café
- CTAB:** “hexadeciltrimetil ammonium bromide”
- CVC:** clorosis variegada de los cítricos o “citrus variegated chlorosis”
- DAS-ELISA:** “double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay”
- dNTPs:** dideoxinucleóticos trifosfatos
- EDTA:** etilendiaminotetraacético
- ELISA:** “enzyme linked immunosorbent assay”
- EPS:** exopolisacárido
- FXLB:** “fastidious xylem limited bacteria”
- G:** Guanina
- H:** diversidad genética de Nei
- h:** hora
- JD-1:** J-Davis-1 medium
- Kb:** kilobases
- M:** molar
- MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio
- min:** minutos
- ml:** mililitro
- mm:** milímetros

**mM:** milimolar  
**NaCl:** cloruro de sodio  
**ng:** nanogramos  
**ng/ $\mu$ l:** nanogramos por microlitro  
**nm:** nanómetros  
**pb:** pares de bases  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PD:** mal de Pierce o “Pierce disease”  
**PD2:** “Pierce disease medium-2”  
**PLS:** “plum leaf scald”  
**PPD:** “phony peach disease”  
**PVP:** polivinilpirrolidona  
**PW:** “periwinkle wilt medium”  
**PWS:** “periwinkle wilt supplement medium”  
**PYE:** “phosphate yeast extract”  
**r.p.m:** revoluciones por minuto  
**RAPDs:** polimorfismo de la amplificación aleatoria del ADN o “randomly amplified polymorphic DNA”  
**rep-PCR:** palíndromes extragénicos repetidos-PCR o “repetitive extragenic palindromic-PCR”  
**RFLPs:** polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción o “restriction fragment length polymorphisms”  
**RNA:** “ribonucleic acid”  
**SDS:** sodio dodecil sulfato  
**seg:** segundos  
**SSR:** secuencias cortas repetidas o “short sequence repeat”  
**TAE:** tris acetato-EDTA  
**TE:** tris-EDTA  
**tm:** toneladas métricas  
**tRNA:** “transfer ribonucleic acid”  
**U.S:** United States



**UPGMA:** agrupación de pares no ponderados mediante promedios aritméticos o “Unweighted Pair-Group Meted with Arithmetic Mean”

**U:** unidades

**V:** voltios

**VNTR:** número variable de repeticiones en tandem o “variable number tándem repeats”

**Vol:** volumen

**µg:** microgramos

**µl:** microlitros

**µm:** micrómetro

**µM:** micromolar

## Introducción

---

Las bacterias, son organismos procariotas que causan importantes enfermedades en diferentes cultivos en todo el mundo (Vidhyasekaran 2002). Desde su descubrimiento en 1882, como agentes patógenos de plantas han sido objeto de múltiples estudios que tienen la finalidad de entender los mecanismos de patogenicidad de dichos microorganismos (Kennedy *et al.* 1974).

La mayoría de las bacterias fitopatógenas son Gram negativas, clasificadas dentro del Phylum *Proteobacteria* el cual alberga las familias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae y Lysobacteriaceae (Agrios 2004).

Dentro de la familia Lysobacteriaceae se encuentra la bacteria *Xylella fastidiosa*, la cual se aisló por primera vez en cultivo puro en 1978 a partir de plantas de vid con síntomas de la enfermedad de Pierce (Davis *et al.* 1978, Wells *et al.* 1987). *X. fastidiosa* tiene gran importancia en el ámbito agrícola, por causar enfermedades en un gran número de hospederos entre ellos la alfalfa, durazno, ciruela y almendra (Chang y Donaldson 1993, Beretta *et al.* 1996). Además causa, debilitamiento y muerte en árboles urbanos ornamentales como el olmo y el roble (Hopkins 1989).

En las últimas dos décadas, nuevas enfermedades asociadas a *X. fastidiosa* han emergido en América Latina. En 1987, se observaron en Brasil plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) que presentaban amarillamiento de las hojas, frutos pequeños y duros. En 1989 se informó que el agente causal de esta nueva enfermedad denominada clorosis variegada de los cítricos (CVC) era *X. fastidiosa* (Rossetti *et al.* 1998). La quemadura foliar del café ("coffee leaf scorch" CLS) es otra de las nuevas enfermedades causada por *X. fastidiosa*. Fue descrita también en Brasil, en 1995 donde se encuentra ampliamente distribuida; sin embargo, las pérdidas económicas aún no han sido estimadas (Coletta-Filho *et al.* 2001, Hopkins y Purcell 2002).

En Costa Rica, la enfermedad de Pierce se informó por primera vez en 1979 en la zona de Montezuma, provincia de Puntarenas (Goheen *et al.* 1979). Además, se confirmó que *Xylella fastidiosa* es el agente causal de la enfermedad conocida como la crespada del café

(Rodríguez *et al.* 2001) y de los síntomas similares a CVC observados en plantas de cítricos utilizados como sombra del café y como cercas en linderos (Aguilar *et al.* 2005). También se asoció esta bacteria a otras especies como eucalipto, macadamia, cas, cedro amargo (Moreira *et al.* 2002) y aguacate (Montero-Astúa *et al.* 2008).

La mayoría de las enfermedades descritas causadas por *X. fastidiosa* se presentan en América. Sin embargo en Taiwán se informó la presencia de esta bacteria como agente causal de la enfermedad de la pera conocida como “pear leaf scald” (Leu y Su 1993). Además se ha detectado el mal de Pierce en Europa en la región de los Balcanes en Kosovo (Leu y Su 1993, Berisha *et al.* 1998, Hopkins y Purcell 2002).

*X. fastidiosa* representa una amenaza latente para muchos cultivos agrícolas, ya que se ha demostrado que aislamientos obtenidos de un hospedero pueden infectar y producir síntomas en otros hospederos cuando se realizan inoculaciones cruzadas (Li *et al.* 2001, 2002). Para comprender cómo ocurren estos fenómenos de patogenicidad, es importante llevar a cabo estudios de diversidad genética de las poblaciones microbianas, los cuales permiten hacer distinciones entre patovares de bacterias y además proporcionan información sobre la fisiología de estos microorganismos, sus mecanismos de patogenicidad y especificidad en el ámbito de hospederos. Esta información es necesaria para desarrollar estrategias de control adecuadas para estos patógenos (Coletta-Filho *et al.* 2001, Bhattacharyya *et al.* 2002).

Para llevar a cabo estudios de diversidad genética se hace necesario tener aislamientos puros de la bacteria a partir de los cuales se extrae el ADN. Además los aislamientos puros pueden emplearse para comprobar los postulados de Koch y realizar ensayos de resistencia, en diferentes especies hospederas de la bacteria, como ya fue hecho en variedades de cítricos (Fry y Milholland. 1990).

En el presente trabajo se aisló *X. fastidiosa* a partir de árboles de *Citrus sinensis* y plantas de *Vitis* sp. previamente identificados como positivos para la presencia de la bacteria mediante la técnica de DAS-ELISA. La identidad de los aislados fue comprobada mediante DAS-ELISA y PCR utilizando tres diferentes pares de imprimadores. Además se estudió la diversidad genética entre aislados obtenidos de diferentes y del mismo hospedero de Costa Rica, y se compararon con aislados de vid de Estados Unidos y cítricos de Brasil.

### Literatura citada

- Agrios, GN. 2004. Plant Pathology. V edition. Elsevier Academic Press, San Diego, California. 921pp.
- Aguilar, E; Villalobos, W; Moreira, L; Rodriguez, CM; Kitajima, EW; Rivera, C. 2005. First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica. Plant Disease 89: 687.
- Beretta, MJ; Harakava, R; Chagas, CM; Derrick, KS; Barthe, GA; Ceccardi, TL; Lee, RF; Paradelo, O; Sugimori, M; Ribeiro, IA. 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in Coffee. Plant Disease 80: 821.
- Berisha B; Chen, ZD; Zhang, GY; XU, BY; Chen,TA. 1998: Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevine in Europe. European Journal. Plant Pathology. 104: 427-433.
- Bhattacharyya, A; Stilwagen, S; Ivanova, N; D'Souza, M; Bernal, A; Lykidis, A; Kapatral, V; Anderson, I; Larsen, N; Los, T; Reznik, G; Selkov, E; Walunas, T; Feil, H; Feil, W; Purcell, A; Lassez, JL; Hawkins, T; Haselkorn, R; Overbeek, R; Predki, PF; Kyrpides, N. 2002. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. Proceedings of the National Agriculture of Sciences 99: 12403-12408.
- Chang, CJ; Donaldson, RC. 1993. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. Phytopathology 83: 192-194.
- Coletta-Filho, HD; Takita, MA; Alves, A; Aguilar, CI; Machado, MA. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. Applied Environmental Microbiology 67: 4091-4095.
- Davis, MJ; Purcell, AH; Thomson, SV. 1978. Pierce's disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium. Science 199: 75-77.
- Fry, SM; Milholland, RD. 1990. Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's disease bacterium, *Xylella fastidiosa*. Phytopathology 80: 66-69.
- Goheen, AC; Raju, BC; Lowe, SK; Nyland, G. 1979. Pierce's disease of grapevine in Central America. Plant Disease Reporter 63: 788-792.
- Hopkins, DL; Purcell, AH. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent disease. Plant Disease 86: 1056-1066.
- Hopkins, DL. 1989. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. Annual Review Phytopathology 27: 271-290

- Kennedy, BW; Widin, KD; Baker, IF. 1974. Bacteria as the cause of disease in plants: A Historical perspective. *American Society for Microbiology News* 45: 1-5.
- Leu, LS; Su, CC. 1993. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Disease* 77: 642-646.
- Li, W-B; Zhou, C-H; Pria-Junior, WD; Teixeira, DC; Miranda, VS; Pereira, EO; Ayres, AJ; He, C-X; Costa, PI; Hartung, JS. 2002. Citrus and coffee strains of *Xylella fastidiosa* induce Pierce's disease in grape vine. *Plant Disease* 86: 1206-1210.
- Li, W-B; Pria-Junior, WD; Teixeira, DC; Miranda, VS; Ayres, AJ; Franco, CF; Costa, MG; He, C-X; Costa, PI; Hartung, JS. 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. *Plant Disease* 85: 501-505.
- Montero-Astúa, M; Sañorio, G; Chacon, C; Villalobos, W; Moreira, L; Hartung, J; Rivera, C. 2008. First report of *Xylella fastidiosa* in Avocado. *Plant Disease* 92: 175.
- Moreira, L; Villalobos, W; Rodríguez, CM; Rivera, C. 2002. Presencia de *Xylella fastidiosa* en algunas especies de Costa Rica. In Resúmenes 42<sup>a</sup> Reunión de la Sociedad Americana de Fitopatología-División Caribe. Guatemala 17-19 de junio. p. 75.
- Rodríguez, CM; Obando, JJ; Villalobos, W; Moreira, L; Rivera C. 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. *Plant Disease* 85: 1027.
- Rossetti, V; Gonzales, MA; Donadio, LC. 1998. History. In Citrus variegated chlorosis, Donadio; LC; Soares, C. eds. Bebedouro, Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. p. 1-18.
- Vidhyasekaran, P. 2002. Bacterial disease resistance in plants. Molecular biology and biotechnological applications. The Haworth Press, Binghamton, NY 452 pp.
- Wells, J.M., Raju., B.C., Hung, H.Y., Weisburg, W.G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D.J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. nov: Gram negative, xylem limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 136-143.

## Objetivos

---

### **Objetivo general**

Aislar *Xylella fastidiosa* a partir de árboles de *Citrus sinensis* y *Vitis vinifera* y estudiar su diversidad genética.

### **Objetivos específicos**

1. Detectar la presencia de *X. fastidiosa* en árboles de *Citrus sinensis* y *Vitis vinifera* que presenten síntomas similares a la clorosis variegada de los cítricos y Pierce's disease.
2. Aislar *X. fastidiosa* a partir de los árboles de *Citrus sinensis* y *Vitis vinifera* que sean positivos por DAS-ELISA para la presencia de la bacteria.
3. Comprobar la identidad de los aislamientos obtenidos, mediante la técnica de PCR utilizando imprimadores específicos para la detección de *X. fastidiosa*.
4. Determinar el grado de diversidad genética de los aislamientos obtenidos de cítricos y vid entre sí y en comparación con aislamientos obtenidos de café de Costa Rica, vid de Estados Unidos y cítricos de Brasil mediante la técnica de RFLPs y RAPDs.
5. Establecer relaciones de los aislamientos obtenidos de plantas de Costa Rica.

## CAPÍTULO I



### **Revisión de literatura**

## **Revisión de literatura**

### **I.1 *Xylella fastidiosa*: antecedentes históricos e importancia.**

La enfermedad o mal de Pierce (“Pierce disease”, PD) se informó por primera vez como una nueva enfermedad en plantaciones comerciales de vid (Pierce, citado por Hopkins y Purcell 2002a). Esta enfermedad eliminó la viticultura comercial en el Valle de Santa Ana, (condado de Orange) en California (Pierce, citado por Hopkins y Purcell 2002a). Inicialmente, mediante estudios histológicos se observaron bacterias en las plantas de vid enfermas; sin embargo, no se pudieron aislar (Pierce, citado por Goheen *et al.* 1973a). Al investigar la causa de la enfermedad del enanismo de la alfalfa (“alfalfa dwarf”, AD), se observaron también bacterias en las plantas enfermas, las cuales tampoco se pudieron cultivar (Weimer citado por Goheen *et al.* 1973b). Sin embargo, se demostró que AD se transmitía de plantas enfermas a sanas por injerto (Weimer citado por Goheen *et al.* 1973b). Posteriormente, se estableció que PD se transmitía por injerto y por saltahojas, al igual que la AD y a una nueva enfermedad que se observó en el sureste de Estados Unidos, y se denominó “phony peach disease” (PPD) (Hewitt citado por Goheen *et al.* 1973c). Debido a los resultados de estas investigaciones se estableció la hipótesis, que la PD, AD y PPD eran causadas por virus. En 1971, esta hipótesis se descartó debido a que se logró la remisión de los síntomas de PD, al usar el antibiótico oxitetraciclina y se sugirió, que la causa de la enfermedad era un micoplasma (Hopkins y Mortensen 1971). Goheen *et al.* (1973d) demostraron que el tratamiento con agua caliente de las plantas enfermas podía controlar la PD. Además, al examinar al microscopio electrónico de transmisión secciones del xilema de plantas de vid y alfalfa con síntomas de PD y AD, respectivamente, observaron bacterias similares a rickettsias, pero no tuvieron éxito en el cultivo de dichas bacterias. Hopkins y Mollenhauer (1973), al realizar pruebas con oxitetraciclina, no observaron bacterias similares a rickettsias en el xilema de plantas enfermas con PD tratadas con el antibiótico; y solamente las observaron en las plantas no tratadas con el antibiótico. Posteriormente, se informó una nueva enfermedad, denominada quemadura de la hoja del almendro (“almond leaf scald”, ALS) (Moller *et al.* 1974), y se determinó que el agente causal de ALS era similar al de PD y PPD (Mircetich *et al.* 1976).



En 1978, se aisló la bacteria a partir de plantas con síntomas de PD y de AD (Davis *et al.* 1978), en 1981 a partir de plantas con PPD y “plum leaf scald” (PLS) (Davis *et al.* 1981, Wells *et al.* 1981a y b, Raju *et al.* 1982) y en 1983 se aisló a partir de plantas de *Catharanthus roseus* (Davis *et al.* 1983), donde causa la enfermedad de “periwinkle wilt”, descrita en 1978 (McCoy *et al.* 1978).

El aislamiento de la bacteria a partir de los diferentes hospederos, constituyó el primer gran paso después del cual, se dieron importantes progresos en el estudio de este organismo que hoy conocemos como *X. fastidiosa* (Wells *et al.* 1987), una bacteria Gram negativa en forma de bacilo con una longitud de 1,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 0,25 a 0,50  $\mu\text{m}$ , que se divide por fisión binaria, se limita al xilema y es agente causal comprobado de numerosas enfermedades de plantas de gran importancia económica (cuadro 1) (Davis *et al.* 1978, Mollenhauer y Hopkins 1974).

En los últimos 20 años, nuevas enfermedades asociadas a *X. fastidiosa* emergieron en América Latina. Éstas representan una amenaza para la agricultura. Tal es el caso de la clorosis variegada de los cítricos (“citrus variegated chlorosis”, CVC) (Hartung *et al.* 1994) y la quema foliar del café (“coffee leaf scorch”, CLS) (Beretta *et al.* 1996). Ambas enfermedades se describieron inicialmente en Brasil en 1987 y 1995, respectivamente (Hartung *et al.* 1994, Mizubuti *et al.* 1994, Beretta *et al.* 1996).

En el año 2000, el 35% de los árboles de naranja dulce mostraban síntomas de CVC, en el estado de São Paulo, principal zona productora de cítricos del mundo. Esta enfermedad causa reducción del tamaño y endurecimiento de los frutos, volviéndolos inaceptables para el consumo fresco y la industria de jugos. Las pérdidas económicas anuales que causó CVC en el cultivo de naranja dulce (*Citrus sinensis*), en Brasil, se estimaron en aproximadamente 100 millones de dólares (Li *et al.* 2002). En Argentina la CVC se conoce como pecosita y se observó en áreas adyacentes a Brasil, desde 1984 (Coletta-Filho y Machado 2003). En Venezuela, la bacteria también se detectó en plantas de vid, cítricos y malezas presentes en plantaciones de vid (Garboza y Corona 1994).

**Cuadro 1.** Enfermedades causadas por *X. fastidiosa* informadas en diferentes regiones del mundo

Nombre de la enfermedad	Cultivo afectado	Informado en	Referencias
Mal de Pierce ("Pierce disease", PD)	Vid ( <i>Vitis</i> sp.)	Perú, Venezuela, México, Kosovo, Costa Rica	Davis <i>et al.</i> 1978 Goheen <i>et al.</i> 1979 Hernández y Corona 1997 Berisha <i>et al.</i> 1998
Enanismo de la alfalfa ("Alfalfa dwarf", AD)	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	California, U.S.	Weimer <i>et al.</i> 1931 citado por Goheen 1973b
Quemadura de la hoja del almendro. ("Almond leaf scorch", ALS).	Almendra ( <i>Prunus amygdalus</i> )	California y Argentina	Mircetich <i>et al.</i> 1976 Davis <i>et al.</i> 1980 Nomé <i>et al.</i> 1992
"Phony peach disease", PPD	Melocotón ( <i>Prunus persica</i> (L) Batsch)	Sureste de Estados Unidos.	Wells <i>et al.</i> 1981a,b y 1983
Escaldadura de la hoja del ciruelo ("Plum leaf scald", PLS)	Ciruelo japonés ( <i>Prunus saliciana</i> Lindl)	Sur este de Estados Unidos, Argentina, Paraguay, Brasil	Wells <i>et al.</i> 1981a,b Raju <i>et al.</i> 1982
Clorosis variegada de los cítricos. ("Citrus variegated chlorosis", CVC)	Naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> (L) Osbeck)	Brasil, Argentina, Costa Rica	Brlansky <i>et al.</i> 1991 Chang y Donalson 1993 Hartung <i>et al.</i> 1994 De Lima <i>et al.</i> 1997 Aguilar <i>et al.</i> 2005
Quemadura de la hoja del café ("Coffe leaf scorch", CLS)	Café ( <i>Coffea arabica</i> L).	Brasil, Costa Rica	Beretta <i>et al.</i> 1996 De Lima <i>et al.</i> 1998 Rodríguez <i>et al.</i> 2001
Quemadura de la hoja de roble ("Oak leaf scorch")	Roble rojo ( <i>Quercus rubra</i> L.)	Este de los Estados Unidos	Chang y Walker. 1988 McGovern y Hopkins 1994
Escaldadura de la hoja de maple ("Maple leaf scald", MLS)	Maple ( <i>Acer</i> spp.)	Este de los Estados Unidos	Sherald <i>et al.</i> 1987
Quemadura de la hoja de olmo ("Elm leaf scorch", ELS)	Olmo ( <i>Ulmus</i> spp.)	Este de los Estados Unidos y Oklahoma	Sherald 1993 Olson <i>et al.</i> 2006
"Sycamore leaf scorch", SLS	Sicamoro ( <i>Platanus</i> spp.)	Este de los Estados Unidos	Sherald <i>et al.</i> 1983
Quemadura de la hoja de mora ("Mulberry leaf scorch", MuLS)	Mora ( <i>Morus rubra</i> )	Este de los Estados Unidos	Kostka <i>et al.</i> 1986
Marchitez del periwinkle ("Periwinkle wilt", PW)	Periwinkle ( <i>Catharanthus roseus</i> (L)	Florida, U.S.	Davis <i>et al.</i> 1983
Quema foliar del peral ("Pear leaf scorch")	Pera ( <i>Pyrus pyrifolia</i> (N.L. Burm.) Nakai).	Taiwán	Leu y Su 1993
Quema de la hoja de la pecana ("Pecan leaf scorch")	Pecana ( <i>Carya illinoensis</i> )	Louisiana, U.S.	Sanderlin y Heyderich 2000.
Quema de la hoja del narciso ("Oleander leaf scorch", OLS)	Narciso ( <i>Nerium oleander</i> )	California y Florida, U.S.	Purcell <i>et al.</i> 1999. Costa <i>et al.</i> 2000.

La enfermedad de la quema foliar del café está ampliamente distribuida en Brasil, donde las pérdidas que causa aún no se estiman, pero se consideran muy altas (Coletta-Filho *et al.* 2001, Li *et al.* 2002).

En Costa Rica, inicialmente se informó de la presencia de PD (Goheen *et al.* 1979); luego *X. fastidiosa* se asoció a la enfermedad de la crespada del café (Rodríguez *et al.* 2001), y a cítricos que se utilizan como sombra del café y en cercas vivas, y que muestran síntomas similares a los de CVC (Aguilar *et al.* 2005). Además, *X. fastidiosa* también se detectó en otras especies arbóreas como eucalipto, macadamia, cas, guayaba y cedro amargo (Moreira *et al.* 2002) y aguacate (*Persea americana*) (Montero-Astúa *et al.* 2008).

Leu y Su (1993), informaron en Taiwán la presencia de esta bacteria, asociada con la quema foliar del peral. Este fue el segundo informe de la presencia de *X. fastidiosa* en el continente asiático. Anteriormente se informó un brote de "almond leaf scorch" (ALS) en la India (Jindal y Sharma 1987). En 1998, *X. fastidiosa* se aisló en Kosovo, a partir de plantas de vid que presentaban síntomas similares a PD (Berisha *et al.* 1998).

Dado el aumento de las enfermedades que causa *X. fastidiosa*, en diferentes cultivos y en diferentes regiones del mundo, algunos investigadores consideran que esta bacteria podría ser la causante de otras enfermedades (Sanderlin y Heyderich 2000, Hopkins y Purcell 2002b). Un ejemplo lo constituye la enfermedad conocida como "pecan leaf scorch", la cual originalmente se atribuyó a varios géneros de hongos; sin embargo, se comprobó que también la causa *X. fastidiosa* (Sanderlin y Heyderich 2000, Hopkins y Purcell 2002b).

## **1.2 Características del género *Xylella***

La bacteria causante de la enfermedad de Pierce se describió inicialmente como del tipo rickettsia. En estudios de microscopía electrónica de tejido de plantas de vid con PD, se observó una bacteria estructuralmente diferente a las descritas previamente como patógenos de plantas, y con características morfológicas similares a las de la familia *Rickettsiaceae* (Hopkins y Mollenhauer 1973, Mollenhauer y Hopkins 1974). La comparación del contenido de guanina (G) y citosina (C) en el genoma de la bacteria que causa PD, con la de *Rochalimaea quintana*, rickettsia que causa la fiebre de las trincheras,

determinó que eran genéticamente diferentes. El contenido de G y C, y el tamaño del genoma de la bacteria causante de PD eran mucho mayores que los de las bacterias de la familia *Rickettsiaceae* (Hopkins 1989). Después de estos resultados, los investigadores comenzaron a referirse a la bacteria de PD, como una bacteria fastidiosa limitada al xilema o habitante del xilema (xylem limited bacteria, fastidious xylem limited bacteria) (Hopkins 1989). Actualmente, esta definición se refiere a las bacterias endófitas que viven en los vasos del xilema (Hopkins 1989).

En 1987, se describieron el género *Xylella* y la especie *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.* 1987). Se realizaron estudios sobre la bioquímica, serología, enzimas extracelulares, ácidos grasos, DNA y RNA de 25 aislamientos bacterianos procedentes de vid, melocotón, almendro, ciruelo, “periwinkle”, olmo, sicamoro y roble, y se concluyó que los 25 aislamientos constituían un grupo homogéneo de una sola especie. A pesar de esto, se observaron diferencias en las tasas de crecimiento de cada uno de los aislamientos. Los aislamientos de vid mostraron una mayor tasa de crecimiento y se observaron dos tipos de colonias. Unas lisas con bordes enteros, y otras rugosas con bordes ondulados. Ambos tipos eran cóncavas, pulvinadas, opalescentes, lisas y midieron 0.6 mm de diámetro después de 10 días de incubación, a 27 °C y más de 1,5 mm de diámetro después de 30 días. Las células de todos los aislamientos tenían forma de filamentos largos o bacilos, carentes de flagelos y con un tamaño entre 0.25-0.35 x 0.9 a 3.5 µm (Wells *et al.* 1987). Los análisis bioquímicos y fisiológicos revelaron que eran bacterias Gram negativas, oxidasa negativa, catalasa positiva, estrictamente aeróbicas, no fermentativas, no halófilas, no pigmentadas y no móviles (carecen de flagelos). La temperatura óptima de crecimiento fue entre 26-28 °C y su pH óptimo entre 6.5-6.9 (Wells *et al.* 1987).

Los análisis comparativos de secuencias del ARN ribosomal 16S de varias bacterias, indicaron que no existe ninguna relación filogenética entre *X. fastidiosa* y la familia *Rickettsiaceae*; pero que sí existe relación con el género *Xanthomonas*, por lo que se ubicaron en el subgrupo gamma de las eubacterias (Wells *et al.* 1987).

Actualmente, *X. fastidiosa* se considera miembro de la subdivisión gamma, orden Lysobacterales, familia *Lysobacteriaceae*, grupo *Xanthomonas*, género *Xylella*, con una sola especie *Xylella fastidiosa* (Carlos *et al.* 1998, Oliveira *et al.* 2002).

### **I.3 Aislamiento y cultivo *in vitro* de la bacteria**

La bacteria *X. fastidiosa* se considera un organismo de naturaleza fastidiosa. Su aislamiento es muy difícil, pues no crece en los medios comunes de aislamiento para bacterias y requieren de medios de cultivo complejos (Lemos *et al.* 2003).

A partir del primer aislamiento de *X. fastidiosa* en el medio JD-1 (J-Davis-1) a finales de 1977, se desarrollaron diferentes medios que incluyen en su formulación peptona, triptona, soytona, extracto de levadura, pirofosfato férrico, otras fuentes de hierro, aminoácidos, sales inorgánicas, citrato, succinato, almidón, albúmina bovina, carbón activado, para suplir las necesidades para su crecimiento (Davis *et al.* 1978, Lemos *et al.* 2003). El almidón, la albúmina bovina y el carbón activado ayudan a remover y adsorber inhibidores de tejidos de la planta que contaminan el medio durante el aislamiento primario de la bacteria (Chang y Donaldson 1993).

La secuenciación del genoma de *X. fastidiosa* reveló que la bacteria posee genes que codifican todas las vías metabólicas esenciales para su crecimiento, al utilizar sustratos simples como carbohidratos, aminoácidos y sales inorgánicas, pero carecen de genes que codifican para enzimas individuales requeridas para las síntesis de serina, cisteína y metionina (Simpson *et al.* 2000, Lemos *et al.* 2003).

Para el aislamiento de *X. fastidiosa* se utilizan principalmente los medios de cultivo PD2 (“Pierce disease medium-2”) (Davis *et al.* 1980), (“periwinkle wilt medium”) (Davis *et al.* 1983), BCYE (“buffered charcoal-yeast extract medium”) (Uchiababa *et al.* 1992) PWS (“periwinkle wilt supplement medium”) (Davis *et al.* 1983), CS20 (“Chang & Schaad medium”) (Chang y Schaad 1982). La tasa de crecimiento en estos medios es muy variable entre aislamientos de la bacteria de diferentes hospederos y entre aislamientos de un mismo hospedero. Por ejemplo, aislamientos asociados a PPD y PLS no crecen en medio PD2, únicamente lo hacen en los medios PW, BCYE, CS20 (Davis *et al.* 1980, Chang y Schaad 1982, Davis *et al.* 1983, Uchiababa *et al.* 1992, Purcell y Hopkins 1996). Por el contrario, aislamientos asociados a PD son menos fastidiosos ya que crecen en varios medios de cultivos informados en la literatura (Davis *et al.* 1980, Chang y Schaad 1982, Davis *et al.* 1983, Uchiababa *et al.* 1992, Purcell y Hopkins 1996). También se observó crecimiento de la bacteria en medios simples como PYE (“phosphate yeast extract”), el cual está compuesto

de extracto de levadura y sales de fosfato; y en nutriente agar, con sacarosa como suplemento (Fry *et al.* 1990, Campanharo *et al.* 2003).

El crecimiento de la bacteria en los diferentes medios de cultivo es lento. Las colonias tardan en crecer, aproximadamente, entre 12 y 15 días, a 28 °C, en un ambiente aeróbico. Debido a este hecho, la contaminación con microorganismos saprófitos, que crecen más rápidamente en el medio de cultivo, constituyen un problema serio en el aislamiento de la bacteria (Purcell y Hopkins 1996). También se presentan diferencias en el tiempo de crecimiento y el tamaño de las colonias entre aislamientos obtenidos de diferentes hospederos. Por ejemplo, aislamientos obtenidos de melocotón y ciruela, crecieron aproximadamente en diez días, en medio PW, las colonias fueron muy pequeñas, alcanzaron un diámetro de 0.2-0.7 mm después de dos semanas de crecimiento. Colonias aisladas de vid crecieron en aproximadamente siete días en PW y alcanzaron un diámetro de 0.5-2.0 mm después de diez días (Davis *et al.* 1981). En el caso de los aislamientos de cítricos, el crecimiento de las colonias se observó entre diez y 15 días, en medio PW y alcanzaron un diámetro de 0.31 mm después de 21 días. Colonias aisladas de café se observaron después de diez días, y alcanzaron un diámetro de 0,5-1,5 mm después de 30 días (Hartung *et al.* 1994, Li *et al.* 2001).

La morfología colonial es también variable entre aislados. Se observaron colonias de color blanco, opalescentes, circulares, convexas, con márgenes enteros, así como, colonias planas, con márgenes ondulados. La superficie de la porción convexa de las colonias es lisa mientras que las porciones menos elevadas son rugosas (Davis *et al.* 1981).

Un factor importante en el éxito del aislamiento es la selección del tejido a partir del cual se pretende aislar la bacteria. Éste debe contener una alta población bacteriana. Se observó, que las bacterias tienden a acumularse en partes específicas de la planta. Mediante cortes histológicos teñidos con hematoxilina de Harris y Orange G, se determinó que las venas y pecíolos de las hojas, que presentan síntomas avanzados, son tejidos con altas concentraciones bacterianas, por lo que se consideran muestras muy buenas para hacer los aislamientos (Hopkins 1981, Purcell y Hopkins 1996).

Debido a la dificultad para aislar la bacteria, se propusieron distintos procedimientos para extraerla a partir de tejido infectado y posteriormente cultivarla. Entre ellos los más

utilizados son: - la extracción de la savia del pecíolo mediante la aplicación de vacío y su inoculación en el medio de cultivo; - la siembra directa de pecíolos picados en medio de cultivo líquido; - la incubación del picado de pecíolos por varios minutos, antes de inocularlo en el medio de cultivo líquido o sólido; y - la inoculación de diluciones del picado en los medios a ser utilizados (Docampo y Lenardon 1999). *X. fastidiosa* también se puede aislar de macerados de la cabeza de los insectos vectores previamente desinfectada, de los cuales se colocan gotas en el medio de cultivo (Hill y Purcell 1995).

Los cultivos puros de las bacterias se pueden preservar mediante liofilización o almacenamiento a -70 °C con glicerol al 30% o dimetilsulfóxido (Hopkins 2001).

#### **I.4 Síntomas y patogénesis causados por *X. fastidiosa***

Los principales síntomas de las enfermedades causadas por este patógeno aparecen en las hojas y se caracterizan por clorosis, quemaduras que se extienden desde los márgenes de las hojas hacia adentro, muerte regresiva, retardo en el crecimiento, disminución del vigor, lo cual en algunos casos lleva la planta hasta la muerte, reducción en el tamaño de los frutos y endurecimiento de los frutos, en el caso de CVC. Todos estos síntomas sugieren una disfunción del sistema de conducción de agua y nutrientes, debido a la oclusión que causan los agregados de la bacteria (Hopkins 1989). Sin embargo, en almendros con quema foliar y en secciones transversales de pecíolos de vid cuyas hojas presentaban necrosis marginal, se observó un bajo número de conductos vasculares infectados por la bacteria. Estos datos inicialmente provocaron que muchos investigadores se cuestionaran el hecho de si la oclusión vascular era suficiente para causar los síntomas observados (Mircetich *et al.* 1976, Hopkins 1989), por lo que propusieron dos hipótesis para explicar los mecanismos de patogénesis de *X. fastidiosa*. La hipótesis de las fitotoxinas que indica que los síntomas se deben a la producción de compuestos fitotóxicos se sustenta en la observación de síntomas de PD en hojas de vid, después que éstas se colocan en suspensiones de *X. fastidiosa* cultivadas en medio PD-2 líquido. Sin embargo, se sugirió que componentes del medio de cultivo, como triptona, soytona y hemina, eran capaces de producir la necrosis marginal en las hojas (Lee *et al.* 1982, Goodwin *et al.* 1988). La segunda hipótesis, del desbalance de los reguladores de crecimiento, indica que los síntomas, como deformación de las hojas,

entrenados cortos y reducción en el tamaño del fruto, no se deben al estrés hídrico que causa la oclusión de los conductos vasculares, sino, más bien a alteraciones en los niveles endógenos de los reguladores de crecimiento de la planta (Hopkins 1989). Esta hipótesis se basa en el hecho, que plantas inoculadas con la bacteria, a las que se les habían aplicado diferentes soluciones de reguladores de crecimiento, desarrollaron o no síntomas, dependiendo del regulador aplicado. Sin embargo, esto se debe a que algunos reguladores retardan y otros aumentan la senescencia de las hojas (Hopkins 1985).

La patogenicidad de *X. fastidiosa* aumenta cuando las plantas se encuentran en situaciones adicionales de estrés. En el caso de la CVC se observó que el estrés hídrico, altas temperaturas, daños en el sistema radicular de la planta y la sobreproducción de frutos pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad (Ribeiro *et al.* 2004). McElrone y Forseth (2004) mencionaron que cuando una planta se somete a estrés hídrico, se reduce su capacidad de producir defensas contra el patógeno, y se aumentan la severidad de los síntomas y la tasa de dispersión del patógeno en el tejido. Además, el estrés hídrico, en conjunto con la infección por el patógeno, comprometen el sistema de fotoprotección de la planta y provocan un aumento del síntoma de quemadura en las hojas (McElrone y Forseth 2004).

Los mecanismos de patogénesis entre cepas de *X. fastidiosa* no están bien caracterizados y, aparentemente son muy complejos (Hopkins 1989). Diversas investigaciones han demostrado que cepas aisladas de un hospedero son capaces de infectar y causar síntomas en otros cultivos (Davis *et al.* 1983, Li *et al.* 2001 y 2002).

Con la secuenciación del genoma de *X. fastidiosa* se determinó que los mecanismos asociados con la patogénesis y virulencia involucran varios genes que regulan la secreción de toxinas, sistemas de secuestro de iones y antibióticos. Además, las interacciones bacteria-bacteria, bacteria-vector, bacteria-hospedero son mediadas por varias proteínas. Los genes ortólogos que codifican muchas de éstas proteínas se identificaron en patógenos de humanos y animales. La presencia de estos genes en *X. fastidiosa* indicó que las bases moleculares para la patogénesis son conservadas e independientes del hospedero (Simpson *et al.* 2000).



Un aspecto muy importante en la patogénesis de *X. fastidiosa* lo constituye la formación de biofilm, que se define como una estructura formada por agregados bacterianos. En esta estructura, las bacterias se encuentran inmersas en una sustancia producida por ellas mismas denominada exopolisacárido (EPS), el cual, en el caso de *X. fastidiosa*, recibe el nombre de fastidian (Marques *et al.* 2002). La formación de biofilm en *X. fastidiosa* depende de sistema de genes *rpf*, el cual se activa mediante el sistema de "quorum sensing", por una señal o factor difundible ("difussible signal factor" DSF) (Ramey *et al.* 2004). El fastidian por su carga negativa secuestra los cationes como el zinc. De esta manera se reduce la disponibilidad de este elemento en la planta, por lo que se observan los síntomas característicos de su deficiencia en plantas de cítricos colonizadas por *X. fastidiosa* (Osiro *et al.* 2004). El fastidian es importante en la adhesión de la bacteria al intestino del insecto vector, bacterias mutantes para los genes *rpf* no se transmiten por los insectos vectores (Newman *et al.* 2004).

También se identificaron los genes *pilS*, *pilR*. Estos codifican para dos componentes que controlan la transcripción de subunidades de las fimbrias, en respuesta a señales del hospedero. Estas fimbrias están involucradas en interacciones planta-bacteria y bacteria-bacteria durante el proceso de colonización (Simpson *et al.* 2000). Además, se identificaron las enzimas pectolíticas, encargadas de degradar la membrana de los vasos del xilema, para permitir una efectiva colonización dentro del hospedero (Simpson *et al.* 2000).

### **I.5 Vectores y transmisión de *X. fastidiosa***

Gravena *et al.* (1998a) informaron que insectos chupadores de la familia Cercopidae y Cicadellidae, conocidos como saltahojas o chicharritas, son vectores eficientes de *X. fastidiosa*. Entre las especies vectoras se encuentran *Homoladisca coagulata*, *Oncometopia undata*, que transmiten la bacteria en melocotón (Turner y Pollar citados por Gravena *et al.* 1998b). *Phileanus spumarius*, *Draculacephala minerva* y *Grapocephala atropunctata*, que la transmiten en almendro (Purcell 1980). Estas dos últimas, en conjunto con *Carneocephala fulgida*, son importantes vectores en vid (Purcell y Frazier 1985). *Acrogonia gracilis*, *Oncometopia facialis* y *Dilobopterus costalimai* se identificaron como vectores de la bacteria en cítricos en Brasil (Fariás *et al.* 2003).

La transmisión exitosa de *X. fastidiosa* por estos insectos se debe a las adaptaciones morfo-fisiológicas con las que cuentan para alimentarse del xilema y se caracteriza por ser la única, donde el insecto adulto transmite la bacteria inmediatamente después de adquirirla y continúan transmitiéndola eficientemente por el resto de su vida (Gravena *et al.* 1998a, Brlansky *et al.* 2002). Purcell y Finlay (1979) informaron, que las ninfas no son capaces de transmitir la bacteria después de las mudas.

Mediante microscopía electrónica se determinó que la bacteria coloniza la bomba cibarial y el esófago en el intestino anterior, y se adhiere mediante el EPS. La multiplicación de la bacteria en esta zona sugiere que su transmisión es propagativa. La fuerza de bombeo y el flujo de líquidos durante la succión, probablemente, permiten la salida de muchas bacterias a través del canal de alimentación, y su paso hacia el xilema de las plantas (Hopkins 1989). La transmisión eficiente de la bacteria requiere menos de 100 células presentes en la cabeza del insecto (Purcell y Hopkins 1996). El período de succión, tiene mucha influencia en la transmisión de la bacteria, en experimentos de transmisión hechos en plantas de *Citrus sinensis* se observó que un solo insecto transmite eficientemente la bacteria, siempre y cuando, se alimente activamente por mucho tiempo, lo cual asegura que ocurran la adquisición y la transmisión de la bacteria (Brlansky *et al.* 2002).

#### **I.6 Detección y diagnóstico de *X. fastidiosa***

Actualmente los métodos de detección de *X. fastidiosa* incluyen microscopía electrónica de transmisión y barrido, microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia, cultivo de la bacteria en medios nutritivos, “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Minsavage *et al.* 1994).

La microscopía electrónica permitió determinar con certeza la ubicación de la bacteria en el tejido de la planta y observar características de la célula bacteriana (tamaño, forma, tipo de pared celular y mecanismo de división celular) (Mollenhauer y Hopkins 1974, Davis *et al.* 1978)

Mediante la microscopia de luz se determinaron, los meses en los que la bacteria se encuentra en mayor concentración en el tejido causando oclusión del xilema (Hopkins 1989).

La técnica serológica ELISA se utiliza para la detección y cuantificación de la bacteria en diferentes hospederos, tanto sintomáticos como asintomáticos y en vectores. Esto hace que la técnica sea útil para estudios de epidemiología (Nomé *et al.* 1980). También, por esta técnica se puede estudiar la distribución del patógeno dentro de la planta (Nomé *et al.* 1980). La sensibilidad de detección de la técnica es de  $10^5$  células por mililitro (Nomé *et al.* 1980, Raju *et al.* 1983). Se observó que anticuerpos producidos contra *X. fastidiosa* aislada de un hospedero reaccionan con menos intensidad con aislados de otros hospederos indicando que existen diferencias entre cepas aisladas de uno o de otro hospedero, lo cual podría ser considerado para la clasificación de la bacteria a nivel de patovar (Timmer *et al.* 1983).

La PCR es una de las técnicas moleculares que actualmente se utiliza para la detección de secuencias específicas de ADN de *X. fastidiosa* y otros patógenos de plantas (Purcell y Hopkins 1996). La especificidad de la reacción está determinada por los imprimadores que se usen. Estos son secuencias cortas de ADN entre 15 y 30 nucleótidos, específicas y complementarias a una secuencia del ADN de interés (Moctezuma y Kahl 2000).

En el caso de *X. fastidiosa* se diseñaron varios imprimadores, entre los cuales se pueden mencionar los RST31, RST33 (Minsavage *et al.* 1994) y los 272-1-int, 272-2-int (Pooler y Hartung 1995). Ambos pares se utilizan para la amplificación de ADN de todas las cepas de *X. fastidiosa* conocidas. El tamaño de los fragmentos amplificados es de 733 bp y 500 bp, respectivamente (Minsavage *et al.* 1994, Pooler y Hartung 1995, Hopkins 2001).

Beretta *et al.* (1997) diseñaron los imprimadores CVC-1 y CVC-2 para la detección específica de cepas de *X. fastidiosa* que causan CVC, cuyo fragmento de amplificación es de 270pb. Estos imprimadores se diseñaron a partir de secuencias consenso, amplificadas previamente con los imprimadores T5B y T3A tRNA, que amplifican ADN de plantas, bacterias y animales, y generan huellas genómicas altamente conservadas dentro de una especie. La combinación de los imprimadores CVC-1 y 272-2int permite únicamente la

amplificación de ADN de *X. fastidiosa* que causa CVC (Pooler y Hartung 1995). Ferreira *et al.* (2000), diseñaron los imprimadores JB-1 y JB-2 basándose en una secuencia de ADN, que se amplificó con el imprimador OPR-2, al utilizar la técnica de RAPD. Esta secuencia es común para cepas de *X. fastidiosa* aisladas de diferentes hospederos. El tamaño del fragmento amplificado por estos imprimadores es de 1 Kb al utilizar una temperatura de acoplamiento de 64 °C (Ferreira *et al.* 2000)

La PCR es cien veces más sensible que ELISA para la detección de *X. fastidiosa*; sin embargo, la sensibilidad de la reacción puede ser afectada por compuestos fenólicos y polisacáridos del tejido de la planta, cuando se utiliza directamente extracto de savia como muestra para el análisis o ADN extraído a partir de estos extractos. Para evitar este problema, los extractos de savia se pueden diluir, o se puede adicionar una solución de polivinilpirrolidona y ascorbato de sodio al amortiguador de extracción para inactivar los inhibidores (Minsavage *et al.* 1994).

La detección de la bacteria en los insectos transmisores por PCR no es fácil, el bajo número de células bacterianas presentes en el vector, no permiten extraer cantidades de ADN adecuadas y de buena calidad para realizar el PCR. Además, el ADN del vector, por encontrarse en mayor cantidad que el de la bacteria, puede saturar la capacidad de extracción de los kits, cuando se utilizan. Por otro lado la bacteria se adhiere al intestino anterior del insecto, región que posee mucha quitina, que dificulta la extracción. Los pigmentos de los ojos del insecto también pueden inhibir la reacción de PCR por lo que se recomienda remover los ojos antes de la extracción (Bextine *et al.* 2004).

En vista de que la calidad del ADN es muy importante, para llevar a cabo la reacción de PCR se recomienda hacer las extracciones de cultivos puros aislados del tejido vegetal. La mayoría de los protocolos que se utilizan para la preparación de ADN genómico bacteriano consisten en la lisis de las células con un detergente combinado con una lisozima. Posteriormente, la incubación con una proteasa y una serie de extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, y finalmente la precipitación del ácido nucleico con isopropanol. Éste procedimiento asegura la obtención de ADN de buena calidad y en altas concentraciones a partir de una gran variedad de bacterias Gram negativas (Ausubel *et al.* 1990).

### **I.7 Variabilidad genética de *X. fastidiosa***

Aunque todas las cepas de *X. fastidiosa* se agrupan dentro de una misma especie, éstas difieren en su ámbito de hospederos, patogenicidad, requerimientos nutricionales y homología del ADN. Esto significa que existe más de un patovar o subespecie, los cuales se deben caracterizar genéticamente para establecer las relaciones patogénicas y serológicas que presentan entre sí y con otros grupos de bacterias fitopatógenas. Esto ayudará a comprender mejor la ecología y epidemiología de la bacteria y además a desarrollar estrategias de control adecuadas (Purcell y Hopkins 1996, Hopkins y Purcell 2002b).

Técnicas como el análisis de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), polimorfismo de la amplificación aleatoria del ADN (RAPD), la PCR, palíndromes extragénicos repetidos-PCR (rep-PCR), y electroforesis de campo pulsante (CHEF), se han utilizado para estudiar la variación genética y relaciones existentes entre cepas de *X. fastidiosa*. Sin embargo, aún no se logra un consenso para clasificar los diferentes aislamientos de la bacteria, debido a que estas técnicas producen datos limitados sobre la cantidad de información genética por locus, lo que no permite obtener una buena resolución de la heterogenicidad genética entre cepas (Coletta-Filho *et al.* 2001, Chen *et al.* 2002).

Al secuenciar la región del espacio intergénico 16S-23SrRNA se observó que todas las cepas de *X. fastidiosa* contienen tRNA para alanina e isoleucinas en la posición 133-191 y 225-272, respectivamente. Las cepas aisladas de un mismo hospedero tienen secuencias idénticas entre sí en la región 16S-23Sr RNA, como es el caso de ciruela, melocotón, narciso, olmo, uva. Sin embargo, algunas cepas aisladas de maple y almendro no tienen secuencias idénticas entre sí para esta región, pero son similares a las secuencias de vid. Sin embargo, existen variaciones mínimas entre aislados de diferentes hospederos, lo cual indica que están filogenéticamente relacionados. Los altos niveles de homología en el ADN de cepas de *X. fastidiosa* indican que las diferencias entre cepas pueden ubicarse en arreglos lineales de cistrones dentro del genoma (Hendson *et al.* 2001).

Por medio de la técnica de CHEF y RAPD se distinguió un mayor porcentaje de heterogeneidad genética entre cepas de *X. fastidiosa*. Sin embargo, la CHEF provee menor resolución de la heterogeneidad genética que los RAPDs (Hendson *et al.* 2001).

En Brasil, para estudiar la diversidad genética de cepas de *X. fastidiosa* aisladas de café y cítricos, se utilizó el análisis de las secuencias cortas repetidas (SSR, por sus siglas en inglés), las cuales pueden tener un número de repeticiones variables en tándem (VNTR). Muchas de estas regiones repetidas se localizan dentro o cerca de regiones codificantes del ADN y pueden tener el potencial para afectar la expresión de genes. Las SSR en *X. fastidiosa* son muy diferentes a las descritas para otras bacterias como *Neisseria*, *Mycobacterium* y *Escherichia coli*. Los VNTR seleccionados para la tipificación de aislamientos de diferentes hospederos mostraron que la diversidad genética de *X. fastidiosa* es muy alta, especialmente para aislamientos de café y cítricos, lo cual es congruente con lo obtenido con RAPDs, a pesar de que éstos tienen una baja capacidad discriminatoria entre cepas aisladas de cítricos (Coletta-Filho *et al.* 2001, Coletta-Filho y Machado 2003). Como resultado de varios factores, como cambios genéticos (mutaciones y/o recombinaciones), migración de un área geográfica a otra y presión de selección del hospedero, pueden ocurrir cambios en la estructura de la población de los patógenos (Coletta-Filho y Machado 2002). En el caso de cítricos se determinó que la variedad del hospedero no tiene influencia sobre la estructura de la población bacteriana, lo que sugiere que no ocurrió una co-evolución entre las variedades de cítricos y la bacteria (Coletta-Filho y Machado 2002). Existen diferentes cepas de *X. fastidiosa* dentro de una misma planta, probablemente por recombinación genética, aunque esta recombinación no se ha comprobado, o por múltiples inoculaciones mediante vectores procedentes de diferentes hospederos (Coletta-Filho y Machado 2002). Esto podría explicar el hecho que cepas de *X. fastidiosa* que infectan cítricos sean una variante clonal de las cepas que infectan café (Qin *et al.* 2001).

En conclusión, los diferentes estudios realizados sobre la diversidad genética de *X. fastidiosa* sugieren que esta bacteria puede ser diferenciada a nivel de subespecie y patovar; sin embargo, se debe estudiar con mayor profundidad el hecho que algunas cepas tienen la capacidad de infectar y causar enfermedad en varias plantas hospederas, antes de designar la categoría de patovar (Hendson *et al.* 2001). Hasta el 2003, la clasificación se basó en el uso de RAPD-PCR, y se distinguieron tres grandes grupos. El grupo PD (“Pierce disease”), el grupo PLS-PPD (“plum leaf scald”- “phony peach disease”) y el grupo CVC-CLS (“citrus variegated chlorosis”- “coffee leaf scorch”). También, se distinguieron tres grupos

pequeños, el MLS (“mulberry leaf scorch”), OLS (“oak leaf scorch”) y ALS (“almond leaf scorch”) (Da-Costa *et al.* 2000, Henderson *et al.* 2001, Mehta *et al.* 2001, Mehta y Rosato 2001, Chen *et al.* 2002).

Schaad y colaboradores (2004) se basaron en análisis de secuencias de la región intergénica 16S y 23S, y en las relaciones de ADN-ADN entre aislamientos de diez diferentes hospederos, y propusieron clasificar 26 cepas de *X. fastidiosa* clasificadas en tres subespecies, *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, *multiplex* y *pauca*. La subespecie *piercei* incluye cepas que infectan vid, alfalfa, maple, y almendra. La subespecie *multiplex* incluye cepas aisladas de melocotón, ciruelo, almendra, olmo, grape, sicamoro, y otros árboles de sombra, y la subespecie *pauca* incluye únicamente cepas que causan CVC (Schaad *et al.* 2004). En el caso de aislamientos de café, aun no se han realizado estudios que permitan clasificarlos dentro de alguna subespecie.

### **1.8 Clorosis variegada de los cítricos (CVC)**

Actualmente la clorosis variegada de los cítricos (CVC) es la enfermedad más severa de los cítricos en Brasil. Se observó por primera vez en 1987, al este del estado de São Paulo, en la región de Bebedouro. Posteriormente, se presentó en Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, y Rio Grande do Sul (Hartung *et al.* 1994, Rossetti *et al.* 1998). Además, la enfermedad fue observada en Argentina desde 1984, donde se conoce como pecosita por las manchas cafés que se observan en los frutos (Brlansky *et al.* 1991, Coletta-Filho y Machado 2003).

Inicialmente se consideraron como causas de la enfermedad, factores nutricionales y toxicidad por exceso de herbicidas. Al realizar experimentos tomando en cuenta estos factores no se obtuvieron respuestas claras que permitieran identificar la causa de la enfermedad (Rossetti *et al.* 1998). En 1989, material sintomático de Brasil, se analizó mediante microscopía electrónica, y se observó que los vasos del xilema del tejido estaban colonizados por una bacteria similar a *X. fastidiosa* (Rossetti *et al.* 1998).

Chang *et al.* (1993) aislaron *X. fastidiosa* de plantas de cítricos de Brasil y además, confirmaron, mediante los postulados de Koch que esta bacteria era el agente causal de CVC.

Los síntomas de CVC en naranja dulce se caracterizan por clorosis, deformación de las hojas, muerte regresiva de la planta, frutos pequeños y duros, inaceptables en el mercado y en la industria de jugos. Además, en el envés de la hoja se observan pústulas necróticas color marrón oscuro (Rossetti *et al.* 1998).

Informes recientes de la presencia de la enfermedad se dieron también en Uruguay (Coletta-Filho y Machado 2003). En Costa Rica, la CVC se observó en árboles de cítricos que sirven como sombra en plantaciones de café y cercas que delimitan linderos (Aguilar *et al.* 2005).

En Brasil, se informó que especies de la familia Cicadellidae actúan como vectores de CVC. Entre las especies identificadas como vectores más eficientes de CVC se encuentran *Dialobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis*, *Oncometopia faciali* (Gravena *et al.* 1998a). Estos insectos adquieren la bacteria al alimentarse de plantas infectadas y, de la misma manera, la transmiten a las plantas sanas (Gravena *et al.* 1998a).

En Brasil, se adoptaron medidas fitosanitarias de control para evitar el movimiento de plantas de cítricos infectadas hacia áreas libres de la enfermedad. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad aumentó de 22,3% en 1996 a más del 30% en el año 2002 (Lopes *et al.* 2003).

El manejo de esta enfermedad se basa principalmente en control químico del vector, mantenimiento de plantas sanas utilizadas para propagación protegidas en invernadero, reducción de las fuentes de inóculo por erradicación de plantas jóvenes sintomáticas y poda de ramas sintomáticas en árboles viejos (Coletta-Filho y Machado 2002). El uso de variedades resistentes es quizás el método de control más adecuado para esta enfermedad, por lo que los brasileños han iniciado investigaciones relacionadas con el mapeo genético de variedades resistentes a CVC y estudios de funcionamiento del genoma de naranja dulce enfocados a la interacción planta-patógeno (Coletta-Filho y Machado 2002). Investigadores de la Fundación para la Protección de Plantas de Cítricos (FUNDECITRUS) actualmente trabajan en la selección de plantas que muestren resistencia o tolerancia a CVC, ya que se ha visto que plantas de mandarina son resistentes (Filho *et al.* 1998).



### I.9 Literatura citada

- Aguilar, E; Villalobos, W; Moreira, L; Rodríguez, CM; Kitajima, EW; Rivera, C. 2005. First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica. *Plant Disease* 89: 687.
- Ausubel, FM; Brent, R; Kingston, RE; Moore, DD; Seidman, JG; Smith, JA; Struhl, K. 1990. *Current protocols in molecular biology*. New York, Wiley & Sons. p.2.4.1-2.4.5.
- Beretta, MJ; Barthe, GA; Ceccardi, TL; Lee, RF; Derrick, KS. 1997. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. *Plant Disease* 81: 1196-1198.
- Beretta, MJ; Harakava, R; Chagas, CM; Derrick, KS; Barthe, GA; Ceccardi, TL; Lee, RF; Paradela, O; Sugimori, M; Ribeiro, IA. 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in Coffee. *Plant Disease* 80: 821.
- Berisha, B., Chen, Y.D., Zhang, G.Y., Xu, B.Y., and Chen, T.A. 1998. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 104: 427-433.
- Bextine, B; Tuan, SJ; Shaikh, H; Blua, M; Miller, TA. 2004. Evaluation of methods for extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the glassy winged sharpshooter. *Journal of Economic Entomology* 97: 757-763.
- Brlansky, RH; Damsteegt, VD; Hartung, JS. 2002. Transmission of the citrus variegated chlorosis bacterium *Xylella fastidiosa* with the sharpshooter *Oncometopia nigricans*. *Plant Disease* 86: 1237-1239.
- Brlansky, RH; Davis, CL; Timmer, LW; Howd, DS; Contreras, J. 1991. Xylem-limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis. *Phytopathology* 81: 1210.
- Campanharo, JC; Lemos, MV; Lemos, EG. 2003. Growth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Opinion Microbiology* 46: 99-102.
- Carlos, EF; Neto, JR; Beretta, MJ. 1998. The Bacterium *Xylella fastidiosa*. In *Citrus variegated chlorosis*. Donadio, LC; Soares, C. eds. Bebedouro, Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. p. 22-34.
- Chang, CJ; Donaldson, RC. 1993. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. *Phytopathology* 83: 192-194.
- Chang, CJ; Garnier, M; Zreik, L, Rossetti, V; Bove, JM. 1993. Culture and serological detection of the xylem limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology* 27: 137-142.

- Chang, CJ; Walker, TJ. 1988. Bacterial leaf scorch of northern red oak: isolation, cultivation and pathogenicity of a xylem-limited bacterium. *Plant Disease* 72: 730-733.
- Chang, CJ; Schaad, NW. 1982. *In vitro* antibiotic susceptibility of xylem limited plant pathogenic rickettsia-like bacteria. *Phytopathology* 72: 1006.
- Chen, J; Hartung, JS; Chang CJ; Vidavier, AK. 2002. An evolutionary perspective of Pierce's disease of grapevine, citrus variegated chlorosis, and mulberry leaf scorch disease. *Current Microbiology* 45: 423-428.
- Coletta-Filho, HD; Machado, MA. 2003. Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in Sao Paulo State, Brazil. *Phytopathology* 93: 28-34.
- Coletta-Filho, HD; Machado, MA. 2002. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3731-3736.
- Coletta-Filho, HD; Takita, MA; Alves, A; Aguilar, CI; Machado, MA. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Applied Environmental Microbiology* 67: 4091-4095.
- Costa, HS; Blua, MS; Bethke, JA; Redak, RA. 2000. Transmission of *Xylella fastidiosa* to oleander by glassywinged sharpshooter, *Homaladisca coagulata*. *HortScience* 35: 1265-1267.
- Da Costa, PI; Franco CF; Miranda, VS; Teixeira, DC; Hartung, JS. 2000. Strains of *Xylella fastidiosa* rapidly distinguished by arbitrarily primed-PCR. *Current Microbiology* 40: 279-282.
- Davis, MJ; Raju, BC; Brlansky, RH; Lee, RF; Timmer, LW; Norris, RC; McCoy, RE. 1983. Periwinkle wilt bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram negative, xylem-inhabiting bacteria. *Phytopathology* 73: 1510-1515.
- Davis, MJ; French, WJ; Schaad, NW. 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* 6: 309-314.
- Davis, MJ; Thomson, SV; Purcell, AH. 1980. Etiological role of a xylem-limited bacterium causing Pierce's disease in almond leaf scorch. *Phytopathology* 70: 472-475.
- Davis, MJ; Purcell, AH; Thomson, SV. 1978. Pierce's disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium. *Science* 199: 75-77.
- De Lima, JE; Miranda, VS; Hartung, JS; Brlansky, RH; Coutinho, A; Robert, SR; Carlos, EF. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Disease* 82: 94-97.

- De Lima, JE; Miranda, VS; Roberto, SR; Coutinho, A; Palma, RR; Pizzolitto, AC. 1997. Diagnose da clorose variegada dos citros por microscopia ótica. *Fitopatologia Brasileira* 22: 370-374.
- Docampo, DM; Lenardon, SL; 1999. Métodos de detectar patógenos sistémicos. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal. Córdoba, Argentina, INTA-JICA p. 141-151.
- Fariás, P; Roberto, S; Lopes, J; Perecin, D. 2003. Geostatistical characterization of the spatial distribution of *Xylella fastidiosa* sharpshooter vectors on citrus. *Neotropical Entomology* 33: 13-20.
- Ferreira, H; Goncalves, RE; Rodrigues, NJ; Rosato, YB. 2000. Primers specifics for *Xylella fastidiosa* based on RAPD differential fragments. *Summa Phytopathologica* 26: 15-20.
- Filho, FA; Coutinho, A; Donadio, LC; Mendes, BM; L, W. 1998. Citrus cultivar behaviour to the CVC *In: Citrus variegates chlorosis*, Donadio, LC; Soares, C. eds. Bebedouro, Brasil. Fundo de Defesa da Citricultura p. 54-75.
- Fry, SM; Milholland, RD; Huang, PY. 1990. Isolation and growth of strains of *Xylella fastidiosa* from infected grapevines on nutrient agar media. *Plant Disease* 74: 522-524.
- Garboza, LH; Corona, FO. 1994. Diagnóstico de *Xylella fastidiosa* en la vid y malezas asociadas con el cultivo. *Manejo Integrado de Plagas* 33: 7-10.
- Goheen, AC; Nyland, G; Lowe, SK. 1973a. Association of a rickettsia like organism with Pierce Disease of grapevine and Alfalfa Dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63: 342 p. Fuente original Pierce, N.B. 1892. The California vine disease. U.S. Department of Agriculture Division of vegetal pathology bulletin 2: 222.
- Goheen, AC; Nyland, G; Lowe, SK. 1973b. Association of a rickettsia like organism with Pierce Disease of grapevine and Alfalfa Dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63: 342 p. Fuente original Weimer, JL. 1931. Alfalfa dwarf, a hitherto unreported disease. *Phytopathology* 21: 71-75.
- Goheen, AC; Nyland, G; Lowe, SK. 1973c. Association of a rickettsia like organism with Pierce Disease of grapevine and Alfalfa Dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63: 341 p. Fuente original Hewitt, WB; Frazier, NW; Jacob, HE; Freitag, JH. Pierce's disease of grapevines. California. Agricultural. Experimental. Station. *Circ* 353: 1-32.
- Goheen, AC; Nyland, G; Lowe, SK. 1973d. Association of a rickettsia like organism with Pierce Disease of grapevine and Alfalfa Dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63: 341-345.

- Goheen, AC; Raju, BC; Lowe, SK; Nyland, G. 1979. Pierce's disease of grapevine in Central America. *Plant Disease Reporter* 63: 788-792.
- Goodwin, PH; DeVay, JE; Meredith, CP. 1988. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce's disease of the grapevine. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 1-15.
- Gravena, S; Lopes, JR; Paiva, PE; Yamamoto, PT; Roberto, SR. 1998a. The *Xylella fastidiosa* vectors. In *Citrus variegated chlorosis*. Donadio; LC; Soares C. eds. Bebedouro, Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. p. 36-53.
- Gravena, S; Lopes, JR; Paiva, PE; Yamamoto, PT; Roberto, SR. 1998b. The *Xylella fastidiosa* vectors. In *Citrus variegated chlorosis*. Donadio; LC; Soares, C. eds. Bebedouro, Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. p. 42. Fuente original Turner, WF; Pollard, HN. 1955. *Journal of Economic Entomology* 48: 771-772.
- Hartung, JS; Beretta, J; Brlansky, RH; Spisso, J; Lee, R. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84: 591-597.
- Hendson, M; Purcell, AH; Chen, D; Smart, C; Guilhabert, M; Kirkpatrick, B. 2001. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 895-903.
- Hernández, L; Corona, FM. 1997. Detección de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* por ELISA-DAS en vid (*Vitis vinifera* L) y malezas en viñedos del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (Luz)*. 14: 297-306.
- Hill, BL; Purcell, H. 1995. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* 85: 209-212.
- Hopkins, DL; Purcell, AH. 2002a. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent disease. *Plant Disease* 86: p1056. Fuente original Pierce, N.B. 1892. The California vine disease. U.S. Department of Agriculture Division of vegetal pathology bulletin 2: 222.
- Hopkins, DL; Purcell, AH. 2002b. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent disease. *Plant Disease* 86: 1056-1066.
- Hopkins, DL. 2001. *Xylella fastidiosa* In: NW Ichaad; JB Jones; W Chun. eds. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. Minnesota, USA, APS Press. p.201-213.
- Hopkins, DL. 1989. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology* 27: 271-290.

- Hopkins, DL. 1985. Effects of plant growth regulators on development of pierce's disease symptoms in grapevine. *Plant Disease* 69: 944-946.
- Hopkins, DL. 1981. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems petioles and leaf veins. *Phytopathology* 71: 415-418.
- Hopkins, DL; Mollenhauer, HH. 1973. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's Disease of grapes. *Science* 179: 298-300.
- Hopkins, DL; Mortensen JA. 1971. Suppression of Pierce Disease symptoms by tetracycline antibiotics. *Plant Disease Reporter* 55: 610-612.
- Jindal, KK; Sharma, RC. 1987. Outbreaks and new records: Indian almond leaf scorch a new disease from India. *Plant Protection Bulletin* 35: 64-65.
- Kostka, SJ; Tattar, TA; Sherald, JL; Hurt; SS. 1986. Mulberry leaf scorch new disease caused by a fastidious xylem-inhabiting bacterium. *Plant Disease* 70: 690-693.
- Lee, RF; Raju, BC; Nyland, G; Goheen, AC. 1982. Phytotoxin (s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology* 72: 886-888.
- Lemos, EG; Alves, LM; Campanharo, JC. 2003. Genomics-based desing of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiology* 219: 39-45.
- Leu, LS; Su, CC. 1993. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Disease* 77: 642-646.
- Li, W-B; Zhou, C-H; Pria-Junior, WD; Teixeira, DC; Miranda, VS; Pereira, EO; Ayres, AJ; He, C-X; Costa, PI; Hartung, JS. 2002. Citrus and coffee strains of *Xylella fastidiosa* induce Pierce's disease in grape vine. *Plant Disease* 86: 1206-1210.
- Li, W-B; Pria-Junior, WD; Teixeira, DC; Miranda, VS; Ayres, AJ; Franco, CF; Costa, MG; He, C-X; Costa, PI; Hartung, JS. 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. *Plant Disease* 85: 501-505.
- Lopes, SA; Marcussi, S; Torres, SC; Souza, V; Fagan, C; Franca, SC; Fernandez, NG; Lopes, JR. 2003. Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil. *Plant Disease* 87: 544-549.
- Marques, LR; Ceri, H; Manfio, GP; Reid, DM; Olson, ME. 2002. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. *Plant Disease* 86: 633-638.
- McCoy, RE; Thomas, DL; Tsai, JH; French, WJ. 1978. Periwinkle wilt a new disease associated with xylem delimited rickettsia like bacteria transmitted by a sharpshooter. *Plant Disease Report* 62: 1022-1026.

- McGovern, RJ; Hopkins, DL. 1994. Association of *Xylella fastidiosa* with leaf scorch and decline live oak in Florida. *Plant Disease* 78: 924.
- McElrone, AJ; Forseth, IN. 2004. Photosynthetic responses of a temperate liana to *Xylella fastidiosa* infection and water stress. *Journal Phytopathology* 152: 9-20.
- Mehta, A; Leite Junior, RP; Rosato, YB. 2001. Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus in Brazil by PCR-RFLP of the 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer and rep-PCR fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 53-59.
- Mehta, A; Rosato, YB. 2001. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts, based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 311-318.
- Minsavage, GV; Thompson, CM; Hopkins, DL; Leite, RMVBC; Stall, RE. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-461.
- Mircetich, SM; Lowe, SK; Møller, WJ; Nylland, G. 1976. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology* 66: 17-24.
- Mizubuti, ESG; Matsuoka, K; Parizzi, P. 1994. Associação de Bacteria do tipo *Xylella* Em Laranjeiras com Síntomas da Clorose Variegada na Região da zona da Mata de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 19: 241-244.
- Moctezuma, E; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). México, DF, Mundi-Prensa. p. 1-37.
- Mollenhauer, HH; Hopkins DL. 1974. Ultrastructural study of Pierce's disease bacterium in grape xylem tissue. *Journal of Bacteriology* 119: 612-618.
- Moller, WJ; Sanborn, RR; Mircetich, SM; Williams, HE; Beutel, JA. 1974. A newly recognized leaf scorch disease in almond. *Plant Disease Report* 58: 99-101.
- Montero-Astúa, M; Saborío, G; Chacón, C; Garita, L; Villalobos, W; Moreira, L; Hartung, JS; Rivera, C. 2008. First report of *Xylella fastidiosa* in avocado in Costa Rica. *Plant Disease* 92: 175.
- Moreira, L; Villalobos, W; Rodríguez, CM; Rivera, C. 2002. Presencia de *Xylella fastidiosa* en algunas especies de Costa Rica. *In Resúmenes 42<sup>a</sup> Reunión de la Sociedad Americana de Fitopatología-División Caribe*. Guatemala 17-19 de junio. p. 75.

- Newman, K; Almeida, R; Alexander, P; Lindow, SE. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insect and plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 1737-1742.
- Nomé, SF; Haelterman, RM; Docampo, DM; Prata, AG; Di-Feo, L. 1992. Escaldadura de las hojas del almendro en Argentina. Fitopatologia Brasileira 17: 57-60.
- Nomé, SF; Raju, BC; Goheen, AC; Nyland, G; Docampo, D. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for pierce's disease bacteria in plant tissues. Phytopathology 70: 746-749.
- Oliveira, A; Vallim, M; Semighini, C; Araujo, W; Goldman, G; Machado, M. 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real time polymerase chain reaction assay. Phytopathology 92: 1048-1054.
- Olson, BR; Dominiak, J; Broembsen, S; Berg, M; Bextine, BR. 2006 First report of *Xylella fastidiosa* in Oklahoma. Plant Disease 90: 108.
- Osiro D; Colnago LA; Otoboni AMMB; Lemos EGM; de Souza AA; Filho HDC; Machado MA. 2004. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. FEMS Microbiology Letters 236: 313-318
- Pooler, M; Hartung, J. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Current Microbiology 31: 377-381.
- Purcell A.H., S.R. Saunders, M. Hendson, M. Grebus and M. Henry. 1999. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. Phytopathology 89: 53-58.
- Purcell, HA; Hopkins, DL. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 34: 131-151.
- Purcell, AH; Frazier, NW. 1985. Habitats and dispersal of the leafhopper vectors of Pierce's disease in the San Joaquin valley. Hilgardia 53: 1-32.
- Purcell, AH. 1980. Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vectors. Journal of Economic Entomology 73: 834-838.
- Purcell, AH; Finlay, A. 1979. Evidence for non-circulative transmission of pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. Phytopathology 69: 393-395.
- Qin, X; Miranda, VS; Machado, MA; Lemos, EG; Hartung, JS. 2001. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from disease citrus and coffee in Sao Paulo, Brazil. Phytopathology 91: 599-605.

- Raju, BC; Goheen, AC; Frazier, NW. 1983. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. *Phytopathology* 73: 1309-1313
- Raju, BC; Wells, JM; Nyland, G; Bransky, RH; Lowe, SK. 1982. Plum leaf scald: isolation, culture, and pathogenicity of the causal agent. *Phytopathology* 72: 1460-1466.
- Ramey, EB; Koutsoudis, M; Bodman, S; Fuqua, C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe association. *Current Opinion in Microbiology* 7: 602-609.
- Ribeiro, RV; Machado, EC; Oliveira, RF. 2004. Growth and leaf temperature effects on photosynthesis of sweet orange seedlings infected with *Xylella fastidiosa*. *Plant Pathology* 53: 334-340.
- Rodríguez, CM; Obando, JJ; Villalobos, W; Moreira, L; Rivera C. 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. *Plant Disease* 85: 1027.
- Rossetti, V; Gonzales, MA; Donadio, LC. 1998. History. In *Citrus variegated chlorosis*, Donadio, LC; Soares, C. eds. Bebedouro, Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. p. 1-18.
- Sanderlin, RS; Heyderich, KI. 2000. Evidence that *Xylella fastidiosa* can cause leaf scorch disease of pecan. *Plant Disease* 84: 1282-1286.
- Schaad, NW; Postnikova, E; Lacy, G; Fatm, MB; Chang, CJ. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp *multiplexi*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp *pauca*, subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 290-300.
- Sherald, JL. 1993. Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in American elm and failure of reciprocal transmission between strains from elm and sycamore. *Plant Disease* 77: 190-193.
- Sheradl, JL; Hearon SS; Kostka, SJ; Morgan, DL. 1983. Sycamore leaf scorch: culture and pathogenicity of fastidious-xylem limited bacteria from scorch-affected trees. *Plant Disease* 67: 849-852.
- Sherald, JL; Wells, JM; Hurtt; SS; Kostka, SJ. 1987. Association of fastidious xylem-inhabiting bacteria with leaf scorch in red maple. *Plant Disease* 71: 930-933.
- Simpson, AJS; Reinach, FC; Arruda, P; Abreu, FA; Acencio, M; Alvarenga, R; Alves, LMC; Araya, JE; Baia, GS; Baptista, CS; Barros, MH; Bonaccorsi, ED; Bordin, S; Bové, JM; Briones, MRS; Bueno, MRP; Camargo, AA; Camargo, LEA; Carrazo, DM; Carrer, H; Colauto, NB; Colombo, C; Costa, FF; Costa, MCR; Costa-Neto, CM; Coutinho, LL; Cristofani, M; Dias-Neto, E; Docena, C; El-Dorry, H; Facincani, AP; Ferreira, AJS; Ferreira, VCA; Ferro, JA; Fraga, JS; Franca SC; Franco, MC; Frohme, M;



- Furlan, LR; Garnier, M; Goldman, GH; Goldman, MHS; Gomes, SL; Gruber, A; Ho, PL; Hoheisel, JD; Junqueira, ML; Kemper, EL; Kitajima, JP; Krieger, JE; Kuramae, EE; Laigret, F; Lambais, MR; Leite, LCC; Lemos, EGM; Lemos, MVF; Lopes, SA; Lopes, CR; Machado, JA; Machado, MA; Madeira, AMBN; Madeira, HMF; Marino, CL; Marques, MV; Martins, EAL; Martins, EMF; Matsukuma, AY; Menck, CFM; Miracca, EC; Miyaki, CY; Monteiro-Vitorrello, CB; Moon, DH; Nagai, MA; Nascimento, ALTO; Netto, LES; Nhani-Junior, A; Nobrega, FG; Nunes, LR; Oliveira, MA; Oliveira, MC de; Oliveira, RC de; Palmieri, DA; Paris, A; Peixoto, BR; Pereira, GAG; Pereira Junior, HA; Pesquero, JB; Quaggio, RB; Roberto, PG; Rodrigues, V; Rosa, Aj de M; Rosa Junior, VE de; Sá, RG de; Santelli, RV; Kawasaki, HE; Silva, ACR da; Silva, AM da; Silva, FR da; Silva Junior, WA; Silveira, JF da; Silvestre, MLZ; Siueira, WJ; Souza, AA de; Souza, AP de; Terenzi, MF; Truffi, D; Tsai, SM; Tshako, MH; Vallada, H; Van Sluys, MA; Verjovski-Almeida, S; Vettore, AL; Zago, MA; Zatz, M; Meidanis, J; Setubal, JC. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406: 151-157.
- Timmer, LW; Brlansky, RH; Lee, RF; Raju, BC. 1983. A fastidious, xylem-limited bacterium infecting ragweed. *Phytopathology* 73: 975-979.
- Uchiababa, EY; Leite Junior, RP; Leite, RMVBC. 1992. Avalacao de meios de cultura gerais e especificos para cultivo de *Xylella fastidiosa* isolada de ameixera com escaldadura da folha. *Fitopatologia Brasileira* 17: 252-257.
- Wells, JM; Raju, BC; Hung, HY; Weisburg, WG; Mandelco-Paul, L; Brenner, DJ. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. nov: Gram negative, xylem limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 136-143.
- Wells, JM; Raju, BC; Nyland, G. 1983. Isolation, culture and pathogenicity of the bacterium causing phony peach disease of peach. *Phytopathology* 73: 859-862.
- Wells, JM; Raju, BC; Nyland, G; Lowe, SK. 1981a. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 357-363.
- Wells, JM; Raju, BC; Thomson, JM; Lowe, SK. 1981b. Evidence of the common etiology of phony peach and plum leaf scald disease. *Phytopathology* 71: 1156-1161.

## CAPÍTULO II

---

**Aislamiento e identificación de *Xylella fastidiosa* a partir de árboles de *Citrus sinensis* (L) Osb. en Costa Rica**

## **Aislamiento e identificación de *Xylella fastidiosa* a partir de árboles de *Citrus sinensis* (L) Osb. en Costa Rica**

### **Resumen**

De 35 árboles de *Citrus sinensis* L. (Osbeck), procedentes de ocho diferentes distritos de Costa Rica, que presentaron síntomas similares a los de la clorosis variegada de los cítricos, analizados por “double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay” (DAS-ELISA), solamente 21 árboles fueron positivos. A partir de cuatro de estos árboles se obtuvieron un total de seis aislamientos en medio sólido. En todos los aislados se observaron colonias de 0,1 a 0,7 mm de diámetro, blancas, opalescentes, cóncavas y con borde entero. Las células bacterianas mostraron las siguientes características: Gram negativas, catalasa positiva, oxidasa negativa y fueron positivas para *X. fastidiosa* al ser evaluadas por DAS-ELISA. Al analizar las células bacterianas por microscopía electrónica de transmisión, éstas presentaron forma de bacilo, pared celular rugosa y midieron 3,8  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se identificaron como *X. fastidiosa* mediante PCR, utilizando los imprimadores 272-1/272-2int y RST31/RST33. A pesar que todos los aislados fueron obtenidos a partir de plantas de cítricos, únicamente a partir de tres aislados de Grecia se logró amplificar una banda de 500 pb al utilizar los imprimadores 272-2int/CVC-1, diseñados para la detección de *X. fastidiosa* causante de clorosis variegada de los cítricos indicando que probablemente existan dos grupos de *X. fastidiosa* infectando cítricos en Costa Rica.

**Palabras clave:** Clorosis variegada de los cítricos, DAS-ELISA, PCR, microscopía electrónica de transmisión.

## II.1 Introducción

El género *Xylella* y la especie *Xylella fastidiosa* fueron descritos por Wells y colaboradores en 1987 como una bacteria Gram negativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, aerobia, con células en forma de bastón ó varilla que miden 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro y entre 1,5 y 4  $\mu\text{m}$  de longitud, con pared celular rugosa (Wells *et al.* 1987).

Actualmente, esta bacteria se considera una de las principales amenazas para la agricultura de América, por ser el agente causal de varias enfermedades que afectan cultivos de importancia económica y especies forestales (Beretta *et al.* 1996).

La clorosis variegada de los cítricos (CVC), causada por *X. fastidiosa*, se informó por primera vez, en 1987 en el estado de São Paulo en Brasil, principal país productor de cítricos del mundo (Rossetti *et al.* 1998). En el año 2003, las pérdidas causadas por CVC en Brasil se estimaron en más de 150 millones de dólares en el cultivo de la naranja dulce (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) (Coletta-Filho y Machado 2003). En Argentina también se informó la presencia de *X. fastidiosa* en la naranja dulce, asociada a la enfermedad conocida como "pecosita", la cual presenta síntomas similares a los de CVC (Brlansky *et al.* 1991).

Los síntomas causados por CVC se caracterizan por clorosis intervenal, semejante a una deficiencia de zinc, deformación de las hojas, muerte regresiva de la planta, frutos pequeños, duros, y muy ácidos, por lo que se vuelven inaceptables en el mercado y en la industria de jugos. Además, se observan pústulas necróticas marrón oscuro en el envés de las hojas (Rossetti *et al.* 1998).

En Costa Rica, recientemente se detectó *X. fastidiosa* en árboles de naranja dulce que sirven como cercas que delimitan linderos y como sombra en plantaciones de café, en las cuales se detectó la enfermedad conocida como crespada del café, causada también por *X. fastidiosa* (Rodríguez *et al.* 2001, Moreira *et al.* 2002, Aguilar *et al.* 2005). Estos árboles presentaron síntomas muy parecidos a los descritos para la CVC; sin embargo, las lesiones necróticas presentes comúnmente en el envés de las hojas en el Brasil, no siempre se observaron en Costa Rica (Rodríguez *et al.* 2001, Moreira *et al.* 2002, Aguilar *et al.* 2005). De no tomarse las medidas de control adecuadas para evitar su dispersión, *X. fastidiosa* representa una amenaza para el cultivo de naranja dulce en Costa Rica. En donde el año

2005, la producción de naranja dulce alcanzó 400.000 tm (Coronado 2005). El 10% del total de esta producción se destina al consumo interno fresco y el 90% restante se dirige al proceso agroindustrial de concentrado, el cual se exporta a países centroamericanos, Estados Unidos, Holanda y Gran Bretaña (Cockrell y Barrantes 1998, Coronado 2005). Además, la presencia de *X. fastidiosa* en árboles de *C. sinensis* representa un amenaza para muchos otros cultivos, ya que Li *et al.* (2001 y 2002) demostraron que aislamientos de la bacteria obtenidos de plantas de cítricos son patogénicos al ser inoculados en café. También aislamientos de cítricos y café fueron patogénicos en plantas de vid (Li *et al.* 2001 y 2002). En Brasil se aisló la bacteria a partir de árboles de cítricos asintomáticos. Los aislados se identificaron por la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usando diferentes pares de imprimadores. Los pares 272-1int/272-2int (Pooler y Hartung 1995) y RST31/RST33 (Minsavage *et al.* 1994) permiten amplificar ADN de *X. fastidiosa* aislada de diferentes hospederos. El tamaño de las bandas generadas es de 500 pb y 733 pb respectivamente. Los imprimadores 272-2/CVC-1, a diferencia de los anteriores permiten únicamente la amplificación específica del ADN de *X. fastidiosa* causante de CVC, y generan una banda de 500 pb (Pooler y Hartung 1995).

El objetivo de este trabajo fue aislar *X. fastidiosa* a partir de árboles de *C. sinensis* que presentan síntomas similares a CVC, y previamente identificados como positivos para la presencia de la bacteria por la técnica de DAS-ELISA; y posteriormente comprobar la identidad de los aislados mediante PCR utilizando tres diferentes pares de imprimadores.

## **II.2 Materiales y métodos**

### **II.2.A Recolección de muestras**

Se recolectó una rama bajera de 35 árboles de *C. sinensis* que presentaron síntomas similares a CVC (Figura 1), en diferentes distritos de las provincias de San José, Cartago y Alajuela de Costa Rica (Cuadro 1). Todas las muestras se recolectaron en cafetales o sus alrededores, donde previamente se había detectado *X. fastidiosa*.

### II.2.B Diagnóstico de *X. fastidiosa* por DAS –ELISA

De cada una de las ramas se tomaron seis hojas aleatoriamente, y se les cortó el peciolo y parte de la vena media. El tejido vascular se maceró con un macerador de rodillos, con 1 ml de solución amortiguadora de extracción general (fosfato de potasio 0,01 M, 0,85% de cloruro de sodio, sulfito de sodio 0,13%, PVP (polivinilpirrolidona) 2%, albúmina bovina 0,2%, Tween®-20 2%, pH 7.0). El macerado se analizó por la técnica de DAS-ELISA con anticuerpos específicos para *X. fastidiosa* (Reagent set SRP34501, Agdia Inc., Indiana, USA), según las instrucciones del fabricante. Las muestras se evaluaron por duplicado. Se utilizaron controles positivos comerciales y controles negativos de planta sana. Se consideraron positivas las muestras con una absorbancia a 490 nm mayor al promedio de los controles negativos más tres veces la desviación estándar de los mismos.



**Figura 1.** Hojas de árboles de *C. sinensis* mostrando diferentes síntomas causados por *X. fastidiosa*

### **II.2.C Muestreo para el aislamiento**

Una vez identificados los árboles positivos para la bacteria, se realizó un segundo muestreo y se recolectó únicamente una rama de todos los árboles positivos de cada zona, con excepción de los árboles de Curridabat, Alajuela Centro y uno de los árboles de Ujarrás de los cuales se tomaron seis, seis y cuatro ramas de un mismo árbol respectivamente; cada rama de un mismo árbol se consideró como una submuestra.

### **II.2.D Aislamiento de *X. fastidiosa***

Para el aislamiento se tomaron de una a cinco hojas de cada rama, y se les cortó el pecíolo y la vena media. En algunos casos los extremos de los pecíolos se sellaron con parafina. Todos los pecíolos se desinfectaron de 15 a 20 min con alcohol (70%) seguido de 15 a 20 min en cloro (1%). Para eliminar el cloro se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, los pecíolos se maceraron en 5 ml de medio PW ("periwinkle wilt medium") y se dejaron reposar durante 15 min, o se picaron en seco y maceraron en agua destilada estéril. A partir de ambos tipos de preparado se hicieron diluciones 1:100, 1:1,000 y 1:10,000. De cada dilución se tomaron alícuotas de 300 µl y se inocularon en tres ml de medio PW. Todos los medios inoculados se incubaron a 28 °C en oscuridad, durante 15 o 30 días. Los cultivos se evaluaron visualmente cada día, durante un período de 15 a 30 días. Cualquier crecimiento bacteriano observado antes de 5 días se consideró como contaminación y los medios se descartaron. Después de 15 o 30 días de la inoculación, se tomó una alícuota de 100 µl de cada medio líquido que no presentó contaminación y se analizó por DAS-ELISA. Como control negativo se utilizó medio sin inocular.

### **II.2.E Crecimiento y purificación de colonias en medio sólido**

A partir de los medios de cultivo, líquidos y positivos, con mayor valor de absorbancia por ELISA, se tomaron alícuotas de 100 µl y se inocularon en placas de medio PW sólido, las cuales se incubaron a 28 °C, durante 15 ó 30 días. A las colonias obtenidas, se les realizó tinción de Gram y las pruebas de oxidasa y catalasa. Además, se prepararon suspensiones de una colonia de cada placa, en 500 µl de agua destilada estéril. Cada una de las suspensiones se analizó por DAS-ELISA.

Finalmente de cada aislamiento se seleccionaron tres colonias, cada una de las cuales se subcultivó por separado en medio PW sólido. A partir de cada subcultivo se realizaron tres pasajes en intervalos de 15 o 20 días. El tercer pasaje se consideró como un clon purificado.

#### **II.2.F Observación de la morfología de la bacteria por microscopía electrónica de transmisión**

Se preparó una suspensión de la bacteria la cual se fijó en solución de Karnovsky (Karnovsky 1965) durante 48 h y postfijó en tetraóxido de osmio al 1%, durante 30 min. Luego las células se deshidrataron en un gradiente ascendente de etanol (50, 70, 75, 80, 90, 95 y dos veces a 100%), exponiéndolas durante 20 min. Luego las bacterias se embebieron en resina Spurr, y ésta se polimerizó a 65 °C, durante tres días. Posteriormente, se realizaron cortes entre 70 y 85 nm de grosor, se tiñeron con acetato de uranilo y plomo, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-7100).

#### **II.2.G Extracción de ADN**

A partir de cada clon purificado se extrajo ADN, utilizando el método de preparación de ADN genómico de bacterias descrito por Ausubel *et al.* (1990). Las células bacterianas (1,5 ml de cultivo) se precipitaron a 5,000 r.p.m. durante 2 min empleando una microcentrífuga. Las bacterias precipitadas se lisaron por incubación (1 h a 37 °C) con proteinasa K y SDS (sodio duodecil sulfato), a concentraciones finales de 100 µg/ml y 0,5%, respectivamente. Se agregó 100 µl de NaCl 5 M y seguidamente 80 µl de solución CTAB/NaCl “Hexadeciltrimetil amonium bromide” (CTAB) con la finalidad de acomplejar al CTAB las proteínas desnaturalizadas y polisacáridos de la pared celular. Posterior a la incubación por 10 min a 65 °C, los complejos CTAB/proteínas/polisacáridos se removieron con igual volumen (0,8 ml) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Seguidamente se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga y se precipitó el ADN con 0,6 vol. de isopropanol en frío. El ADN precipitado se lavó con etanol (70%). Luego de la eliminación del sobrenadante, el precipitado resultante se secó en un liofilizador, se resuspendió en 100 µl de amortiguador



TE (Tris-EDTA), se cuantificó y las soluciones de trabajo se prepararon a una concentración de 50 ng/μl.

### **II.2.H Amplificación de ADN por PCR**

El ADN obtenido a partir de cada uno de los clones se amplificó con tres pares de imprimadores, el 272-1/272-2int, 272-2int/CVC-1 y RTS-31/RST-33, para lo cual se utilizaron los protocolos de preparación de reacciones y ciclos de amplificación descritos por Pooler y Hartung (1995) y Minsavage *et al.* (1994), respectivamente. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1% en TAE 1X, a 70 V. Las bandas obtenidas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Como referencia para determinar el tamaño de las bandas obtenidas se utilizó una escalera de 100 pb (Fermentas® Alemania).

## **II.3 Resultados**

### **II.3.A Diagnóstico de *Xylella fastidiosa* en el material vegetal**

Por medio de la técnica de DAS-ELISA se confirmó *X. fastidiosa* en el tejido de 21 de los 35 árboles (60 %) recolectados en las diferentes localidades de Costa Rica. Ninguna de las muestras de los árboles procedentes de San Gabriel fue positiva para la bacteria, a pesar de que mostraron síntomas similares a CVC (Cuadro 1).

### **II.3.B Aislamiento de *X. fastidiosa***

El 60% del total de los tubos inoculados (158/264) no presentó contaminación (Cuadro 2). Al evaluar por DAS-ELISA los tubos sin contaminación, únicamente el 10% (16/158) fue positivo para la bacteria, y mostraron absorbancias a 490 nm entre 0.1-3 nm (Cuadro 2 y 3). El 40% del total de tubos inoculados (106/264) presentó contaminación (crecimiento obtenido entre el primer y quinto días posterior a la inoculación) por bacterias y hongos, y se observó alta turbidez en el medio y cambio de color de amarillo a rojo intenso, después del segundo día de incubación (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Número de árboles positivos para *Xylella fastidiosa* del total analizados por DAS ELISA procedentes de las diferentes localidades de Costa Rica

Provincia	Localidad		Número de árboles evaluados	Número de árboles positivos	Número de árboles positivos de los cuales se aisló la bacteria
	Cantón	Distrito			
Cartago	Paraiso	Paraiso	2	2	0
San José	Aserri	San Gabriel	2	0	0
San José	Desamparados	Frailes	7	7	2
Alajuela	Grecia	Grecia	5	5	1
Alajuela	Alajuela	Alajuela	1	1	1
Alajuela	Alajuela	Garita	4	1	0
San José	Aserri	Vuelta de Jorco	13	4	0
San José	Curridabat	Curridabat	1	1	0
<b>Total</b>			35	21/35 (60%)	4/21 (19%)

**Cuadro 2.** Número de tubos inoculados, contaminados, evaluados y positivos para la presencia de *X. fastidiosa*, en cada uno de los intentos de aislamiento

Procedencia de la muestra	Mes en que se realizó el muestreo	Tubos inoculados	Tubos contaminados	Tubos evaluados por DAS-ELISA	Tubos positivos
Paraiso	Noviembre	40	15	25	0
Frailes	Diciembre	28	9	19	4
Grecia	Mayo	20	9	11	3
Paraiso	Agosto	16	11	5	3
Alajuela	Julio	54	10	44	3
Garita	Enero	40	22	18	1
Vuelta de Jorco	Febrero	30	23	7	2
Curridabat	Marzo	36	7	29	0
<b>Total</b>		<b>264</b>	<b>106</b>	<b>158</b>	<b>16</b>
<b>Porcentaje</b>			<b>40%</b>	<b>60%</b>	<b>10%</b>

Del total de tubos positivos por ELISA se seleccionaron 11, los cuales mostraron las absorbancias más altas (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Absorbancia de los tubos positivos en cada uno de los aislamientos obtenidos

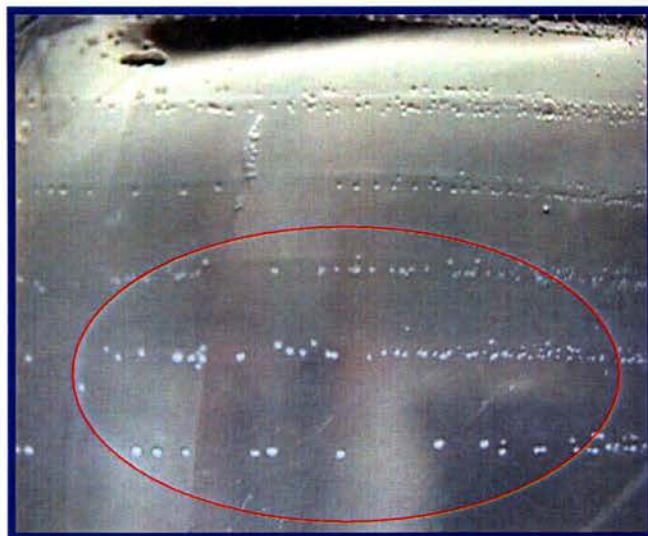
Procedencia de las muestras	Tubo <sup>1</sup>	Absorbancia a 490 nm	Valor promedio de los controles negativos
Frailes	1-A	0,1465	0,023
	1-C <sup>+</sup>	0,3325	0,023
	5-A	0,114	0,023
	5-C <sup>+</sup>	3,659	0,023
Grecia	3-A	0,3495	0,103
	3-B <sup>+</sup>	0,7175	0,103
	3-C	0,5245	0,103
Paraíso	3-A <sup>+</sup>	0,155	0,043
	3-B <sup>+</sup>	0,1605	0,043
	3-C <sup>+</sup>	0,153	0,043
Alajuela	Sm1-10 <sup>2</sup> -C <sup>+</sup>	3,636	0,036
	Sm2-10 <sup>2</sup> -A <sup>+</sup>	3,706	0,036
	Sm4-10 <sup>2</sup> -B <sup>+</sup>	3,738	0,036
Garita	Sm2-10 <sup>3</sup> -B <sup>+</sup>	0,1855	0,032
Vuelta de Jorco	4-10 <sup>3</sup> -A	0,210	0,0265
	4-10 <sup>2</sup> -B <sup>+</sup>	0,473	0,0265

<sup>1</sup> El primer número corresponde al de la muestra o submuestra (Sm), la letra corresponde al tubo (repetición) inoculado con extracto de una muestra. En el caso de los intentos donde se inocularon diluciones, esta se indica después del número de muestra o submuestra.

<sup>+</sup> Tubos seleccionados a partir de los cuales se realizó inoculaciones en medio sólido.

### II.3.C Crecimiento y purificación de colonias en medio sólido

Colonias abundantes se obtuvieron únicamente a partir de los tubos de Frailes, Grecia y Alajuela; éstas eran blancas, opalescentes, con borde entero, convexas y lisas (Figura 2). Se observaron diferencias en el diámetro y tiempo de crecimiento entre las colonias de Frailes y Alajuela, las cuales presentaron un diámetro entre 0,1-0,5 mm y un tiempo de crecimiento de 15 días, mientras que las de Grecia tenían un diámetro entre 0,4-0,7 mm y un tiempo de crecimiento de 30 días. Las células bacterianas fueron Gram negativas, catalasa positiva, oxidasa negativa y fueron positivas para *X. fastidiosa* al ser evaluadas por DAS-ELISA.



**Figura 2.** Colonias de *X. fastidiosa* aisladas a partir de árboles de *C. sinensis* en medio PW sólido.

En total se obtuvieron seis aislamientos. A partir de cada aislamiento se subcultivaron tres colonias, cada una de las cuales se consideró como un clon, el cual fue purificado realizando tres pasajes de subcultivo. El total de clones obtenido fue de 18 (Cuadro 4).

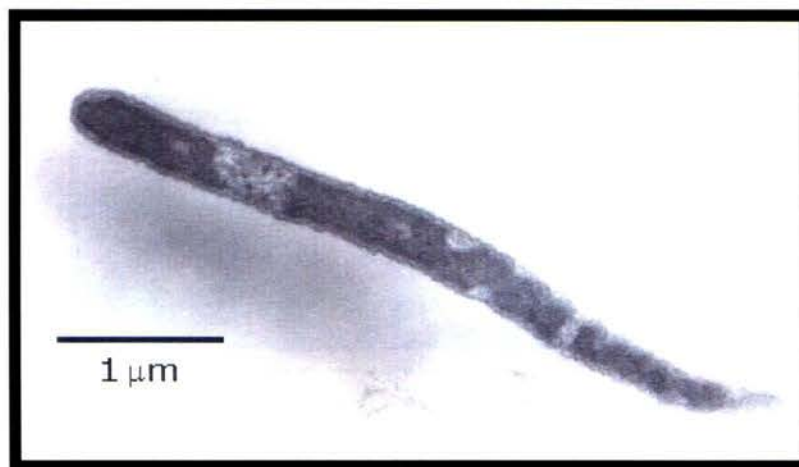
**Cuadro 4.** Total de clones de *X. fastidiosa* purificados, obtenidos a partir de árboles de *C. sinensis* procedentes de diferentes localidades de Costa Rica

Identificación asignada a cada uno de los tres clones por aislamiento	Procedencia
CR-Xf-C.s.: *-Ic1 **, -Ic2, -Ic3	Frailles
CR-Xf-C.s.: -IIc1, -IIc2, -IIc3	Frailles
CR-Xf-C.s.: -IIIc1, -IIIc2, -IIIc3	Grecia
CR-Xf-C.s.: -IVc1, -IVc2, -IVc3	Alajuela
CR-Xf-C.s.: -Vc1, -Vc2, -Vc3	
CR-Xf-C.s.: -VIc1, -VIc2, -VIc3	

\* CR: Costa Rica, Xf: *X. fastidiosa*, C.s: *Citrus sinensis*, \*\*I: número de aislamiento, c1: clon 1.

### II.3.D Microscopia electrónica de transmisión

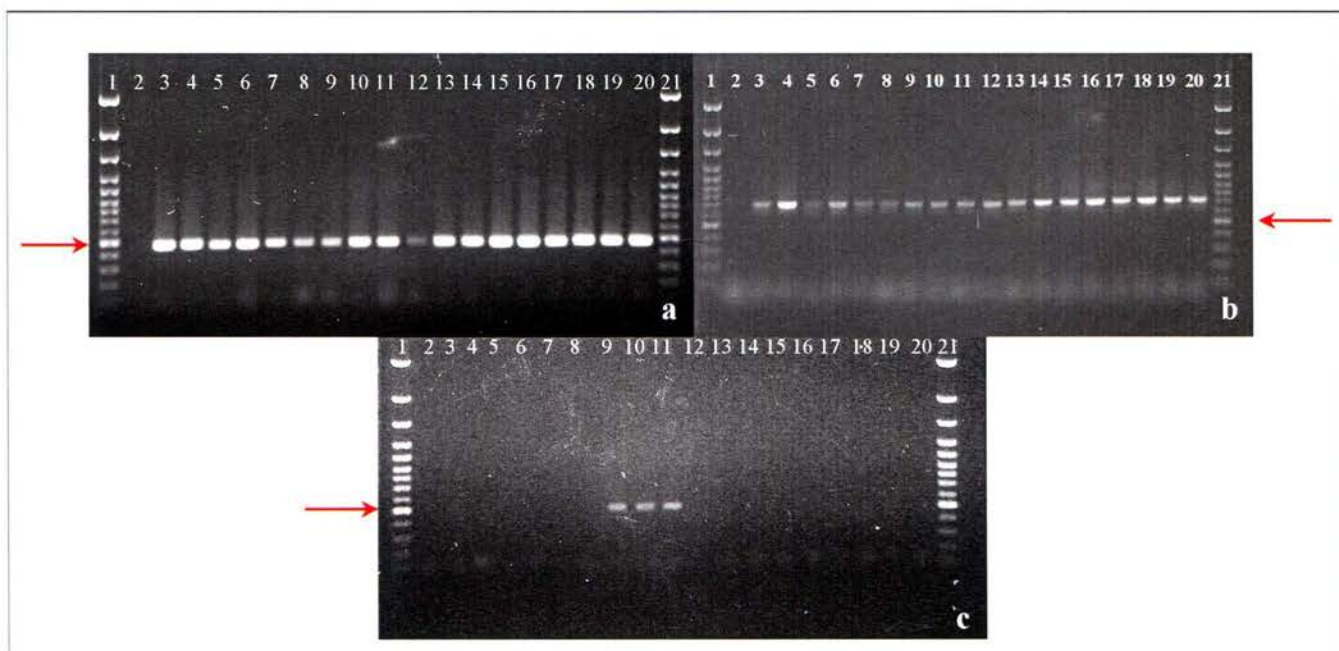
Al microscopio electrónico de transmisión se observaron células en forma de bacilo que midieron aproximadamente 3,8  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales se caracterizaron por poseer pared celular rugosa (Figura 3).



**Figura 3.** Micrografía de célula de *X. fastidiosa* con forma de bacilo y pared celular rugosa aislada de tejido vegetal sintomático

### II.3.E Extracción de ADN y análisis por PCR

La extracción de ADN de los diferentes clones bacterianos fue eficiente. ADN de los 18 clones de la bacteria amplificaron bandas de 500 pb y 733 pb con los imprimadores 272-1int/272-2int y los RST31/RST33 respectivamente (Figuras 4a y b). Al amplificar el ADN de todos los clones aislados de cítricos con los imprimadores 272-2int/CVC-1, específicos para *X. fastidiosa* causante de CVC, únicamente se observó amplificación de una banda de 500 pb en los clones procedentes de Grecia (CR-Xf-C.s.: -IIIc1, IIIc2 y IIIc3) (Figura 4c).



**Figura 4.** Geles de agarosa donde se muestran los diferentes productos de amplificación obtenidos con cada uno de los pares de imprimadores. **a-** 272-1int/272-2int, **b-** RST-31/RST-33, **c-** CVC-1/272-2int. El orden de las muestras en todos los geles es líneas 1 y 21 escalera de 100 pb, 2-control negativo, 3 a 5-CR-Xf-C.s.Ic1, c2 y c3 respectivamente; 6 a 8-CR-Xf-C.s.IIc1, c2 y c3 respectivamente; 9 a 11-CR-Xf-C.s.IIIc1, c2 y c3 respectivamente, 12 a 14 - CR-Xf-C.s.IVc1, c2 y c3 respectivamente, 15 a 17- CR-Xf-C.s.Vc1, c2 y c3; respectivamente, 18 a 20- CR-Xf-C.s.VIc1, c2 y c3 respectivamente. Las flechas indican banda de 500 pb de la escalera.

## II.4 Discusión

La detección de *X. fastidiosa* por DAS-ELISA en el tejido de árboles de *C. sinensis*, el posterior aislamiento de la bacteria a partir de estos árboles, así como los resultados de los análisis de PCR, permiten confirmar la presencia de dicha bacteria en *C. sinensis* en Costa Rica. Hasta la fecha la bacteria también se detectó en plantas de vid, café y otras especies arbóreas como eucalipto, macadamia, cas y cedro amargo (Rodríguez *et al.* 2001, Moreira *et al.* 2002).

En el presente estudio *X. fastidiosa* se detectó mediante DAS-ELISA en el 60% de los árboles de *C. sinensis* que presentaron síntomas similares a CVC y que se encontraron aledaños o dentro de plantaciones de café con la enfermedad conocida como crespesa del

café, enfermedad causada también por *X. fastidiosa* (Rodríguez *et al.* 2001). En el 40% de los árboles restantes, a pesar de que mostraban síntomas de clorosis, similares a los de CVC, no se detectó la bacteria. Probablemente la concentración de la bacteria en estas muestras fue muy baja, por lo que no pudo ser detectada por la metodología empleada. En estudios realizados por Nomé *et al.* (1980) y Raju *et al.* (1983) se determinó que la bacteria puede ser detectada en tejido vegetal por ELISA sólo cuando ésta se encuentra en concentraciones de  $10^5$  células por mililitro. Por otra parte, Minsavage *et al.* (1994), al realizar diluciones de suspensiones de *X. fastidiosa* y posteriormente adicionarlas a extractos de pecíolos de cítricos y vid, observaron que la bacteria se detectó por ELISA sólo si se encontraba en un ámbito de concentración de  $2 \times 10^4$  o  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (cfu) por mililitro. Adicionalmente, Raju *et al.* (1983), en estudios realizados con muestras de zarzamora (*Rubus procerus*) y “periwinkle” (*Catharanthus roseus*) observaron que la bacteria no se detecta en las plantas durante todo el año. En plantas de vid durante la primavera no se detecta la bacteria en las hojas jóvenes, ya que estaban libres de la bacteria (Raju *et al.* 1983). Esto sugiere que una mala selección del tejido de muestra puede resultar en que no se detecte la bacteria. En última instancia, la clorosis observada en los árboles donde no se detectó la bacteria pudo deberse a otras causas no determinadas en este estudio.

A pesar de que 21 árboles fueron positivos para la presencia de la bacteria, solo a partir de 4 de ellos (19%) fue posible aislar y purificar la bacteria en medio sólido. Estos cuatro árboles fueron los que mostraron mayores absorbancias al ser evaluados por DAS-ELISA. En el caso Curridabat, que sí mostró alta absorbancia, no fue posible aislar la bacteria, lo que puede ser debido a que la distribución de la bacteria en el tejido no fue homogénea como se informa en varios de los estudios realizados sobre este patógeno (Nomé *et al.* 1980, He *et al.* 2000). Chagas *et al.* (1992) también atribuyeron a la distribución errática el no haber logrado observar la bacteria mediante microscopía electrónica en segmentos de tejido de árboles de naranja dulce, aún cuando éstos presentaban síntomas severos de CVC. Por otro lado en un estudio realizado por Nomé *et al.* (1980), al evaluar doce árboles de almendro (*Prunus amygdalus*) inoculados con *X. fastidiosa*, que presentaban síntomas severos de escaldadura de la hoja del almendro (ALS por sus siglas en inglés), únicamente

en once de las plantas fue posible detectar la bacteria por DAS-ELISA, concluyendo que esto se debió a que la bacteria no estaba distribuida uniformemente a través del tejido.

Uno de los factores limitantes en el aislamiento de *X. fastidiosa* es la contaminación, la bacteria crece muy lentamente en el medio de cultivo permitiendo que microorganismos de rápido crecimiento contaminen frecuentemente los cultivos (Purcell y Hopkins 1996, Buzkan *et al.* 2005).

En este estudio se observó 40% de contaminación causada por la presencia de otras bacterias y en algunos casos también se observó crecimiento de hongos. El crecimiento de estos contaminantes obligó a descartar muchos de los tubos inoculados, reduciendo la probabilidad de obtener aislamientos de *X. fastidiosa*.

Los medios líquidos con absorbancias bajas no se utilizaron como inóculos en el medio sólido, debido a que en investigaciones sobre métodos de cultivo de *X. fastidiosa* se observó que la bacteria crece de manera rápida y con fases lag cortas cuando un alto número de células es utilizado como inóculo (Campanharo *et al.* 2003). Sin embargo, cuando el inóculo contiene un bajo número de células, la fase lag es muy larga. Esto sugiere que probablemente en el crecimiento de la bacteria intervenga un sistema de sensibilidad al número de células (Campanharo *et al.* 2003).

Todos los aislados obtenidos presentaron características de cultivo similares a las descritas para *X. fastidiosa* (Wells *et al.* 1987). Además, estos aislados reaccionaron positivamente al ser analizados por DAS-ELISA con anticuerpos específicos para la detección de la bacteria.

En este estudio fue posible observar diferencias en el tamaño de las colonias y en el tiempo de crecimiento de los aislamientos de Grecia con respecto a los logrados de los otros lugares. Varios investigadores observaron que existen diferencias en el crecimiento, tamaño de las colonias y requerimientos nutricionales entre aislamientos de *X. fastidiosa* procedentes de la misma planta hospedera, así como entre aislamientos procedentes de diferentes hospederos (Fry *et al.* 1990, Uchiababa *et al.* 1992, Chang y Donaldson 1993, Campanharo *et al.* 2003, Lemos *et al.* 2003, Almeida *et al.* 2004). Fry *et al.* (1990) informaron que un aislado de *X. fastidiosa* obtenido de vid mostró crecimiento más lento en



agar nutriente suplementado con sacarosa, con respecto a otro obtenido del mismo hospedero.

Observaciones mediante microscopía electrónica permitieron corroborar que la morfología de la bacteria (Figura. 3) es similar a la descrita por Mollenhauer y Hopkins (1974). Estas similitudes incluyen la pared celular rugosa y el tamaño de las células bacterianas. Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en este estudio (catalasa positiva y oxidasa negativa) son similares a los obtenidos por Wells *et al.* (1987) al describir el género *Xylella* y la especie *Xylella fastidiosa*.

Mediante PCR fue posible confirmar la identidad de todos los aislamientos a nivel molecular. Los imprimadores 272-1int/272-2int y los RST-31/ RST-33, diseñados para la detección de *X. fastidiosa* aislada de distintos hospederos (Minsavage *et al.* 1994, Pooler y Hartung 1995), se utilizaron con éxito en este estudio, ya que se logró la amplificación de bandas de 500 pb y 733 pb, respectivamente, a partir de todos los aislados (Figura 4). Estos tamaños son concordantes con lo informado en la literatura para *X. fastidiosa* (Minsavage *et al.* 1994, Pooler y Hartung 1995).

A pesar de que todos los aislados se obtuvieron a partir de plantas de cítricos, solo se logró amplificar una banda de 500 pb al utilizar los imprimadores 272-2int/CVC-1 a partir de tres clones aislados de una muestra de Grecia (Figura 4c), diseñados para la detección específica de *X. fastidiosa* aislada de cítricos y causante de CVC. En este caso, el tamaño de la banda es también concordante con lo informado por Pooler y Hartung (1995). Este resultado sugiere que es probable que existan al menos dos cepas diferentes de *X. fastidiosa* infectando árboles de *C. sinensis* en Costa Rica. Estas diferencias en la población de la bacteria pueden ser el resultado de factores como cambios genéticos (mutaciones y/o recombinaciones), migración de un área geográfica a otra y presión de selección del hospedero (Coletta-Filho y Machado 2002). El siguiente paso será determinar cuál es el origen de estas diferencias, estableciendo relaciones genéticas entre los aislamientos obtenidos de cítricos y de otros hospederos en Costa Rica.

El hecho de encontrar la bacteria infectando árboles de cítricos en las diferentes zonas donde se realizó este estudio, y además en zonas donde se encuentran las grandes plantaciones de cítricos de Costa Rica sugiere que deben de establecerse prácticas de

manejo dirigidas a evitar pérdidas como las que se han dado en Brasil a causa de esta enfermedad.

Este es el primer estudio completo que permite establecer la presencia de *X. fastidiosa* en árboles de *C. sinensis* en América Central.

## II.5 Literatura citada

- Aguilar, E; Villalobos, W; Moreira, L; Rodriguez, CM; Kitajima, EW; Rivera, C. 2005. First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica. *Plant Disease* 89: 687.
- Almeida, RP; Mann, R; Purcell, AH. 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. *Current Microbiology* 48: 368-372.
- Ausubel, FM; Brent, R; Kingston, RE; Moore, DD; Seidman, JG; Smith, JA; Struhl, K. 1990. *Current protocols in molecular biology*. New York, Wiley & Sons. p.2.4.1-2.4.5.
- Beretta, MJG; Harakava, R; Chagas, CM; Derrick, KS; Barthe, GA; Ceccardi, TL; Lee, RF; Paradela, O; Sugimori, M; Ribeiro, IA. 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in coffee. *Plant Disease* 80: 821.
- Brlansky, RH; Davis, CL; Timmer, LW; Howd, DS; Contreras, J. 1991. Xylem-limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis. *Phytopathology* 81: 1210.
- Buzkan, N; Kocsis, L; Walker, LA. 2005. Detection of *Xylella fastidiosa* from resistant and susceptible grapevine by tissue sectioning and membrane entrapment immunofluorescence. *Microbiological Research* 160: 225-231.
- Campanharo, JC; Lemos, MV; Lemos, EG. 2003. Growth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Opinion Microbiology* 46: 99-102.
- Chagas, MC; Rossetti, V; Beretta, M. 1992. Electron microscopy studies of a xylem limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *Journal of Phytopathology* 134: 306-312.
- Chang, CJ; Donaldson, RC. 1993. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. *Phytopathology* 83: 192-194.
- Cockrell, MB; Barrantes, ES. 1998. *Cítricos fruticultura especial*. EUNED, San José, Costa Rica. 98p.
- Coletta-Filho, HD; Machado, MA. 2003. Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo State, Brazil. *Phytopathology* 93: 28-34.
- Coletta-Filho, HD; Machado, MA. 2002. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3731-3736.
- Coronado, MA. 2005. Memoria curso sobre producción y comercialización de la naranja *Citrus sinensis*. Guanacaste, Costa Rica. 30p.

- Fry, SM; Milholland, RD; Huang, PY. 1990. Isolation and growth of strains of *Xylella fastidiosa* from infected grapevines on nutrient agar media. *Plant Disease* 74: 522-524.
- He, CX; Li, WB; Ayres, AJ; Hartung, JS; Miranda, VS; Teixeira, DC. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease* 84: 622-626.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electro microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- Lemos, EG; Alves, LM; Campanharo, JC. 2003. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiology* 219:39-45.
- Li, W-B; Zhou, C-H; Pria-Junior, WD; Teixeira, DC; Miranda, VS; Pereira, EO; Ayres, AJ; He, C-X; Costa, PI; Hartung, JS. 2002. Citrus and coffee strains of *Xylella fastidiosa* induce Pierce's disease in grape vine. *Plant Disease* 86: 1206-1210.
- Li, W-B; Pria-Junior, WD; Teixeira, DC; Miranda, VS; Ayres, AJ; Franco, CF; Costa, MG; He, C-X; Costa, PI; Hartung, JS. 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. *Plant Disease* 85: 501-505.
- Minsavage, GV; Thompson, CM; Hopkins, DL; Leite, RMVBC; Stall, RE. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-461.
- Mollenhauer, HH; Hopkins DL. 1974. Ultrastructural study of Pierce's disease bacterium in grape xylem tissue. *Journal of Bacteriology* 119: 612-618.
- Moreira, L; Villalobos, W; Rodríguez, CM; Rivera, C. 2002. Presencia de *Xylella fastidiosa* en algunas especies de Costa Rica. *In Resúmenes 42<sup>a</sup> Reunión de la Sociedad Americana de Fitopatología-División Caribe*. Guatemala 17-19 de junio. p. 75.
- Nomé, SF; Raju, BC; Goheen, AC; Nyland, G; Docampo, D. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. *Phytopathology* 70: 746-749.
- Pooler, M; Hartung, J. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31:377-381.
- Purcell, HA; Hopkins, DL. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review OF Phytopathology* 34: 131-151.
- Raju, BC; Goheen, AC; Frazier, NW. 1983. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. *Phytopathology* 73: 1309-1313.

- Rodríguez, CM; Obando, JJ; Villalobos, W; Moreira, L; Rivera C. 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. Plant Disease 85: 1027.
- Rossetti, V; Gonzales, MA; Donadio, LC. 1998. History. In Citrus variegated chlorosis, Donadio, LC Soares, C. eds. Bebedouro, Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. p. 1-18.
- Uchiababa, EY; Leite Junior, RP; Leite, RMVBC. 1992. Avaliação de meios de cultura gerais e específicos para cultivo de *Xylella fastidiosa* isolada de ameixera com escaldadura da folha. Fitopatologia Brasileira 17: 252-257.
- Wells, JM; Raju, BC; Hung, HY; Weisburg, WG; Mandelco-Paul, L; Brenner, DJ. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. International Journal of Systematic Bacteriology 37: 136-143.

### CAPÍTULO III

---

**Confirmation of *Xylella fastidiosa* infecting grapevine (*Vitis vinifera*) in Costa Rica.**

## **Confirmation of *Xylella fastidiosa* infecting grapevine (*Vitis vinifera*) in Costa Rica.**

### **Abstract**

In 2003, symptoms of PD (Pierce's disease) were observed in two vineyards established in two different localities in the province of San Jose (Santa Ana and La Uruca) and in another vineyard in La Garita, province of Alajuela, Costa Rica. 24 symptomatic plants (15 from Santa Ana, five from La Uruca and four from La Garita) were analyzed by DAS-ELISA using antibodies against *Xylella fastidiosa* and the procedures from AGDIA Inc. Indiana, USA. 16 plants (nine from Santa Ana, five from La Uruca, and two from La Garita) tested positive for the bacterium. There were different attempts of isolation made with petioles of these plants, and seven isolates were obtained in liquid PW (periwinkle wilt medium). Aliquots of liquid media were inoculated with solid PW. Ten days after inoculation, circular and convex colonies, with full margin, smooth and opalescent, 0.5-1 mm in diameter were observed. From each isolate three colonies were selected and considered as different clones. Every clone was analyzed with DAS-ELISA with positive values. Clones were gram-negative, catalase-positive and oxidase-negative. The bacteria were rod shaped, and showed a typically rippled cell wall under electron microscopy. DNA of each clone was isolated and used as template in PCR with primers 272-1int/272-2int and RST31/RST33; products of 500 pb and 733 pb were obtained, respectively. These results confirmed the presence of PD caused by *X. fastidiosa* in grapevine plants in different vineyards in Costa Rica.

**Key words:** DAS-ELISA, isolation, PCR, electron microscopy, Pierce's disease.

### III.1 Introduction

Pierce Disease (PD) is an important problem in most grape-growing regions of the United States, mainly in the Gulf Coastal Plains and California (Goheen *et al.* 1979).

The first report of PD was provided by Newton Pierce in 1892 in Santa Ana River Valley, Southern California (Pierce 1892 cited by Goheen *et al.* 1973). For several decades the etiological agent of PD was considered a virus, because it could be transmitted from diseased to healthy grapevines by means of grafting and several homopterous insects (Hopkins & Mollenhauer 1973, Davis *et al.* 1978, Wells *et al.* 1987). However, the successful suppression of the development of symptoms with tetracycline antibiotic, in 1970, and the observation by electron microscopy of a xylem bacterium in symptomatic plants indicated that the causal agent was not a virus (Hopkins & Mollenhauer 1973, Mollenhauer & Hopkins 1974).

In 1978, Davis *et al.* reported the consistent culture of a gram-negative, catalase-positive bacterium, from petioles of grapevine plants with PD, in special culture media. The isolate pathogenicity was tested by the inoculation of green stem cuttings of grapevine varieties. Typical PD symptoms developed in 86% of the inoculated cuttings after 2 to 4 months (Davis *et al.* 1978). After isolation, this pathogenic bacterium was referenced as a fastidious xylem-limited bacterium (FXLB) (Hopkins 1989). In 1984, Wells *et al.* proposed the name *Xylella fastidiosa* to establish a new genus with one species to include all of FXLBs.

The symptoms of PD include a decline in plant vigor, marginal necrosis of the leaves, wilting and drying of the fruit (Hopkins 1981).

PD was reported in Mexico and Venezuela also, and outside the Americas in Kosovo, Balkans (Goheen *et al.* 1979, Hernández & Corona *et al.* 1994, Hernández & Corona 1997, Berisha *et al.* 1998).

Goheen *et al.* (1979) isolated the bacterium in JD-3 media from leaves petioles of grapevine plants showing PD symptoms, collected in Montezuma, Puntarenas, province in Costa Rica, and reported PD for the first time in Central America. Jiménez (1980) confirmed this report. Symptomatic plant samples were collected from vineyards located in the provinces of Guanacaste, Alajuela, Puntarenas and Cartago. The PD bacterium was



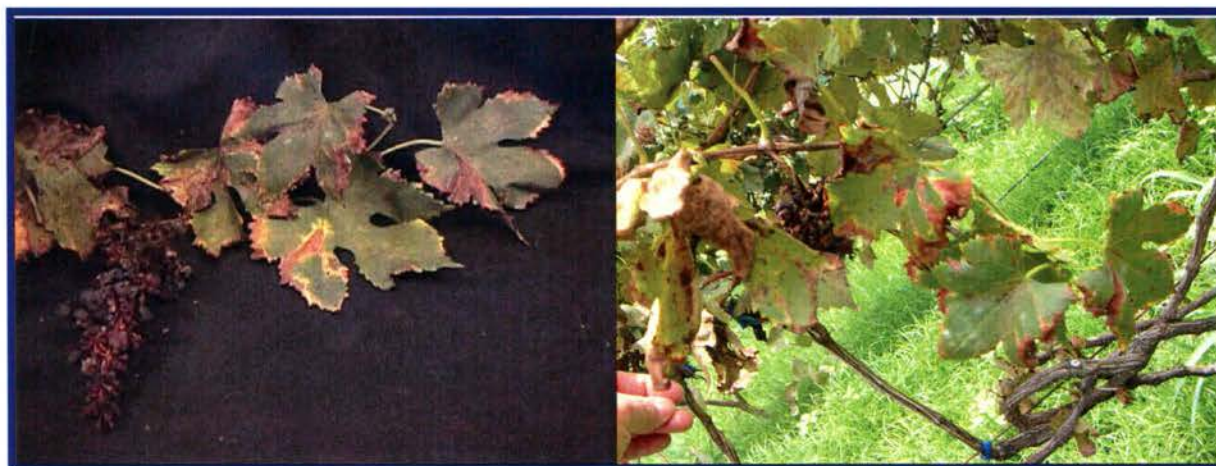
isolated only from Puntarenas samples, but the presence of the bacterium in other Costa Rican provinces was not discarded.

Between 1982 and 1983 other studies reported different bacterium host plant species and insect vectors in the same four Costa Rican provinces (Mora 1982, Barrantes 1983). During the last three years, symptoms similar to PD were observed in vineyards located in Santa Ana, La Uruca (San José) and La Garita (Alajuela). The objective of this work was to confirm the presence of *X. fastidiosa* in grapevine by determining the morphological and biochemical characteristics of colony and bacterium, by ELISA and PCR.

### III.2 Materials and methods

#### III.2.A Collection of plant samples and DAS-ELISA test

Five leaves showing symptoms similar to PD (Figure 1) were collected from grapevine plants located in Santa Ana, La Uruca and La Garita. Leaf samples were placed into plastic bags, stored on ice and transported to the laboratory. Five leaf petioles of each plant were ground in 1 ml of general extraction solution (0,13% sodium sulfite, 2% polyvinylpyrrolidone, 0,02% sodium azide, 0,2% powdered chicken egg albumin, grade II, 2% Tween 20<sup>®</sup>). The extracts were tested for *X. fastidiosa* by DAS-ELISA using a reagent set according to the manufacturer's instructions (Agdia, Inc., Elkhart, IN). A positive reaction was determined to be greater than the means of the absorbance at 490 nm of the negative controls, plus three times their standard deviation.



**Figure 1.** Symptoms of Pierce's Disease on leaves

### **III.2.B *Bacterium Isolation***

From each sample of Santa Ana, La Uruca and La Garita, one, two and four petioles were cut for isolation, respectively. Each end of the petiole was sealed with paraffin and the surface sterilized in 70% ethanol for five to seven minutes, then in 1% sodium hypochlorite for 5 to 7 minutes, followed by three 5-minute washes in sterile water. The petioles of Santa Ana and La Uruca were aseptically cut into 3 to 6 ml of PW broth (Davis *et al.* 1978), and shaken for 15 minutes to release the bacteria from xylem. Suspension aliquots of 300 µl were inoculated by triplicate in liquid PW and liquid SPW (supplemented periwinkle wilt media) media. Dilutions of the suspension ( $10^1$  - $10^4$ ) were made in sterile distilled water; 300 µl aliquots of each dilution were inoculated by triplicate in each media. In the case of samples from La Uruca, only liquid PW media was employed for isolation.

Petioles from La Garita, Alajuela, were cut and ground in 1ml of distilled water and dilutions ( $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) of this suspension were made. 300 µl aliquots of each dilution were inoculated by triplicate in liquid PW media. All cultures were incubated in the dark at 28 °C under static conditions. After 15 days, PW broths were tested by DAS-ELISA and only those testing positive for *X. fastidiosa* were used in the isolation procedure. Solid PW broth was inoculated with 100 µl aliquots of liquid PW broth. Plates were incubated at 28 °C and observed for bacterial colony growth during 12 days.

### **III.2.C *Colonies morphology and biochemical characteristics***

The obtained colonies were tested by Gram staining, catalase and oxidase activity. Colonies suspensions were also tested by DAS-ELISA. Three single colonies from each ELISA positive culture were selected and subcultured three times on solid PW. The last subculture was considered a purified clone. Contaminated liquid media showing appreciable degree of turbidity was not tested by DAS-ELISA.

### **III.2.D *Bacterium morphology by transmission electron microscopy (TEM)***

Bacterial suspensions were prepared and fixed in Karnovsky solution (Karnovsky 1965) during 48 h and post-fixed in 1% osmium tetroxide during 30 min. The cells were dehydrated in an ethanol series, finally embedded in Spurr's medium and polymerized

during three days. Ultra-thin sections (60-80 nm) were cut with a diamond knife in an ultramicrotome Leica ultracut (Vienna, Austria). Specimens were stained with uranyl acetate and lead citrate solution (Reynolds 1963), and observed with a Hitachi H-7100 electron microscope.

### III.2.E DNA extraction and PCR

DNA from each purified clone was extracted using the method for preparing genomic DNA from bacteria (Ausubel *et al.* 1990). Specific PCR detection of *X. fastidiosa* was performed with primers 272-1-int/272-2-int and RST31/RST33 using conditions described elsewhere (Minsavage *et al.* 1994, Pooler & Hartung 1995). The amplification products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining under UV light.

## III.3 Results

### III.3.A DAS-ELISA of collected plant samples

*X. fastidiosa* was confirmed by DAS-ELISA, in sixteen samples collected in different vineyards, located in different regions of Costa Rica (Table 1). The positive samples were used to isolate the bacteria.

**Table 1.** Number of *X. fastidiosa* positive samples from the total evaluated by DAS-ELISA

Locality	Number of samples evaluated	Number of positives samples
Santa Ana	15	9
La Uruca	5	5
La Garita	4	2
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>16 (66%)</b>

### III.3.B *Bacteria isolation and purification*

Bacterial and fungus contaminants were observed in some liquid media isolations. Only one contamination-free tube from Santa Ana, one from La Uruca and five from La Garita, tested positive for *X. fastidiosa* by DAS-ELISA. Cell aggregation was visible in liquid PW and the medium turned dark red. Ten days after the inoculation on solid PW, characteristic colonies of *X. fastidiosa* were observed, and six days later the plates turned red. Three clones were obtained from each of the seven isolates and were named CR-XF-Vv-Ic1 (CR: Costa Rica, Xf: *Xylella fastidiosa*, Vv: *Vitis vinifera*, I: number of isolated, c: clone 1). CR-Xf-Vv-Ic1, c2, c3 are from grapevine plants of Santa Ana; CR-Xf-Vv-IIc1, c2, c3 are from La Uruca; and clones CR-Xf-Vv-IIIc1, c2, c3; CR-Xf-Vv-IVc1, c2, c3; CR-Xf-Vv-Vc1, c2, c3; CR-Xf-Vv-VIc1, c2, c3; and CR-Xf-Vv-VIIc1, c2, c3 are from La Garita de Alajuela. After serial subculture of clones, we observed that colonies grew much more rapidly (6 or 7 days).

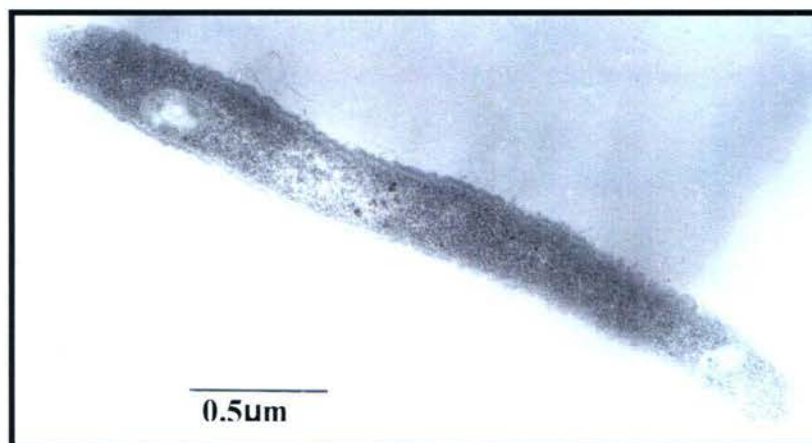
### III.3.C *Morphological and biochemical characterization of colonies*

Colonies were circular, with full margin, convex, smooth, opalescent, and reached 0.5-1 mm in diameter (Figure 2). The bacterial cells were gram-negative, catalase-positive and oxidase-negative and showed positive reaction by DAS-ELISA



**Figure 2.** Colonies of *X. fastidiosa* isolated from symptomatic grapevine plants.

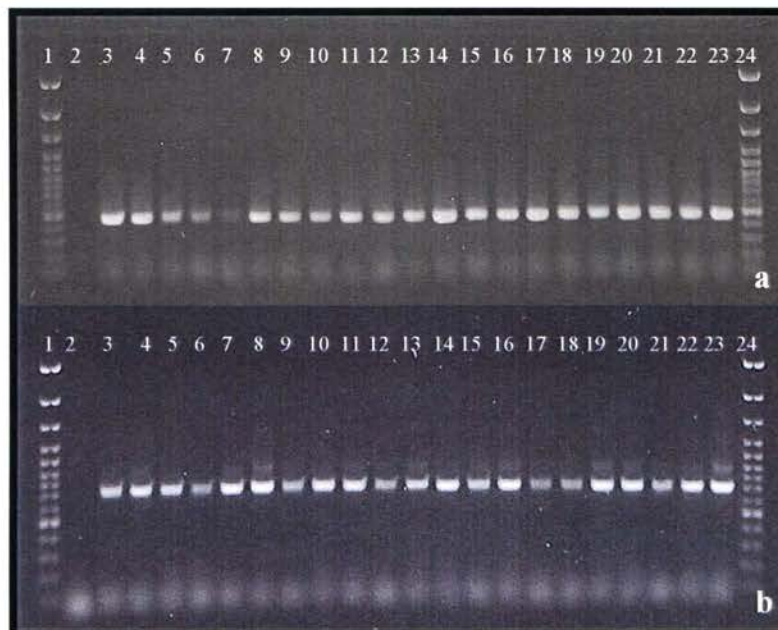
Electron micrograph (Figure 3) showed narrow and rod-shaped bacterial cells, measuring 0.3  $\mu\text{m}$  wide and 3.0  $\mu\text{m}$  long. The bacterium has a rippled wall.



**Figure 3.** Electron microscopy of the bacterial cell from isolates of grapevine plants from Costa Rica.

### **III.3.D DNA extraction and amplification by PCR**

The method used for the preparation of genomic DNA from bacteria (Ausubel *et al.* 1990) was efficient. DNA concentration was determined by measuring absorbance of the sample at 260 nm. All 21 clones yielded products of 500 pb and 733 pb using 272-1int/272-2int and RST31/RST33 primers, respectively (Figure 4).



**Figure 4.** Gel electrophoresis of PCR products with different primers. **a)** Product of 500 pb obtained with primers 272-1int/272-2int. **b)** Product of 733 pb obtained with primers RST31/RST33. Lane 1 and 24: 100 pb DNA ladder (Fermentas®), Lane 2: negative control, Lane 3-5: CR-Xf-Vv-Ic1, c2, c3, Lane: 6-8: CR-Xf-Vv-IIc1, c2, c3, Lane 9-11: CR-Xf-Vv-IIIc1, c2, c3, Lane 12-14: CR-Xf-Vv-IVc1, c2, c3, Lane 15-17: CR-Xf-Vv-Vc1,c2, c3, Lane 18-20: CR-Xf-Vv-VIc1, c2, c3, Lane 21-23: CR-Xf-Vv-VIIc1, c2, c3. The order is the same in both gels.

### III.4 Discussion

The presence of *X. fastidiosa* was confirmed in vineyards established in Costa Rica through consistent isolation of the bacterium from grapevine plants showing PD symptoms. The identity of the isolates was determined using different features: (i) slow growth rate (ten days), (ii) oxidase-negative, (iii) catalase-positive, (iv) cell morphology (rippled cell wall), DAS-ELISA and PCR amplification products using two different set of primers.

Results showing that only 66% of all symptomatic collected samples tested positive for *X. fastidiosa* by DAS-ELISA (Table 1) are consistent with previous works describing that the bacterium is not uniformly distributed throughout all tissue of infected plants (Nomé *et al* 1980, Hopkins 1989, Nomé *et al.* 1992, Purcell & Hopkins 1996, He *et al.* 2000, Yorinori *et al.* 2003). Bextine & Miller (2004) also found that enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) are limited methods for the detection of *X. fastidiosa* due to low titer and patchy distribution of the bacterium within a host plant.

Both PW and SPW media were successful in obtaining primary isolations. Nevertheless, in subsequent attempts for primary isolation, we only used PW because SPW showed higher rates of contamination than PW. Due to the high rates of bacterial and fungal contaminations observed, it was not possible to evaluate all tubes inoculated with extracts from different plants. According to some investigations (Davis *et al.* 1981, Purcell and Hopkins 1996, Buzcan *et al.* 2005), the slow growth of the pathogen leading to frequent contamination of cultures is a limiting factor for *X. fastidiosa*, concerning studies (Purcell and Hopkins 1996, Buzcan *et al.* 2005). Berisha *et al.* (1998) observed that when using negative vacuum pressure with liquid medium to flush out bacteria through the xylem tissue, the collected bacteria had relatively less contaminants and the isolation was more efficient.

In this study, cell aggregation was observed at the bottom of the tube three weeks after inoculation; these results are similar to those obtained by Davis *et al.* (1981). They observed cell aggregation adhered to the walls of the tubes, when *X. fastidiosa* isolated from plum and grapevine isolates was subcultured in PW broth. Moreover, they observed faint turbidness in the media after a few days of incubation. No turbidity was observed in this study. In another study made by Marques *et al.* (2002), cultures of *X. fastidiosa* isolated from grapevine and maintained in glass tubes under static conditions showed moderate formation of clumps after six or twelve weeks. Media used turned red dark indicating an alkaline pH shift, probably due to the release of waste substances produced during metabolism of the bacteria. Davis *et al.* (1981) also observed that PW media turned dark red when he made isolations of the bacteria from peach and plum trees.

Colony pattern (Figure 2) (diameter, color, texture, and margin) did not change after serial transfers, but colonies grew much more rapidly. According to Hartung *et al.* (1994) after serial transfers, strains of *X. fastidiosa* adapt to culture and grow faster.

No differences in colonial morphology were observed between our clones. Colonies were similar to those reported previously for *X. fastidiosa* associated with PD (Davis *et al.* 1978, Wells *et al.* 1987).

Electron microscopy showed that the cell wall of the bacteria had numerous ridges and furrows (Figure 3) According to Chagas *et al.* (1992); this is a typical characteristic of gram-negative bacteria, which was previously described in ultra-structural studies of *X. fastidiosa* (Mollenhauer and Hopkins 1974).

Specific oligo primers 272-1int/272-2int (Pooler and Hartung 1995) and RST31/RST33 (Minsavage *et al.* 1994) for *X. fastidiosa* used in PCR, amplified DNA bands of 500 pb and 733 pb respectively (Figure 4); the size of the bands was the same in the reports of Minsavage *et al.* (1994) and Pooler and Hartung (1995).

The next step is to establish filogenetic relations between all isolates obtained from different vineyards and with isolates of *X. fastidiosa* obtained from other hosts in Costa Rica.



### III.5 Literature cited

- Ausubel, FM; Brent, R; Kingston, RE; Moore, DD; Seidman, JG; Smith, JA; Struhl, K. 1990. Current protocols in molecular biology. New York, Wiley & Sons. p.2.4.1-2.4.5.
- Barrantes, V.A. 1983. Insectos portadores de la bacteria causante del mal de pierce de la vid en Costa Rica. Tesis licenciatura, San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica 62 p.
- Berisha, B; Chen, YD; Zhang, GY; Xu, BY; Chen, TA. 1998. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 104: 427-433.
- Bextine, BR; Miller, TA. 2004. Comparison of whole-tissue and xylem fluid collection techniques to detect *Xylella fastidiosa* in grapevine and oleander. *Plant-Disease* 88: 600-604.
- Buzkan, N; Kocsis, L; Walker, LA. 2005. Detection of *Xylella fastidiosa* from resistant and susceptible grapevine by tissue sectioning and membrane entrapment immunofluorescence. *Microbiological Research* 160: 225-231.
- Chagas, MC; Rossetti, V; Beretta, M. 1992. Electron microscopy studies of a xylem limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *Journal of Phytopathology* 134: 306-312.
- Davis, M; French, J.W; Schaad, N.W. 1981 Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* 6: 309-314.
- Davis, M.J; Purcell, A.H; Thomson, S.V. 1978. Pierce's disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium. *Science* 199: 75-77.
- Goheen, A.C; Nyland, G; Lowe, S.K. 1973. Association of a Rickettsia like organism with Pierce's disease of grapevine and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63: 342. Fuente original Pierce, N.B. 1892. The California vine disease. U.S. Department of Agriculture Division of vegetal pathology bulletin 2: 222.
- Goheen, AC; Raju, BC; Lowe, SK; Nyland, G. 1979. Pierce disease of grapevines in central America. *Plant Disease Reporter* 63: 788-792.
- Hartung, JS; Beretta, J; Brlansky, RH; Spisso, J; Lee, R. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84: 591-597.

- He, CX; Li, WB; Ayres, AJ; Hartung, JS; Miranda, VS; Teixeira, DC. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease* 84: 622-626.
- Hernández, L; and Corona, FM. 1997. Detección de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* Por Elisa-DAS en vid (*Vitis vinifera* L) y malezas en viñedos del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (Luz)*. 14: 297-306.
- Hernández, L; Corona, FM. 1994. Diagnostico de *Xylella fastidiosa* en la vid y malezas asociadas con el cultivo. *Manejo-Integrado-de-Plagas* 33: 7-10
- Hopkins, DL. 1989. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology* 27: 271-290
- Hopkins, DL. 1981. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems petioles and leaf veins. *Phytopathology* 71: 415-418.
- Hopkins, DL; and Mollenhauer, HH. 1973. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's Disease of grapes. *Science* 179: 298-300.
- Jiménez, LG. 1980 El mal de Pierce de la vid su distribución en Costa Rica y características fenotípicas de su agente causal. Tesis Licenciatura Universidad de Costa Rica, Facultad de Fitotecnia, San José, CR. 63p.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electro microscopy. *Journal Cell Biology* 27: 137-138.
- Marques, LL; Ceri, H; Manfio, GP; Reid, D.M; Olson, ME. 2002. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. *Plant Disease* 86: 633-638.
- Minsavage, GV; Thompson, CM; Hopkins, DL; Leite, RMVBC; Stall, RE. 1994. Development of a Polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-461.
- Mora, J.M. 1982. Determinación de los hospedantes alternos del mal de pierce de vid en Costa Rica, mediante técnicas inmunológicas de adsorción con conjugados enzimáticos. Tesis Licenciatura, San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 114p.
- Mollenhauer, H.H; Hopkins, DL. 1974. Ultrastructural study of Pierce's disease bacterium in grape xylem tissue. *Journal of Bacteriology* 119: 612-618.
- Nomé, SF; Haekterman, RM; Docampo, DM; Prativiera, AG; Di Feo, LV. 1992. Escaldadura de las hojas del almendro en Argentina. *Fitopatología Brasileira* 17: 57-60.

- Nomé, SF; Raju, BC; Goheen, AC; Nyland, G; Docampo, D. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for pierce's disease bacteria in plant tissues. *Phytopathology* 70: 746-749.
- Pooler, M; Hartung, J. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31: 377-381.
- Purcell, HA; Hopkins, DL. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review Phytopathology* 34: 131-151.
- Reynolds, ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal Cell Biology* 7: 208-12.
- Wells, J.M; Raju., B.C; Hung, H.Y; Weisburg, W.G; Mandelco-Paul, L; Brenner, D.J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. nov: Gram negative, xylem limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal Systematic Bacteriology* 37: 136-143.
- Yorinori, MA; Ribas, AF; Ueno, B; Massola-Junior, NS; Leite-Junior, RP. 2003. Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 28: 427-430.

## CAPÍTULO IV

---

**Variabilidad genética de aislamientos de *Xylella fastidiosa*  
obtenidos de vid, cítricos y café de Costa Rica**

## Variabilidad genética de aislamientos de *Xylella fastidiosa* obtenidos de vid, cítricos y café de Costa Rica

### Resumen

En Costa Rica se ha detectado y aislado *Xylella fastidiosa* en plantas de café, vid y cítricos. Su diversidad genética se estudió utilizando la técnica de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), secuenciación y polimorfismo de la amplificación aleatoria del ADN (RAPDs). El DNA de 43 aislamientos de Costa Rica (18 de cítricos, 21 de vid y cuatro de café), incluyendo dos de cítricos de Brasil (Lar 20/11 y Taq30) y uno de vid de Estados Unidos (ATCC35881), se amplificaron con los imprimadores universales 272-1int/272-2int y JB-1/JB-2. Los productos de amplificación de los imprimadores 272-1int/272-2int se cortaron con la enzima *Cfo*-I, y se obtuvieron perfiles que diferenciaron únicamente los aislamientos de Brasil del resto de los aislamientos. Los productos de los imprimadores JB-1/JB-2 se cortaron con 12 enzimas de restricción. Tres aislamientos de cítricos de Costa Rica (CR-Xf-Cs-IIIc1, CR-Xf-Cs-IIIc2, CR-Xf-Cs-IIIc3) presentaron el mismo patrón que los de Brasil al digerirse con las enzimas *Alu*-I, *Cfo*-I, *Hinf*-I, *Hpa*-II y *Taq*-I, mientras que el resto presentó un patrón diferente. La secuencia del producto 272-1int/272-2int del aislamiento Lar20/11 mostró diferencias significativas al compararla con las demás secuencias. El análisis molecular de varianza reveló diferencias genéticas significativas entre los aislamientos obtenidos de diferentes hospederos, entre las plantas de los hospederos y dentro de cada planta. El dendrograma generado con los marcadores RAPDs mostró cuatro grupos: (1) vid Costa Rica, (2) café Costa Rica-vid Estados Unidos, (3) la mayoría de los aislamientos de cítricos de Costa Rica (4) los aislamientos CR-Xf-Cs-IIIc1, CR-Xf-Cs-IIIc2, CR-Xf-Cs-IIIc3 formaron un grupo totalmente separado de los demás. El dendrograma generado con los perfiles de restricción mostró tres grupos: (1) vid y café de Costa Rica-vid Estados Unidos, (2) cítricos de Costa Rica, (3) los aislamientos de cítricos de Costa Rica (CR-Xf-Cs-IIIc1, CR-Xf-Cs-IIIc2, CR-Xf-Cs-IIIc3)-los aislamientos de cítricos de Brasil (Lar 20/11, Taq 30). Estos resultados revelan que existe diversidad genética entre y dentro de aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de diferentes hospederos en Costa Rica.

**Palabras clave:** análisis molecular de varianza, secuenciación, RAPDs, RFLPs,

#### IV.1 Introducción

*Xylella fastidiosa* (Wells *et al.* 1987) es considerada una bacteria fitopatógena emergente, que afecta cultivos de importancia económica en el continente americano (Beretta *et al.* 1996, Hopkins y Purcell 2002, Coletta-Filho y Machado 2003, Schaad *et al.* 2004). Tal es el caso de la vid (*Vitis vinifera* L.) en California, Estados Unidos y la naranja dulce (*Citrus sinensis* L.) en Brasil, donde la bacteria causa el mal de Pierce (PD por sus siglas en inglés) (Hopkins y Purcell 2002) y la clorosis variegada de los cítricos (CVC) (Hartung *et al.* 1994, Rossetti *et al.* 1998), respectivamente. Ambas enfermedades se consideran epidemias y han provocado un alto impacto económico. Por tal razón, *X. fastidiosa* ha sido objeto de múltiples estudios, entre ellos la secuenciación completa del genoma de los aislamientos 9a5c y Temecula obtenidos de cítricos y vid, respectivamente, para comprender mejor los mecanismos de patogenicidad y virulencia utilizados por este microorganismo al momento de colonizar el hospedero (Simpson *et al.* 2000, Chen *et al.* 2002, Van Sluys *et al.* 2003).

Actualmente todas las cepas de *X. fastidiosa* se clasifican en una sola especie, sin embargo, éstas difieren en su ámbito de hospederos, patogenicidad, requerimientos nutricionales, y algunas cepas pueden causar síntomas en más de un hospedero. Muchos estudios se han enfocado en la búsqueda de diferencias o similitudes genéticas que permitan realizar una clasificación acertada de la bacteria. En estos estudios, ADN obtenido de cepas aisladas de diferentes hospederos y del mismo hospedero procedentes del Norte y Sur América se han analizado mediante técnicas como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés) (Chen *et al.* 1992); polimorfismo de la amplificación aleatoria del ADN (RAPD) (Chen *et al.* 1995, Pooler y Hartung 1995a, Rosato *et al.* 1998, Hendson *et al.* 2001, Lacava *et al.* 2001, Qin *et al.* 2001, Chen *et al.* 2002); palíndromos extragénicos repetidos-PCR (rep-PCR) (Hendson *et al.* 2001, Mehta *et al.* 2001, Qin *et al.* 2001); electroforesis de campo pulsante (CHEF) (Hendson *et al.* 2001); número variable de repeticiones en tandem (VNTR) (Coletta-Filho *et al.* 2001, Coletta-Filho y Machado 2002, Coletta-Filho y Machado 2003); y polimorfismo en un solo nucleótido (SNPs) (Chen *et al.* 2005). Los resultados obtenidos en estas investigaciones han demostrado que existe variabilidad entre cepas de *X. fastidiosa*

aisladas de diferentes hospederos; que genotipos diferentes pueden coexistir en un solo hospedero, y que se pueden observar diferencias genéticas entre cepas procedentes de diferentes regiones geográficas (Chen *et al.* 1992, 1995, Pooler y Hartung 1995a y b, Albibi *et al.* 1998, Rosato *et al.* 1998, Frohme *et al.* 2000, Simpson *et al.* 2000, Coletta-Filho *et al.* 2001, Henderson *et al.* 2001, Mehta *et al.* 2001, Mehta y Rosato 2001, Qin *et al.* 2001, Bhattacharyya *et al.* 2002a y b, Chen *et al.* 2002, Coletta-Filho y Machado 2002, Meinhardt *et al.* 2003, Van Sluys *et al.* 2003, Coletta-Filho y Machado 2003, Schaad *et al.* 2004, Chen *et al.* 2005, Schuenzel *et al.* 2005).

Schaad *et al.* (2004), basados en la hibridación ADN: ADN, proponen que *X. fastidiosa* puede dividirse en tres subespecies, subsp. *piercei*, subsp. *multiplex*, subsp. *pauca*. Las primeras dos subespecies agrupan cepas de Norte América, mientras la última agrupa cepas aisladas de cítricos de Brasil. Schuenzel *et al.* (2005) propusieron una nueva subespecie: subsp. *sandyi* que incluye aislamientos obtenidos de *Nerium oleander* de Norte América.

En Costa Rica (CR), se confirmó la presencia de *X. fastidiosa* en plantas de vid (capítulo tres de esta tesis), café (Rodríguez *et al.* 2001), árboles de naranja dulce que sirven como sombra en plantaciones de café y de cercas (Aguilar *et al.* 2005) y especies arbóreas como eucalipto, macadamia, cas, guayaba y cedro amargo (Moreira *et al.* 2002) y aguacate (*Persea americana*) (Montero-Astúa *et al.* 2008). Se obtuvieron aislamientos de la bacteria de vid, café y árboles de naranja dulce procedentes de diferentes regiones, de los cuales aún no se tiene información sobre su diversidad genética. En el caso de los aislamientos de cítricos, se observaron diferencias en la amplificación del ADN, al utilizar los imprimadores CVC-1/272-2int (Pooler y Hartung 1995a) diseñados para la amplificación de ADN de aislamientos de *X. fastidiosa* causantes de CVC (capítulo dos de esta tesis). Aún no se conoce el origen de estas diferencias, por lo cual es necesario realizar estudios que permitan establecer las relaciones o diferencias filogenéticas de estos aislamientos entre sí y en comparación con aislamientos obtenidos de otros hospederos. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la diversidad genética dentro y entre aislamientos de *Xylella fastidiosa* obtenidos de diferentes hospederos de Costa Rica.

## **IV.2 Materiales y métodos**

### **IV.2.A Aislamientos utilizados**

Para el estudio se utilizaron 21, 18 y cuatro aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de plantas de vid, cítricos y café de Costa Rica (CR), respectivamente (Cuadro 1). Estos se mantuvieron en medio PW ("periwinkle wilt medium"), mediante subcultivos realizados en intervalos de 15 a 20 días. Adicionalmente se utilizó ADN de aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de plantas de cítricos de Brasil y vid de Estados Unidos, los cuales fueron brindados por el Dr. John Hartung del "United States Department of Agriculture" (USDA) (Cuadro 1).

### **IV.2.B Extracción de ADN y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN con los imprimadores 272-1int/272-2int y JB-1/JB-2**

A partir de cada aislamiento se extrajo ADN utilizando el método de preparación de ADN genómico de bacterias descrito por Ausubel *et al* (1990). Una vez obtenido, el ADN se cuantificó por espectrofotometría y se prepararon soluciones de trabajo a una concentración de 50 ng/μl.

El ADN de cada uno de los aislamientos obtenidos de las plantas de vid, cítricos y los aislamientos CR-Xf-Ca-IIc2, CR-Xf-Ca-IIIc3 de café de CR, así como, el ADN de los aislamientos Lar 20/11, Taq 30 y el ATCC35881, se amplificaron con los imprimadores 272-1/272-2int (Pooler y Hartung 1995a) y con los imprimadores JB-1/JB-2 (Ferreira *et al.* 2000). Para ambos imprimadores, la amplificación se realizó en un volumen final de 25 μl que contenía 0,4 μM de los respectivos imprimadores, 1,0 U de Taq polimerasa y 50 ng de ADN. Los demás componentes de la reacción variaron en concentración. La mezcla de los imprimadores 272-int/272-2int contenía 1X de solución amortiguadora de PCR, 200 μM de dNTPs, y 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C por 4 min, 30 ciclos (94 °C por 1 min, 67 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) y un ciclo de extensión de 72 °C por 10 min (Pooler y Hartung 1995a). La mezcla de los imprimadores JB-1/JB-2 contenía 1,25X de Buffer de PCR, 125 μM de dNTPs, 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones de amplificación fueron 94 °C por 2 min, 40 ciclos (94 °C por 1 min, 64 °C por 1 min, 72 °C por 1 min 15) finalmente 72 °C por 10 min (Ferreira *et al.* 2000). Los productos de



amplificación se separaron en geles de agarosa al 1% en TAE 1X, a 70V. Las bandas obtenidas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Como referencia para determinar el tamaño de las bandas obtenidas se utilizó una escalera de 100 pb (Fermentas®. Alemania).

#### **IV.2.C Digestión del ADN con enzimas de restricción**

Todos los productos de amplificación obtenidos con los imprimadores 272-1int/272-2int se digirieron únicamente con la enzima de restricción *Cfo*-I, ya que informes previos demuestran que al digerir el producto de amplificación de estos imprimadores con esta enzima se pueden diferenciar aislamientos de *X. fastidiosa* de café y cítricos (Qin *et al.* 2001). Por su parte, los productos obtenidos con los imprimadores JB-1/JB-2 se digirieron con las enzimas *Alu*-I, *Bam*H-I, *Bcl*-I, *Cfo*-I, *Eco*R-I, *Hae*-III, *Hinf*-I, *Hpa*-II, *Mse*-I, *Rsa*-I, *Sau*-3A-I y *Taq*-I. Todas las reacciones de digestión se realizaron en un volumen de 15 µl que contenía 10 µl de producto de amplificación, 5 U de enzima, 1 X de la respectiva solución amortiguadora para la enzima. Todas las reacciones se incubaron a 37°C durante toda la noche, excepto las enzimas *Bcl*-I y *Taq*-I que se incubaron durante 6 h a 55°C y 65°C, respectivamente. Los productos de corte de los imprimadores 272-1int/272-2int, se separaron en geles de agarosa al 4%, mientras que los de los JB-1/JB-2 se separaron en geles nativos de poliacrilamida al 5%. Las bandas de corte obtenidas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Como referencia para determinar el tamaño de las bandas obtenidas se utilizó una escalera de 100 pb (Fermentas®. Alemania).

#### **IV.2.D Análisis de los datos generados por RFLPs:**

Con los datos generados en el análisis de RADPs (bandas o perfiles de restricción) se construyó una matriz basada en la presencia (1) ó ausencia (0) de bandas para cada una de los aislamientos analizados. Se estimó la distancia genética según Nei y Li (1979) y se generó un dendograma basado en agrupación de pares no ponderados mediante promedios aritméticos (UPGM por sus siglas en inglés), y se realizó una prueba de remplazo con 1000 repeticiones usando el programa Treecom (versión 1.3, Van de Peer y De Wachter 1994).

#### **IV.2.E Secuenciación de productos de amplificación**

Se escogieron productos de PCR amplificados con ambos imprimadores (272-1int/272-2int y JB-1/JB-2) de un aislamiento representante de cada uno de los perfiles de restricción obtenidos mediante RFLPs. Para preparar las reacciones de secuenciación se utilizó el kit BigDye® Terminator v3.1 de Applied Biosystem® según las especificaciones del fabricante, la secuencia fue leída en un secuenciador automático ABI Prism 377 DNA Sequencer de Applied Biosystem®. Las secuencias se editaron y alinearon utilizando el programa BioEdit® (versión 7.0, Hall 1999). Además, se generó una matriz de coeficientes de identidad entre las diferentes secuencias 272-1int/272-2int y JB-1/JB-2.

#### **IV.2.F PCR-RAPDs**

Se utilizaron 11 imprimadores de la compañía Operon (OP-A-02, OP-A-03, OP-A-09, OP-D-20, OP-G-19, OP-H-07, OP-H-12, OP-H-18, OP-I-02, OP-N-04, OP-U-10). El ADN de todas los aislamientos de vid, cítricos, los aislamientos CR-Xf-Ca-Vc3 y CR-Xf-Ca-Vlc2 de café de Costa Rica, y el aislamiento de vid de USA ATCC35881 se amplificaron en un volumen de reacción de 15 µl que contenía 0,8 X de solución amortiguadora de PCR, 83 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,7 µM de imprimador, 0,75 U de Taq polimerasa y 25 ng de ADN. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron 94 °C por 2 min, 40 ciclos (92 °C por 5 seg, 36 °C por 7 seg, 72 °C por 70 seg) y finalmente 72 °C por 4 min (Villalobos 2000). Cada muestra se analizó por triplicado con cada uno de los imprimadores, para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1% en TAE 1 X, a 70 V, durante 3 horas. Las bandas obtenidas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Como referencia para determinar el tamaño de las bandas obtenidas se utilizó una escalera de 100 pb (Fermentas®, Alemania). En este análisis no se incluyó ADN de aislamientos de cítricos de Brasil.

#### **IV.2.G Análisis de datos generados por PCR-RAPDs**

Con los datos generados en el análisis de RADPs (bandas o productos de amplificación) se construyó una matriz basada en la presencia (1) o ausencia (0) de bandas para cada uno de

los clones analizados. La matriz se analizó tratando el conjunto de aislamientos de cada hospedero como una población y los aislamientos provenientes de una misma planta como una subpoblación dentro de los hospederos. Para el análisis de la matriz se utilizó el programa POPGENE (version 1.31, Yeh *et al.* 1999). Además se realizó un análisis molecular de varianza con el programa WINAMOVA (version 1.55, Excoffier *et al.* 1992), y se generó un dendograma basado en UPGMA usando el Treecom (version 1.3, Van de Peer y De Wachter 1994) basado en los valores de distancia genética obtenidos según Nei y Li (1979). Se realizaron 1000 permutaciones para cada una de las estimaciones de los análisis.

**Cuadro 1.** Aislamientos de *Xylella fastidiosa* utilizadas en este estudio

Designación	Hospedero	Localización	País
CR-Xf-C.s-Ic1	<i>Citrus sinensis</i>	Frailes, San José	Costa Rica
CR-Xf-C.s-Ic2	<i>Citrus sinensis</i>	Frailes, San José	Costa Rica
CR-Xf-C.s-Ic3	<i>Citrus sinensis</i>	Frailes, San José	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IIc1	<i>Citrus sinensis</i>	Frailes, San José	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IIc2	<i>Citrus sinensis</i>	Frailes, San José	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IIc3	<i>Citrus sinensis</i>	Frailes, San José	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IIIc1	<i>Citrus sinensis</i>	Grecia, Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IIIc2	<i>Citrus sinensis</i>	Grecia, Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IIIc3	<i>Citrus sinensis</i>	Grecia, Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IVc1	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IVc2	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-C.s-IVc3	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-C.s-Vc1	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-C.s-Vc2	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-C.s-Vc3	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-C.s-VIc1	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-C.s-VIc2	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-C.s-VIc3	<i>Citrus sinensis</i>	Alajuela centro	Costa Rica
CR-Xf-Vv-Ic1	<i>Vitis</i> sp.	Santa Ana, San José	Costa Rica
CR-Xf-Vv-Ic2	<i>Vitis</i> sp.	Santa Ana, San José	Costa Rica

**Cuadro 1.** Continuación

CR-Xf-Vv-Ic3	<i>Vitis</i> sp.	Santa Ana, San José	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IIc1	<i>Vitis</i> sp.	La Uruca, San José	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IIc2	<i>Vitis</i> sp.	La Uruca, San José	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IIc3	<i>Vitis</i> sp.	La Uruca, San José	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IIIc1	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IIIc2	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IIIc3	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IVc1	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IVc2	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-IVc3	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-Vc1	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-Vc2	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-Vc3	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-VIc1	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-VIc2	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-VIc3	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-VIIc1	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-VIIc2	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Vv-VIIc3	<i>Vitis</i> sp.	La Garita de Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Ca-IIc2	<i>Coffea arabica</i>	Grecia, Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Ca-IIIc2	<i>Coffea arabica</i>	Grecia, Alajuela	Costa Rica
CR-Xf-Ca-Vc3	<i>Coffea arabica</i>	Desamparados, San José	Costa Rica
CR-Xf-Ca-VIc2	<i>Coffea arabica</i>	Curridabat, San José	Costa Rica
Lar 20/11	<i>Citrus sinensis</i>	São Paulo	Brasil
Taq 30	<i>Citrus sinensis</i>	Taquaratinga	Brasil
ATCC35881	<i>Vitis</i> sp.	Florida	Estados Unidos

### IV.3 Resultados

#### IV.3.A Extracción de ADN y amplificación por PCR del ADN con los imprimadores 272-1int/272-2int y JB-1/JB-2

El método de extracción de ADN fue eficiente y a partir de todas las muestras, con ambos imprimadores se obtuvo los productos de amplificación esperados, 500 pb y 1000 pb para los imprimadores 272-1int/272-2int y JB-1/JB-2, respectivamente.

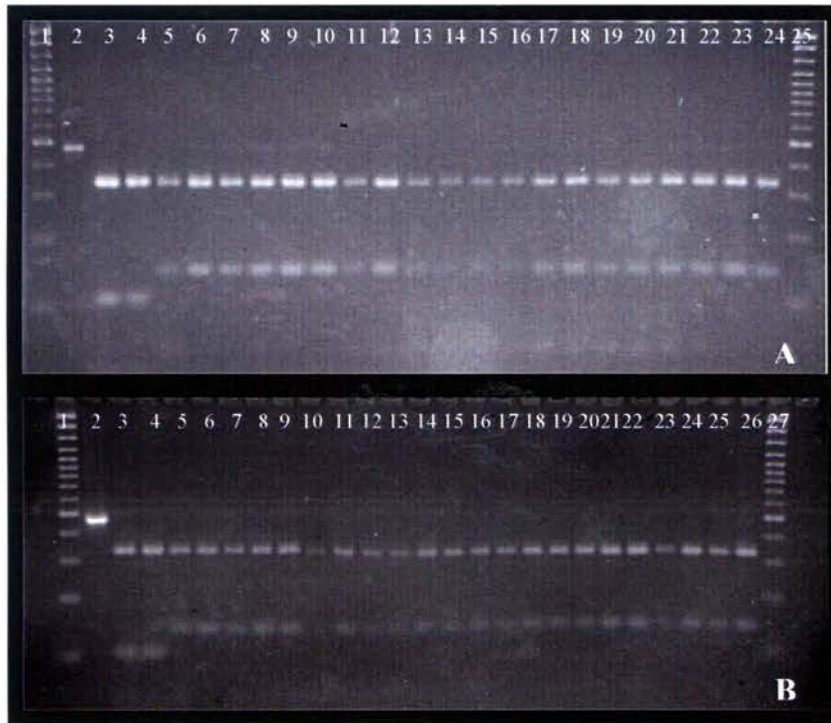
#### IV.3.B Digestión con enzimas de restricción

Al realizar el corte con la enzima *Cfo*-I del producto de amplificación obtenido con los imprimadores 272-1int/272-2int, se observó que todos los aislamientos de vid, cítricos y café de Costa Rica mostraron el mismo perfil de restricción, generando dos fragmentos, uno de aproximadamente 142 pb y el otro de 358 pb (Figura 1). Este perfil de restricción fue diferente al de los aislamientos de Brasil, los cuales generaron tres fragmentos, de aproximadamente 41 (no es visible en la foto ya que por ser tan pequeña al momento de la separación se salió del gel), 101 y 358 pb. Este último fragmento fue el único que se observó en común en todos los aislamientos de Costa Rica y vid de USA (Figura 1).

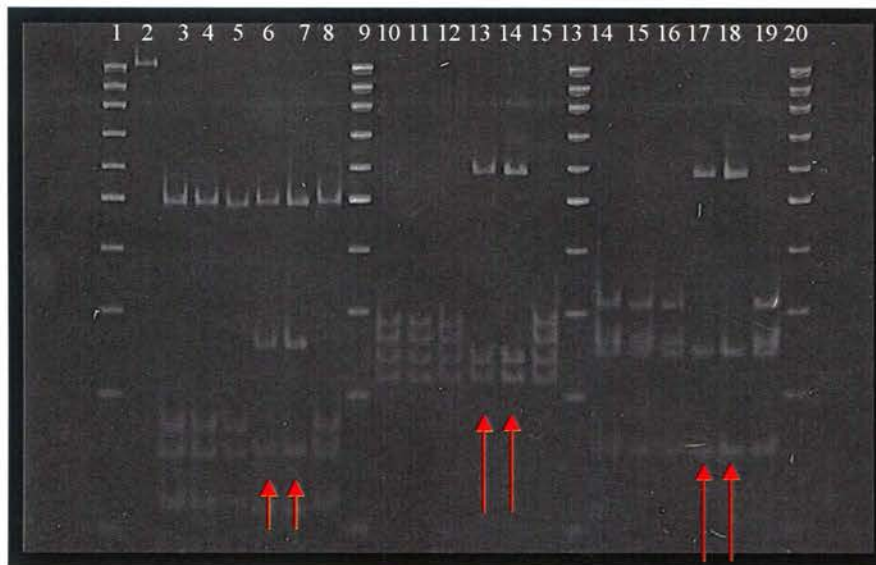
Al digerir el producto de amplificación obtenido con los imprimadores JB-1/JB-2 con las diferentes enzimas, se observó que varias de ellas permiten diferenciar entre aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos del mismo hospedero así como los obtenidos de otros hospederos.

Al realizar digestiones con las enzimas *Alu*-I, *Cfo*-I, *Hinf*-I, *Hpa*-II y *Taq*-I los aislamientos CR-Xf-Cs-IIIc1, CR-Xf-Cs-IIIc2, CR-Xf-Cs-IIIc3 obtenidos de cítricos de Costa Rica y los aislamientos Lar 20/11 y Taq 30 obtenidos de cítricos de Brasil mostraron patrones de restricción similares entre sí (Figura 2, 3a y b), Un patrón diferente al anterior se presentó en el caso de los aislamientos de vid de Estados Unidos; vid, otros cítricos (Frailes, Desamparados y Alajuela Centro) y café de Costa Rica los cuales mostraron el mismo perfil entre sí (Figura 2, 3a y b). Con la enzima *Rsa*-I, los aislamientos de vid de Estados Unidos; vid, café y los aislamientos CR-Xf-Cs-IIIc1, CR-Xf-Cs-IIIc2, CR-Xf-Cs-IIIc3 de cítricos de Costa Rica, cítricos de Brasil mostraron el mismo perfil entre sí, el cual fue diferente al de los aislamientos de otros cítricos de Costa Rica (Frailes, Desamparados y

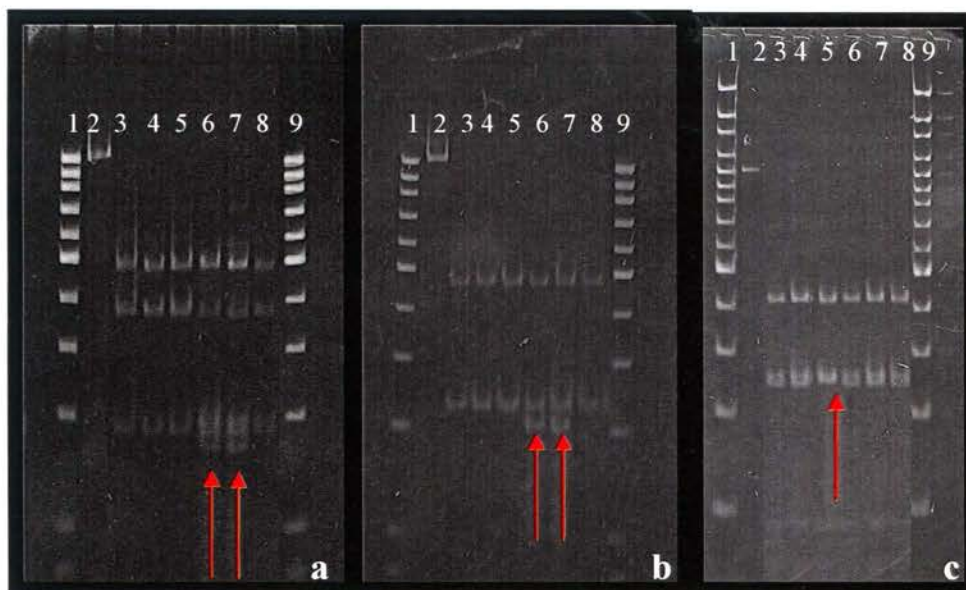
Alajuela Centro) (Figura 3c). Todos los aislamientos obtenidos de los distintos hospederos mostraron el mismo perfil de restricción al digerirse con las enzimas *Sau3A-I* y la *Mse-I* (Figura 4 a y b). Las enzimas *BamH-I*, *Bcl-I*, *EcoR-I*, *Hae-III* no cortaron el producto de PCR.



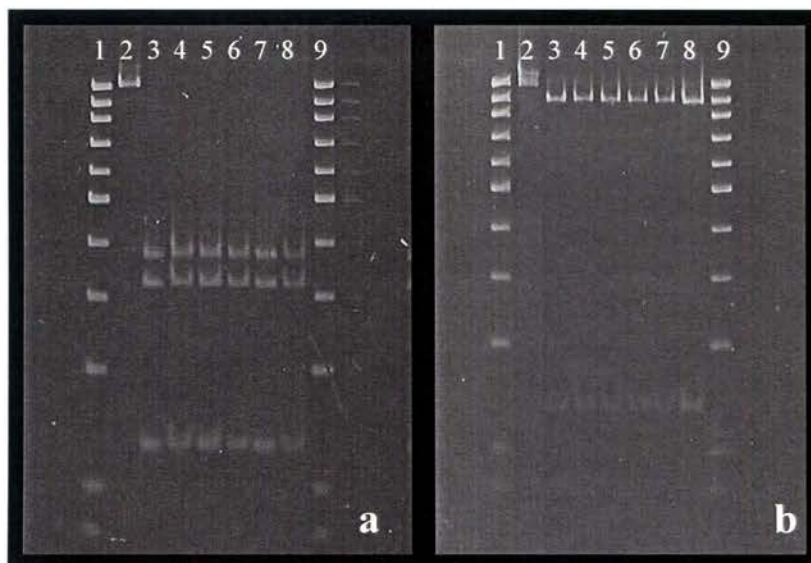
**Figura 1.** Patrones producidos por la digestión del producto obtenido con los imprimadores 272-1int/272-2int de los diferentes aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidas de cítricos, café y, vid de Costa Rica, vid de USA y cítricos de Brasil, con la enzima *Cfo-I*. **A)** línea 1 y 25 escalera 100 pb Fermentas®, línea 2 producto sin digerir 500 pb, línea 3 Lar 20/11, línea 4 Taq 30, línea 5-22, aislamientos de cítricos CR-Xf-Cs-Ic1, Cs-Ic2, Cs-Ic3, Cs-IIc1, Cs-IIc2, Cs-IIc3, Cs-IIIc1, Cs-IIIc2, Cs-IIIc3, Cs-IVc1, Cs-IVc2, Cs-IVc3, Cs-Vc1, Cs-Vc2, Cs-Vc3, Cs-VIc1, Cs-VIc2, Cs-VIc3; línea 23-24 aislamientos de café CR-Xf-Ca-IIc2, Ca-IIIc3 **B)** línea 1 y 27 escalera 100 pb Fermentas®, línea 2 producto sin digerir 500 pb, línea 3 Lar 20/11, línea 4 Taq 30, línea 5-25 aislamientos vid CR-Xf-Vv-Ic1, Vv-Ic2, VvIc3, VvIIc1, VvIIc2, VvIIc3, Vv-IIIc1, Vv-IIIc2, Vv-IIIc3, Vv-IVc1, Vv-IVc2, Vv-IVc3, Vv-Vc1, Vv-Vc2, Vv-Vc3, Vv-VIc1, Vv-VIc2, Vv-VIc3; línea 26 aislamiento vid USA ATCC35881.



**Figura 2.** Perfiles de restricción generados al digerir las muestras de *X. fastidiosa* con las enzimas *Cfo*-I líneas 3-8, *Hinf*-I líneas 10-15, *Alu*-I líneas 14-19. El orden de las muestras es el mismo para todas las enzimas: CR-Xf-Vv-Ic1, ATCC 35881, CR-Xf-C.s-Ic1, CR-Xf-C.s-IIIc1, Lar 20/11, CR-Xf-Ca-IIc2. línea 2 producto sin digerir 1000 pb, líneas 1, 9,13, 20 escalera molecular de 100 pb Fermentas®. Las flechas muestran la diferencia en los perfiles de restricción



**Figura 3.** Perfiles de restricción generados al digerir las muestras de *X. fastidiosa* con las enzimas a) *Hpa*-II, b) *Taq*-I, c) *Rsa*-I. El orden de las muestras en el gel es el mismo para todas las enzimas. Línea 1 y 9 escalera 100 pb Fermentas®. Línea 2: producto sin digerir 1000 pb, línea 3: CR-Xf-Vv-Ic1, línea 4: ATCC 35881, línea 5: CR-Xf-C.s-Ic1, línea 6: CR-Xf-C.s-IIIc1, línea 7: Lar 20/11, línea 8: CR-Xf-Ca-IIc2. Las flechas muestran las diferencias en los perfiles de restricción.

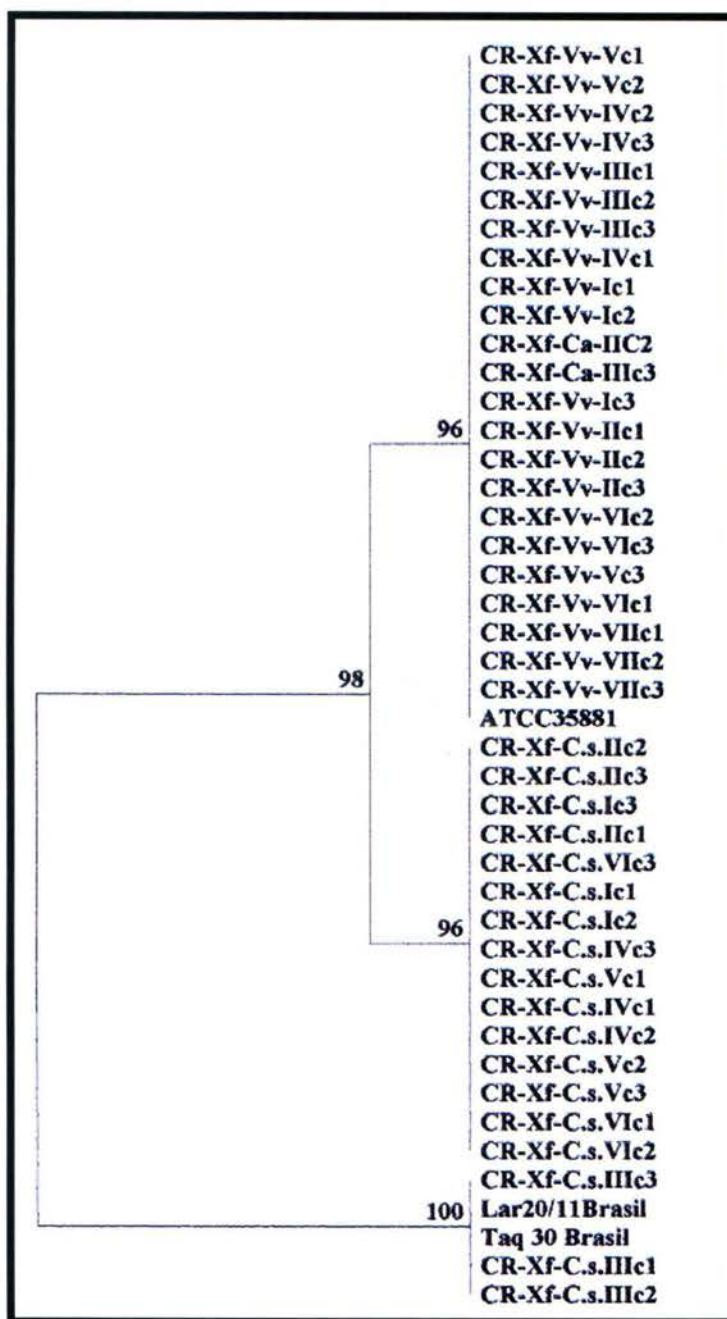


**Figura 4.** Perfiles de restricción generados al digerir las muestras de *X. fastidiosa* con las enzimas **a)** *Sau3A-I*, **b)** *Mse-I*. El orden de las muestras en el gel es el mismo para ambas enzimas. Línea 1 y 9 escalera 100 pb Fermentas®, línea 2: producto sin digerir 1000 pb, línea 3: CR-Xf-Vv-Ic1, línea 4: ATCC 35881, línea 5: CR-Xf-C.s-Ic1, línea 6: CR-Xf-C.s-IIIc1, línea 7: Lar 20/11, línea 8: CR-Xf-Ca-IIc2.

#### **IV.3.C Análisis de datos generados por RFLPs**

El dendograma generado a partir de una matriz de presencia o ausencia, mostró que los diferentes aislamientos forman tres grupos: (i) aislamientos de vid de Costa Rica y de Estados Unidos (ATCC35881) y los de café de Costa Rica, (ii) otros aislamientos de cítricos de Costa Rica (iii) aislamientos de cítricos de Costa Rica (CR-Xf-Cs-IIIc1, CR-Xf-Cs-IIIc2, CR-Xf-Cs-IIIc3) y aislamientos de cítricos de Brasil (Lar20/11 y Taq 30) (Figura 5).





**Figura 5.** Dendrograma basado en una matriz de similitud de datos generados mediante RFLPs, analizados por el método UPGMA, representando 44 aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de cítricos, café, vid de Costa Rica, vid de Estados Unidos y cítricos de Brasil. Los valores en los nudos de cada rama indican los porcentajes de reemplazo (1000 permutaciones)

#### IV.3.D Secuenciación de productos de amplificación

Se seleccionaron productos de PCR obtenidos con los imprimadores 272-1/272-2int y los JB-1/JB-2 de los aislamientos: CR-Xf-Cs-Ic1, CR-Xf-Cs-IIIc1 CR-Vv-Ic1, CR-Xf-Ca-IIc2, Lar20/11 como representantes de cada uno de los patrones de restricción obtenidos. Una secuencia de 416 nucleótidos se obtuvo del producto generado con los imprimadores 272-1int/272-2int (Figura 6). En la secuencia del aislamiento Lar 20/11 se observó una delección de un fragmento de 16 nucleótidos en la posición 191-206 pero se reinsertó a partir de la posición 258 en relación al resto de las secuencias (Figura 6). Debido a este resultado se realizó un BLAST de esta secuencia, y se encontró que tiene 99% de identidad con la secuencia del aislamiento 9a5c (GenBank número de registro AE003849.1) obtenido a partir de *Citrus sinensis* en São Paulo, Brasil (Chang y Donaldson 1993). Al realizar un BLAST de las secuencias del producto obtenido con los imprimadores 272-1int/272-2int de los aislamientos CR-Xf-C.s. IIIc1, CR-Xf-C.s. Ic1, CR-Xf-Ca IIc2, CR-Xf-Vv Ic1, ATCC35881, se observó que éstas presentaban identidad de 96%, 98%, 100%, 99%, 99% respectivamente con la secuencia del aislamiento Temecula (GenBank número de registro AE009442.1). Del fragmento generado con los imprimadores JB-1/JB-2 se obtuvo una secuencia de 725 nucleótidos. Al digerir esta secuencia se observó que los patrones de restricción de tres aislamientos (CR-Xf-C.s.IIIc1 CR-Xf-C.s.IIIc2 CR-Xf-C.s.IIIc3) obtenidos de cítricos de Costa Rica eran idénticos a los de los aislamientos de Brasil (Taq30 y Lar20/11). Debido a estas similitudes en los perfiles de restricción se realizó un BLAST de las secuencias de los aislamientos Lar20/11 y CR-Xf-C.s-IIIc1 y se observó que tienen 88% y 99% de identidad respectivamente con la secuencia del aislamiento 9a5c (GenBank número de registro AE003849.1) obtenido de cítricos en Brasil. Las secuencias de los demás aislamientos (CR-Xf-C.s. Ic1, CR-Xf-Ca IIc2, CR-Xf-Vv Ic1, ATCC35881) al igual que en el caso de la secuencia del producto obtenido con los 272-1/272-2int tuvieron identidad arriba del 92% con el aislamiento Temecula.

Al realizar matrices de comparación entre las diferentes secuencias de los dos productos de amplificación obtenido con los diferentes imprimadores (272-1/272-2 y JB-1/JB-2), se observó que los valores de identidad más altos (>0.9) corresponden a las comparaciones de

los aislamientos de Costa Rica entre sí y con respecto al aislamiento de vid de USA (Cuadro 2).

En ambas secuencias (272-1/272-1int y JB-1/JB-2) de los diferentes aislamientos se observaron transversiones, inserciones, transiciones y deleciones de nucleótidos (Figura 6).

#### IV.3.F PCR-RAPDs

Todos los imprimadores utilizados generaron productos de amplificación, el total de productos obtenidos fue de 116, los cuales fueron altamente reproducibles. El número de bandas obtenidas con cada imprimador varió de un mínimo de seis a un máximo de 14. La frecuencia de los productos de amplificación varió entre los aislamientos de los diferentes hospederos (Cuadro 4). Todos los imprimadores fueron capaces de revelar polimorfismo entre los aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de los diferentes hospederos. Muchos de los productos de amplificación fueron compartidos entre los diferentes hospederos. (Cuadro 3). Al estimar la diversidad genética ( $H$ ) se observó que los aislamientos obtenidos de cítricos presentaban mayor  $H$  con respecto a los aislamientos de vid y café (Cuadro 4).

**Cuadro 2.** Valores de identidad de secuencias obtenidas con los imprimadores 272-1/272-2int y JB-1/JB-2 de seis aislamientos de *X. fastidiosa*

	Valores de identidad comparación secuencia 272-1/272-2int					
	Xf Lar20/11Brasil	CR.Xf-C.s. IIC1	CR-Xf-C.s.Ic1	CR-Xf-Ca IIC2	CR-Xf-Vv Ic1	Xf vid ATCC35881 USA
Xf Lar20/11Brasil	1,000	0,888	0,879	0,879	0,884	0,881
CR.Xf-C.s. IIC1		1,000	0,956	0,956	0,961	0,954
CR-Xf-C.s.Ic1			1,000	0,990	0,980	0,987
CR-Xf-Ca IIC2				1,000	0,990	0,997
CR-Xf-Vv Ic1					1,000	0,987
Xf vid ATCC35881 USA						1,000
	Valores de identidad comparación secuencia JB-1/JB-2					
	Xf Lar20/11Brasil	CR.Xf-C.s. IIC1	CR-Xf-C.s.Ic1	CR-Xf-Ca IIC2	CR-Xf-Vv Ic1	Xf vid ATCC35881 USA
Xf Lar20/11Brasil	1,000	0,889	0,856	0,849	0,846	0,848
CR.Xf-C.s. IIC1		1,000	0,907	0,948	0,948	0,947
CR-Xf-C.s.Ic1			1,000	0,909	0,906	0,907
CR-Xf-Ca IIC2				1,000	0,991	0,992
CR-Xf-Vv Ic1					1,000	0,987
Xf vid ATCC35881 USA						1,000

		10	20	30	40	50	60	
272-1/2int XI Lar20/11 Brasil	1	CGCAGCAGAA	GCCGCTCATC	TAAATAAAAT	ATGGACTTGG	CATGCGCCAT	TTCTGGAAGA	60
272-1/2int CR-XI-C s-IIIe1	1	CGCAGCAGCA	GCCGCTCATC	CAAATAAAAT	GTGAACTTGG	CACACGCCAC	TTTGGGAAGA	60
272-1/2int CR-C s Ic1	1	CGCAGCAGCC	GCCACTCATC	TAAATAAAAT	GTGGACTTGG	CACACGCCAC	TTTGGGAAGA	60
272-1/2int CR-XI-CaIIc2	1	CGCAGCAGCC	GCCACTCATC	TAAATAAAAT	GTGGACTTGG	CACACGCCAC	TTTGGGAAGA	60
272-1/2int CR-XF-Vv-Ic1	1	CGCAGCAGCC	GCCACTCATC	TAAATAAAAT	GTGGACTTGG	CACACGCCAC	TTTGGGAAGA	60
272-1/2int XI Vtd 35881 USA	1	CGCAGCAGCC	GCCACTCATC	TAAATAAAAT	GTGGACTTGG	CACACGCCAC	TTTGGGAAGA	60
		70	80	90	100	110	120	
272-1/2int XI Lar20/11 Brasil	61	CCGATTAACA	ACACATCTAT	GCCCATACCA	TTGAAACAACA	TCAATCACAA	ACACATCCTC	120
272-1/2int CR-XI-C s-IIIe1	61	CCGATTAACA	ACACATCTAG	GCCCATACCA	TTGAAACAACA	TCAATCACAA	ACACATCCTC	120
272-1/2int CR-C s Ic1	61	CCGATTAACA	ACACATCTAG	GCCCATACCA	TTGAAAAACA	TCAATCACAA	ACACATCGTC	120
272-1/2int CR-XI-CaIIc2	61	CCGATTAACA	ACACATCTAG	GCCCATACCA	TTGAAAAACA	TCAATCACAA	ACACATCGTC	120
272-1/2int CR-XF-Vv-Ic1	61	CCGATTAACA	ACACATCTAG	GCCCATACCA	TTGAAACAACA	TCAATCACAA	ACACATCCTC	120
272-1/2int XI Vtd 35881 USA	61	CCGATTAACA	ACACATCTAG	GCCCATACCA	TTGAAAAACA	TCAATCACAA	ACACATCGTC	120
		130	140	150	160	170	180	
272-1/2int XI Lar20/11 Brasil	121	TCCATACTAA	AATCCCTGGC	AACCCACAAC	TCATCTAGCC	AGACACAGCA	TATTTCCGCT	180
272-1/2int CR-XI-C s-IIIe1	121	TCCATACTAA	AATCCCTGGC	AACCCACAAC	TCATCTAGCC	AGACACAGCA	TATTTCCGCT	180
272-1/2int CR-C s Ic1	121	TGCATACTAA	AATCCCTGGC	AACCCACAAC	TCATCTAGTC	AGACACAGCA	TATTTCCGAT	180
272-1/2int CR-XI-CaIIc2	121	TGCATACTAA	AATCCCTGGC	AACCCACAAC	GCATCTAGCC	AGACACAGCA	TATTTCCGAT	180
272-1/2int CR-XF-Vv-Ic1	121	TGCATACTAA	AATCCCTGGC	AACCCACAAC	GCATCTAGCC	AGACACAGCA	TATTTCCGAT	180
272-1/2int XI Vtd 35881 USA	121	TGCATACTAA	AATCCCTGGC	AACCCACAAC	GCATCTAGCC	AGACACAGCA	TATTTCCGAT	180
		190	200	210	220	230	240	
272-1/2int XI Lar20/11 Brasil	181	CGAACTCTTA	TTTACTCACA	CACCGAACA	ACACACATCC	ATGAAACCCT	GTCCGCTATG	224
272-1/2int CR-XI-C s-IIIe1	181	CGAACTCTTA	TTTACTCACA	CACCGAACA	ACACACATCC	ATGAAACCCT	GTCCGCTATG	239
272-1/2int CR-C s Ic1	181	CGAACTCTTA	TTTACTCACA	CACCGAACA	ACACACATCC	ATGAAACCCT	GTCCGCTATG	240
272-1/2int CR-XI-CaIIc2	181	CGAACTCTTA	TTTACTCACA	CACCGAACA	ACACACATCC	ATGAAACCCT	GTCCGCTATG	240
272-1/2int CR-XF-Vv-Ic1	181	CGAACTCTTA	TTTACTCACA	CACCGAACA	ACACACATCC	ATGAAACCCT	GTCCGCTATG	240
272-1/2int XI Vtd 35881 USA	181	CGAACTCTTA	TTTACTCACA	CACCGAACA	ACACACATCC	ATGAAACCCT	GTCCGCTATG	240
		250	260	270	280	290	300	
272-1/2int XI Lar20/11 Brasil	225	AAACATCTTG	CGGCACCTT	ACTCACACAC	CGAGAGTCAG	AGATAACGTC	ACCAAAATTT	284
272-1/2int CR-XI-C s-IIIe1	240	AAACATCTTG	CGGCACCT		GAGTCAG	AGATAACGTC	ACCAAAATTT	283
272-1/2int CR-C s Ic1	241	AAACATCTTG	CGGCACCT		GAGTCAG	AGATAACGTC	ACCAAAATTT	284
272-1/2int CR-XI-CaIIc2	241	AAACATCTTG	CGGCACCT		GAGTCAG	AGATAACGTC	ACCAAAATTT	284
272-1/2int CR-XF-Vv-Ic1	241	AAACATCTTG	CGGCACCT		GAGTCAG	AGATAACGTC	ACCAAAATTT	284
272-1/2int XI Vtd 35881 USA	241	AAACATCTTG	CGGCACCT		GAGTCAG	AGATAACGTC	ACCAAAATTT	284
		310	320	330	340	350	360	
272-1/2int XI Lar20/11 Brasil	285	ATTAATACAC	ATCATGCAAA	GATGATGCC	CTACAGCATC	GGTATTCATT	CTCACCAAAA	344
272-1/2int CR-XI-C s-IIIe1	284	ATTAATACAC	ATCATGCAAA	GATGATGCC	CTACAGCATC	GGTATTCATT	CTCACCAAAA	343
272-1/2int CR-C s Ic1	285	ATTAATACAC	ATCATGCAAA	GATGATGCC	CTACAGCATC	GGTATTCATT	CTCACCAAAA	344
272-1/2int CR-XI-CaIIc2	285	ATTAATACAC	ATCATGCAAA	GATGATGCC	CTACAGCATC	GGTATTCATT	CTCACCAAAA	344
272-1/2int CR-XF-Vv-Ic1	285	ATTAATACAC	ATCATGCAAA	GATGATGCC	CTACAGCATC	GGTATTCATT	CTCACCAAAA	344
272-1/2int XI Vtd 35881 USA	285	ATTAATACAC	ATCATGCAAA	GATGATGCC	CTACAGCATC	GGTATTCATT	CTCACCAAAA	344
		370	380	390	400	410	420	
272-1/2int XI Lar20/11 Brasil	345	AACAGCACGA	TAAATTGCAC	CACACCTTTA	AATACAACAG	CCCACCTGAC	AGGAATGCTC	404
272-1/2int CR-XI-C s-IIIe1	344	AACAGCACGA	TAAATTGCAC	CACACCTTTA	AATACAACAG	CCCACCTGAC	AGGAATGCTC	403
272-1/2int CR-C s Ic1	345	AACAGCACGA	TAAATTGCAC	CACACCTTTA	AATACAACAG	CCCACCTGAC	AGGAATGCTC	404
272-1/2int CR-XI-CaIIc2	345	AACAGCACGA	TAAATTGCAC	CACACCTTTA	AATACAACAG	CCCACCTGAC	AGGAATGCTC	404
272-1/2int CR-XF-Vv-Ic1	345	AACAGCACGA	TAAATTGCAC	CACACCTTTA	AATACAACAG	CCCACCTGAC	AGGAATGCTC	404
272-1/2int XI Vtd 35881 USA	345	AACAGCACGA	TAAATTGCAC	CACACCTTTA	AATACAACAG	CCCACCTGAC	AGGAATGCTC	404
		430						
272-1/2int XI Lar20/11 Brasil	405	TCCGAAAGCG	GC					416
272-1/2int CR-XI-C s-IIIe1	404	TCCGAA	GCG	GC				414
272-1/2int CR-C s Ic1	405	TCCGAA	GCG	GC				415
272-1/2int CR-XI-CaIIc2	405	TCCGAA	GCG	GC				415
272-1/2int CR-XF-Vv-Ic1	405	TCCGAA	GCG	GC				415
272-1/2int XI Vtd 35881 USA	405	TCCGAAAGCG	GC					416

Figura 6. Secuencia de 416 nucleótidos obtenida del producto 272-1int/272-2int de diferentes aislamientos de *X. fastidiosa*. Las flechas indican los sitios de corte (G<sub>1</sub>CG<sub>1</sub>C) de la enzima de restricción *Cfo*-I. El asterisco indica el sitio de transición de la secuencia Lar 20/11. Los círculos indican la secuencia de 16 nucleotidos que se pierde de una posición y se reinserta en otra.

**Cuadro 3.** Frecuencia de bandas polimórficas amplificadas aleatoriamente (RADPs) en aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de diferentes hospederos

Alelo polimórfico	Frecuencia de banda		
	Cítricos	Vid	Café
OPA-02a	0,6667	0,9545	0,5000
OPA-02b	1,0000	1,0000	1,0000
OPA-02c	0,1667	0,0000	0,0000
OPA-02d	0,1667	0,0000	0,0000
OPA-02e	0,3333	0,0000	0,0000
OPA-02f	0,2222	0,5909	0,5000
OPA-02g	0,2778	0,0000	0,5000
OPA-02h	0,3889	1,0000	1,0000
OPA-02i	0,8333	0,0455	0,5000
OPA-02j	0,2778	0,5000	0,0000
OPA-02k	0,2778	0,1364	0,5000
OPA-02l	0,0000	0,6364	0,0000
OPA-02m	0,0000	0,3182	0,0000
OPA-03a	1,0000	0,9545	1,0000
OPA-03b	0,0000	0,6818	0,5000
OPA-03c	0,8333	1,0000	0,5000
OPA-03d	0,5000	1,0000	0,0000
OPA-03e	0,6111	0,5909	0,5000
OPA-03f	0,5000	0,8182	1,0000
OPA-03g	1,0000	0,8182	1,0000
OPA-03h	0,3333	0,0000	1,0000
OPA-09a	0,5000	0,5909	0,0000
OPA-09b	0,1667	0,0455	0,0000
OPA-09c	0,5556	0,0909	0,0000
OPA-09d	0,1667	0,5000	0,0000
OPA-09e	0,8889	0,8636	1,0000
OPA-09f	0,7778	0,2273	0,5000
OPA-09g	0,0000	0,1364	0,0000
OPA-09h	0,1667	0,0000	0,0000
OPA-09i	0,0000	0,0000	0,5000
OPA-09j	0,0000	0,0000	1,0000
OPD-20a	0,0000	0,9545	0,0000
OPD-20b	0,0000	0,9545	0,0000
OPD-20c	0,4444	0,9545	0,0000
OPD-20d	0,4444	0,3636	0,0000
OPD-20e	1,0000	1,0000	1,0000
OPD-20f	0,4444	0,5909	0,0000
OPD-20g	0,8333	0,0455	0,0000
OPD-20h	0,6667	1,0000	1,0000
OPD-20i	0,1667	0,0000	0,0000
OPD-20j	0,1111	0,0000	0,5000
OPD-20k	0,1111	0,0000	0,5000
OPG-19a	0,0000	0,9545	0,0000
OPG-19b	0,0556	0,9545	0,5000
OPG-19c	0,3333	0,0000	0,0000

Cuadro 3. Continuación

OPG-19d	0,0000	0,9545	0,0000
OPG-19e	0,1667	0,2727	0,0000
OPG-19f	0,1667	0,6818	0,5000
OPG-19g	0,4444	0,9545	0,0000
OPG-19h	0,0000	0,1818	0,0000
OPG-19i	0,0000	0,1364	0,0000
OPG-19j	0,1667	0,3182	0,0000
OPG-19k	0,0000	0,3182	1,0000
OPG-19l	0,3889	0,1364	0,0000
OPG-19m	1,0000	0,2727	0,5000
OPG-19n	1,0000	0,0000	0,0000
OPH-7a	0,5000	0,0000	0,0000
OPH-7b	0,6667	1,0000	1,0000
OPH-7c	0,1667	0,0000	0,5000
OPH-7d	0,2778	1,0000	0,5000
OPH-7e	0,8889	1,0000	1,0000
OPH-7f	0,1111	0,0455	0,0000
OPH-7g	0,0000	0,2727	0,0000
OPH-12a	0,0000	0,7727	0,0000
OPH-12b	0,0000	0,6364	0,0000
OPH-12c	0,0000	0,6818	0,0000
OPH-12d	0,0000	0,1818	0,0000
OPH-12e	1,0000	1,0000	1,0000
OPH-12f	0,0000	1,0000	1,0000
OPH-12g	0,0000	0,9545	0,5000
OPH-12h	0,6667	1,0000	1,0000
OPH-12i	0,1667	1,0000	0,5000
OPH-12j	0,3333	0,8636	1,0000
OPH-12k	0,0000	0,5909	0,0000
OPH-12l	0,8333	0,0000	0,0000
OPH-12m	0,8333	0,0000	0,0000
OPH-18a	0,1111	0,8636	0,0000
OPH-18b	0,5000	0,0000	0,0000
OPH-18c	0,7778	0,6818	0,0000
OPH-18d	1,0000	0,3182	1,0000
OPH-18e	0,6667	0,3182	0,5000
OPH-18f	0,2222	0,5455	1,0000
OPH-18g	0,2778	1,0000	0,0000
OPH-18h	0,5000	0,7273	0,0000
OPH-18i	0,5556	0,3182	0,0000
OPH-18j	0,0000	0,5455	0,0000
OPH-18k	0,0000	0,1364	0,0000
OPH-18l	0,0000	0,8182	0,0000
OPH-18m	0,0556	0,0000	0,0000
OPH-18n	0,0556	0,0000	0,0000
OPI-02a	0,2222	0,0000	0,5000
OPI-02b	0,8333	1,0000	1,0000
OPI-02c	0,3333	0,0000	0,0000
OPI-02d	0,1667	0,2273	0,0000

**Cuadro 3.** Continuación

OPI-02e	0,2222	0,0000	0,0000
OPI-02f	0,1667	0,0000	0,0000
OPI-02g	0,8889	1,0000	1,0000
OPI-02h	0,0000	0,3182	0,0000
OPN-04a	0,7778	0,2727	1,0000
OPN-04b	0,9444	0,9545	1,0000
OPN-04c	0,8333	1,0000	1,0000
OPN-04d	0,9444	0,9545	1,0000
OPN-04e	0,3333	0,7727	1,0000
OPN-04f	0,0000	0,1364	1,0000
OPU-10a	0,8889	1,0000	0,5000
OPU-10b	0,5000	0,0000	0,0000
OPU-10c	0,5556	1,0000	1,0000
OPU-10d	0,2222	0,0000	0,0000
OPU-10e	0,8333	1,0000	0,5000
OPU-10f	0,1667	0,0000	1,0000
OPU-10g	0,8333	1,0000	1,0000
OPU-10h	0,1667	0,0000	0,0000
OPU-10i	1,0000	1,0000	1,0000
OPU-10j	0,6667	1,0000	1,0000
OPU-10k	0,0000	0,0455	0,0000
OPU-10l	0,0000	0,4555	0,0000

**Cuadro 4.** Media de los valores de la diversidad genética ( $H$ ) de Nei para bandas polimórficas amplificadas aleatoriamente (RADPs) y el número de alelos polimórficos por el número total de alelos en aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de diferentes hospederos

Locus	Valor $H$ y el número total de alelos polimórficos/total de alelos*			
	Citrios	Vid	Café	General
OP-A02	0,288 (11/13)*	0,176 (9/13)	0,192 (7/13)	0,304
OP-A03	0,274 (7/8)	0,199 (7/8)	0,187 (7/8)	0,308
OP-A09	0,237 (7/10)	0,205 (7/10)	0,100 (4/10)	0,263
OP-D20	0,261 (9/11)	0,117 (8/11)	0,090 (4/11)	0,319
OP-G19	0,167 (9/14)	0,229 (12/14)	0,107 (4/14)	0,381
OP-H07	0,288 (6/7)	0,143 (5/7)	0,142 (4/7)	0,238
OP-H12	0,132 (6/13)	0,180 (11/13)	0,076 (6/13)	0,389
OP-H18	0,225 (11/14)	0,278 (11/14)	0,035 (3/14)	0,363
OP-I02	0,279 (7/8)	0,098 (4/8)	0,062 (3/8)	0,196
OP-N04	0,212 (5/6)	0,192 (6/6)	0,000 (6/6)	0,250
OP-U10	0,257 (10/12)	0,014 (8/12)	0,083 (7/12)	0,161
<b>Promedio</b>	0,231 (88/116)	0,166 (88/116)	0,099 (55/116)	0,299

\* Número de alelos polimórficos/total de alelos.

#### IV.3.G Análisis de datos generados por PCR-RAPDs

Al comparar los aislamientos obtenidos de los diferentes hospederos, se observó que la diversidad genética dentro de cada componente de la población ( $H_S$ ), representa una alta proporción de la diversidad genética total ( $H_T$ ) (Cuadro 5). La diversidad genética total encontrada para los cítricos fue mucho mayor que la encontrada entre las plantas de vid. En el caso de café esta diferencia fue mínima (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Estimación de la diversidad genética total de los aislamientos de *X. fastidiosa* y sus componentes (entre y dentro de cada hospedero) usando marcadores tipo RAPDs<sup>1</sup>

Comparación	n	$H_T$	$H_S$
Entre hospederos diferentes	42	0,2919	0,1657
Entre plantas de cítricos	18	0,2303	0,0842
Entre plantas de vid	22	0,1859	0,0383
Entre plantas de café	2	0,0991	0,0000

<sup>1</sup> Valores calculados en POPGENE como lo describe Nei (Nei y Li 1979). n, número de aislamientos en la población;  $H_T$ , diversidad genética de la población;  $H_S$ , diversidad genética dentro de cada componente de la población.

El análisis molecular de varianza reveló que existe variabilidad genética significativa ( $P < 0,001$ ) entre los aislamientos obtenidos de los diferentes hospederos o poblaciones, entre los aislamientos obtenidos de las plantas o subpoblaciones de cada hospedero y entre los aislamientos obtenidos de una misma planta (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Análisis molecular de varianza de aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de diferentes hospederos de Costa Rica y vid de Estados Unidos.

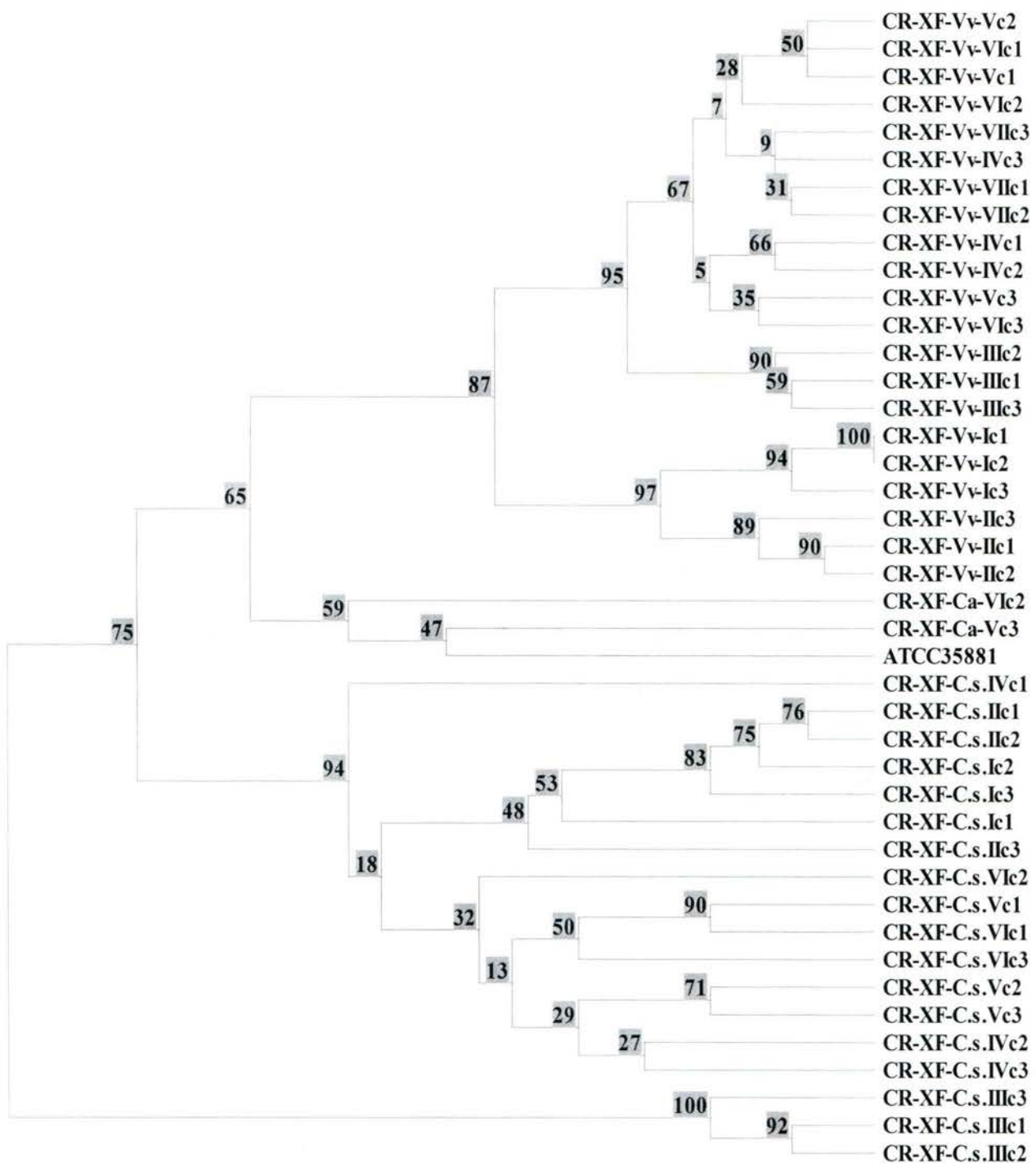
Fuente de variación <sup>1</sup>	Grados de libertad	$\Phi$	% total de varianza	Valor $P^2$
Entre hospederos	2	0,376	37.57	<0,001
Entre plantas de un mismo hospedero.	8	0,563	35.14	<0,001
Dentro de las plantas	31	0,727	27.29	<0,001

<sup>1</sup> Número total de aislamientos analizadas (n=42) fue dividida en ordenes jerárquicos 1, entre los diferentes hospederos; 2, entre plantas dentro de los hospederos, y 3 entre plantas (aislamientos obtenidos de la misma planta).

<sup>2</sup> probabilidad calculada en Winamova con 1000 permutaciones.



El dendrograma generado a partir de los datos obtenidos con la técnica de RAPDs (Figura 7) muestra que los aislamientos de *X. fastidiosa* de Costa Rica forman cuatro grupos: (i) aislamientos de vid, (ii) aislamientos de café, en este caso una de los aislamientos de café se asocia más cercanamente al aislamiento ATCC35881 de vid de Estados Unidos. (iii) la mayoría de los aislamientos de cítricos de Costa Rica y (iv) aislamientos CR-Xf-Cs-IIIc1, CR-Xf-Cs-IIIc2, CR-Xf-Cs-IIIc3 forman un grupo totalmente separado de los otros grupos y especialmente del grupo de los demás cítricos de Costa Rica, Este análisis confirma las diferencias observadas con la técnica de RFLPs.



**Figura 7.** Dendrograma basado en una matriz de similitud de datos generados mediante RAPDs, analizados por el método UPGMA, representando 42 aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de cítricos, café, vid de Costa Rica y vid de Estados Unidos. Valores en los nudos de cada rama indican los porcentajes de reemplazo (1000 permutaciones)

#### IV.4 Discusión

En el presente trabajo se utilizaron varias técnicas para estudiar la diversidad genética de aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de varios hospederos en Costa Rica. A su vez estos aislamientos se compararon genéticamente con aislamientos de cítricos de Brasil y vid de Estados Unidos.

Mediante PCR se logró amplificar ADN de cada uno de los aislamientos de *X. fastidiosa* utilizando los imprimadores 272-1int/272-2int (Pooler y Hartung 1995a) y JB-1/JB-2 (Ferreira *et al.* 2000), los cuales fueron generados a partir de análisis con RAPDs, y son utilizados para la detección de *X. fastidiosa* aislada de cualquier hospedero (Pooler y Hartung 1995a, Ferreira *et al.* 2000). En este estudio las bandas de amplificación obtenidas presentaron el tamaño correspondiente informado en la literatura (Pooler y Hartung 1995a, Ferreira *et al.* 2000).

Qin *et al.* (2001) informaron que al cortar el producto obtenido con los imprimadores 272-1in/272-2int con la enzima *Cfo*-I se pudo diferenciar los aislamientos de *X. fastidiosa* de café de los de cítricos, ambos procedentes de Brasil. Los aislamientos de café de Brasil compartieron el mismo perfil de restricción con aislamientos de almendra (*Prunus amigdalus*), vid (*Vitis vinifera*), olmo (*Ulmus* spp.), ciruela (*Prunus* sp.), ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia*), morera (*Morus* spp.) y roble (*Quercus* spp.) de Estados Unidos (Qin *et al.* 2001). En este estudio no fue posible diferenciar aislamientos de la bacteria obtenidos de los diferentes hospederos en Costa Rica ya que todos mostraron el mismo perfil de restricción (Figura 1). Tampoco fue posible establecer diferencias entre los aislamientos de vid de Costa Rica y el de Estados Unidos. Las diferencias únicamente fueron establecidas entre los aislamientos de cítricos de Brasil con respecto a los aislamientos de cítricos, café, vid de Costa Rica y vid de Estados Unidos (Figura 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Montero-Astúa *et al.* (2007) quienes al digerir ADN de aislamientos de *X. fastidiosa* de cítricos y café de São Paulo, Brasil observaron perfiles diferentes a los de los aislamientos de café, vid, cítricos de Costa Rica, y de vid, olmo y almendra de Estado Unidos. Esto sugiere que el origen de los aislamientos de Estados Unidos y Costa Rica fue diferente al de los aislamientos de São Paulo, Brasil.

Debido a que no se encontró variación en los perfiles de restricción con la enzima *Cfo*-I utilizando el producto de los imprimadores 272-1int/272-2int, se escogió el producto obtenido con los imprimadores JB-1/JB-2 (Ferreira *et al.* 2000) para realizar cortes con la enzima antes mencionada y otras 11 enzimas (*Alu*-I, *Bam*H-I, *Bcl*-I, *Cfo*-I, *Eco*R-I, *Hae*-III, *Hinf*-I, *Hpa*-II, *Mse*-I, *Rsa*-I, *Sau*3A-I, *Taq*-I). Las primeras nueve enzimas no habían sido previamente utilizadas para realizar digestión del producto JB-1/JB-2. Este producto tiene un tamaño de 1000 pb lo que permitió buscar variación en una porción más grande del genoma de los aislamientos analizadas obtenidos de los diferentes hospederos.

Entre los aislamientos de cítricos provenientes de Costa Rica, se observó que tres de ellos (CR-Xf-Cs.-IIIc1, CR-Xf-Cs.-IIIc2, CR-Xf-Cs.-IIIc3) mostraban perfil diferente con respecto a los demás aislamientos de cítricos los cuales fueron similares a los aislamientos de café, vid de Costa Rica y vid de Estados Unidos. Dicha diferencia se evidenció con las enzimas *Alu*-I, *Cfo*-I, *Hinf*-I, *Hpa*-II y *Taq*-I (Figuras 2, 3a y 3b). Estos tres aislamientos de cítricos de Costa Rica mostraron el mismo perfil que los aislamientos de cítricos de Brasil. En estudios realizados por Ferreira *et al.* (2000), se informa que al digerir el producto de los imprimadores JB-1/JB-2 con la enzima *Hinf*-I fue posible obtener dos patrones distintos: (i) café-cítricos y (ii) ciruela-narciso-vid, indicando diferencias en la secuencia de nucleótidos del producto de amplificación. Según Ferreira *et al.* (2000), pruebas posteriores demostraron que estas diferencias se localizaban en las regiones de anillamiento de los imprimadores. En este estudio, al cortar con la enzima *Hinf*-I (Figura 2) se obtuvo un patrón que asocia los aislamientos de vid de Estados Unidos con los de café, vid y la mayoría de los aislamientos de cítricos de Costa Rica, exceptuando los aislamientos CR-Xf-C.s IIIc1, CR-Xf-C.s IIIc2, CR-Xf-C.s IIIc3 que se asocian con los aislamientos de cítricos de Brasil incluidos en este estudio, los cuales muestran un patrón similar al obtenido por Ferreira *et al.* (2000).

Estos resultados sugieren que en Costa Rica existen al menos dos grupos de aislamientos de *X. fastidiosa* asociadas a cítricos. Uno de los grupos está muy relacionado con los aislamientos provenientes de Brasil y el otro relacionado con los aislamientos de café y vid de Costa Rica y el aislado de vid (ATTC35881) de Estados Unidos empleado en este estudio (Figuras 5 y 7). Esta asociación de aislamientos de *X. fastidiosa* de café con los

obtenidos de cítricos se evidenció en estudios realizados previamente (Chen *et al.* 1995, Pooler y Hartung 1995a, Rosato *et al.* 1998, Henderson *et al.* 2001, Lacava *et al.* 2001, Qin *et al.* 2001, Chen *et al.* 2002). Li *et al.* (2001), informaron que aislamientos de *X. fastidiosa* de cítricos pueden estar presentes en plantas de café y causar quemadura de la hoja de café (“coffee leaf scorch”, CLS).

Ninguna diferencia en los perfiles de restricción fue obtenida con las enzimas *Sau3A-I* y *Mse-I* (Figuras 4 a y b). Además, no se generó ningún perfil de restricción con las enzimas *Bcl-I*, *BamH-I*, *EcoR-I*, *Hae-III*. Estos resultados son consistentes a los descritos por Ferreira *et al.* (2000), quienes, al digerir el producto de los imprimadores JB-1/JB-2, de aislamientos de *X. fastidiosa* de cítricos, ciruela, café y narciso con las enzimas *Sau3A-I*, no observaron diferencias en los patrones de restricción.

En general, con la técnica de RFLPs, al digerir dos distintos fragmentos del genoma de *X. fastidiosa*, el nivel de variabilidad detectado entre aislamientos del mismo hospedero fue bajo. Qin *et al.* (2001) observaron limitada heterogeneidad entre aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de cítricos al cortar el producto 272-1int/272-2int con varias enzimas de restricción. Rosato *et al.* (1998) no observaron variación en los perfiles de restricción del fragmento 16-23S rDNA entre aislamientos de cítricos. En ambos casos los resultados se deben a que las secuencias no son lo suficientemente variables como para detectar heterogeneidad en el genoma. Este hecho muchas veces puede limitar los resultados que se obtienen con la técnica de PCR-RFLPs.

Al comparar las secuencias 272-1int/272-2int de los diferentes hospederos, con respecto a la secuencia del aislamiento Lar 20/11, se observaron transversiones (Figura 6). El fragmento generado por los imprimadores 272-2/272-1int se encuentra dentro de la secuencia delimitada por la combinación de los imprimadores CVC-1/272-2int (Pooler y Hartung 1995a), diseñados para la detección específica de *X. fastidiosa* causante de CVC. Al analizar la secuencia de este fragmento se observó que presenta un 50% de transversiones al compararla con las secuencias de los aislamientos CVC94-2 de cítricos en Brasil y el aislamiento 35887 de vid en California (Pooler y Hartung 1995b).

Como se indicó anteriormente, al digerir con la enzima *Cfo-I* la secuencia obtenida con los imprimadores 272-1int/272-2int únicamente fue posible establecer diferencias entre los

aislamientos de cítricos de Brasil con respecto a los aislamientos de Costa Rica y Estados Unidos. Esta diferencia pudo ser establecida debido a que en la posición 44 de la secuencia del aislamiento Lar20/11 existe una transición (cambio de A por G), lo cual hace que en la secuencia de este aislamiento hayan dos sitios de corte (G<sub>-</sub>CG'C) para la enzima *Cfo*-I, mientras que en los otros aislamientos hay un único sitio de corte entre las posiciones 83 y 84 (Figura 6).

A excepción de la secuencia del producto 272-1int/272-2int del aislamiento CR-Xf-C.s. IIIc, las secuencias de los productos de amplificación obtenidos con ambos imprimadores (272-1int/272-2int y JB-1/JB-2) de los aislamientos de Costa Rica y Estados Unidos presentaron mayor identidad con la secuencia del aislamiento Temecula. Estos resultados son similares a los obtenidos por Montero-Astúa *et al.* (2007), quienes al comparar secuencias del gen 16S rRNA de ocho aislamientos de *X. fastidiosa* de Costa Rica observaron que éstas tenían mayor identidad con la secuencia del aislamiento Temecula más que con el aislamiento 9a5c.

Los imprimadores utilizados para la técnica de RAPDs se seleccionaron basándose en estudios previos realizados en Brasil y Estados Unidos (Qin *et al.* 2001, Coletta-Filho y Machado 2002 y 2003). Se generaron un total de 116 bandas, las cuales fueron reproducibles al realizar cada reacción por triplicado. Esta técnica permitió determinar que existe variación genética entre y dentro de los diferentes aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de los diferentes hospederos en Costa Rica, y que existe una alta asociación de los aislamientos a los diferentes hospederos.

La diversidad genética entre las poblaciones contribuye en gran manera a la diversidad genética total de los aislamientos obtenidos (Cuadro 5). Diferencias genéticas entre aislamientos provenientes de la misma planta también lograron establecerse (Cuadro 4). Según Coletta-Filho *et al.* (2001), éstas diferencias pueden ser el resultado de múltiples inoculaciones por los vectores o recombinaciones genéticas, aunque aún no se conoce si *X. fastidiosa* es naturalmente competente para llevar a cabo este proceso; sin embargo, existen bacteriófagos, integrones, transposones, plásmidos presentes en esta especie bacteriana que pueden contribuir al proceso de recombinación como vectores naturales de genes (Coletta-Filho *et al.* 2001).

El dendrograma generado a partir de los datos de RAPDs (Figura 7) muestra claramente cuatro grupos: (i) todos los aislamientos de vid de Costa Rica, (ii) los aislamientos de café de Costa Rica y vid de Estados Unidos, (iii) la mayoría de los aislamientos de cítricos de Costa Rica y (iv) finalmente se observa que los aislamientos

CR-Xf-C.s.IIIc1, CR-Xf-C.s.IIIc2, CR-Xf-C.s.IIIc3, aunque fueron obtenidos de cítricos de Costa Rica, forman un grupo totalmente separado de los otros aislamientos también obtenidos de cítricos de Costa Rica (Figura 7). No se logró establecer ninguna relación entre los aislamientos de café y cítricos, como sí se estableció en Brasil (Qin *et al.* 2001). Al contrario, el aislamiento CR-Xf-Ca-Vc3 muestra asociación más cercana con el aislamiento de vid de Estados Unidos. En un estudio previo realizado por Montero-Astúa *et al.* (2007), se observó que este aislamiento de café está asociado a aislamientos obtenidos de morera (*Morus spp.*) de Estados Unidos.

La asociación de aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de cítricos de Costa Rica (CR-Xf-C.s.IIIc1, CR-Xf-C.s.IIIc2, CR-Xf-C.s.IIIc3) con los aislamientos Lar20/11 y Taq 30 de Brasil, fue establecida mediante RFLPs (Figura 5); sin embargo, esto no pudo ser comprobado por RAPDs debido a que no se contaba con ADN de los aislamientos de Brasil para realizar esta última técnica, por lo que para futuros estudios se recomienda verificar estas relaciones.

La diversidad genética entre aislamientos obtenidos de una misma planta hospedera, fue observada en el dendrograma generado a partir de los datos de RAPDs (Figura 5). Coletta-Filho y Machado (2002) observaron que existía una pequeña variación genética entre aislamientos de *X. fastidiosa* obtenidos de una misma planta de cítricos; sin embargo, la mayor diversidad se observaba entre plantas. Las diferencias observadas entre aislamientos de la misma planta son probablemente causa de múltiples inoculaciones por vectores ó recombinación genética (Coletta-Filho y Machado 2002), como ya se mencionó.

Debido a las diferencias encontradas en este estudio entre los aislamientos obtenidos de cítricos, los cuales forman dos grupos independientes, es necesario realizar otros estudios con mayor número de aislamientos y regiones de procedencia de los hospederos para determinar el grado de diversidad entre los aislamientos de *X. fastidiosa* de Costa Rica.

#### IV.5 Literatura citada

- Albibi, R; Chen, J; Lamikanra, O; Banks, D; Jarret, RL; Smith, BJ. 1998. RAPD fingerprint *Xylella fastidiosa* Pierce's Disease strains isolated from a vineyard in North Florida. FEMS Microbiology Letters 165: 347-352.
- Ausubel, FM; Brent, R; Kingston, RE; Moore, DD; Seidman, JG; Smith, JA; Struhl, K. 1990. Current protocols in molecular biology. New York, Wiley & Sons. p.2.4.1-2.4.5.
- Aguilar, E; Villalobos, W; Moreira, L; Rodriguez, CM; Kitajima, EW; Rivera, C. 2005. First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica. Plant Disease 89: 687.
- Bhattacharyya, A; Stilwagen, S; Ivanova, N; D'Souza, M; Bernal, A; Lykidis, A; Kapatral, V; Anderson, I; Larsen, N; Los, T; Reznik, G; Selkov, E; Walunas, T; Feil, H; Feil, W; Purcell, A; Lassez, J; Hawkins, T; Haselkorn, R; Overbeek, R; Predki, P; Kyrpidis, N. 2002a. Whole genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. Proceedings of the National Academy of Science 99: 12403-12408.
- Bhattacharyya, A; Stilwagen, S; Reznik, G; Feil, H; Feil, W; Anderson, I; Bernal, A; D'Souza, M; Ivanova, N; Kapatral, V; Larsen, N; Los, T; Lykidis, A; Selkov, E; Walunas, T; Purcell, A; Edwards, R; Hawkins, T; Haselkorn, R; Overbeek, R; Kyrpidis, N; Predki, P. 2002b. Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. Genome Research 12: 1556-1563.
- Beretta, MJ; Harakava, R; Chagas, CM; Derrick, KS; Barthe, GA; Ceccardi, TL; Lee, RF; Paradela, O; Sugimori, M; Ribeiro, IA. 1996. First report of *Xylella fastidiosa* in Coffee. Plant Disease 80: 821.
- Coletta-Filho, HD; Machado, MA. 2003. Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo State, Brazil. Phytopathology 93: 28-34.
- Coletta-Filho, HD; Machado, MA. 2002. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different *Citrus sinensis* varieties. Applied and Environmental Microbiology 68: 3731-3736.
- Coletta-Filho, HD; Takita, MA; Alves, A; Aguilar, CI; Machado, MA. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. Applied Environmental Microbiology 67: 4091-4095.
- Chang, CJ; Donaldson, RC. 1993. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. Phytopathology 83: 192-194.
- Chen, J; Groves, R; Civerolo, Viveros, M; Freeman, M; Zheng, Y. 2005. Two *Xylella fastidiosa* genotypes associated with almond leaf scorch disease on the same location in California. Phytopathology. 95: 708-714.



- Chen, J; Hartung, JS; Chang, CJ; Vidaver, AK. 2002. An evolutionary perspective of Pierce's disease of grapevine, citrus variegated chlorosis, and mulberry leaf scorch disease. *Current Microbiology* 45: 423-428.
- Chen J; Lamikanra, O; Chang, CJ; Hopkins, DL. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* pierce disease and oak leaf scorch pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1688-1690.
- Chen, J; Chang, CJ; Jarret, RL; Gawel, N. 1992. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. *Phytopathology* 82: 973-977.
- Excoffier, L; Smouse, P. E; Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Ferreira, H; Goncalves, RE; Rodriguez, NJ; Rosato, YB. 2000. Primers specifics for *Xylella fastidiosa* based on RAPD differential fragments. *Summa Phytopathologica* 26: 15-20.
- Frohme, M; Camargo, A; Heber, S; Czinc, C; Simpson, A; Hoheisel, J; De Souza, A. 2000. Mapping analysis of the *Xylella fastidiosa* genome. *Nucleic Acids Research* 28: 3100-3104.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleid Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hartung, JS; Beretta, J; Brlansky, RH; Spisso, J; Lee, R. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84: 591-597.
- Hendson, M; Purcell, AH; Chen, D; Smart, C; Guilhabert, M; Kirkpatrick, B. 2001. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 895-903.
- Hopkins, DL; Purcell, AH. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent disease. *Plant Disease* 86: 1056-1066.
- Lacava, P. T., Araújo, W. L., Maccheroni, W., Jr., and Azevedo, J. L. 2001. RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis. *Letters Applied Microbiology* 33: 302-306.
- Li, W-B; Pria-Junior, WD; Texeira, DC; Miranda, VS; Ayres, AJ; Franco, CF; Costa MG; He, C-X; Costa, PI; Hartung, JS. 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. *Plant Disease* 85: 501-505

- Mehta, A; Leite Junior, RP; Rosato, YB. 2001. Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus in Brazil by PCR-RFLP of the 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer and rep-PCR fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79: 53-59.
- Mehta, A; Rosato, YB. 2001. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts, based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 311-318.
- Meinhardt, LW; Ribeiro, M; Coletta-Filho, H; Dumenyo, CK; Tsai, SM; Bellato, C. 2003. Genotypic analysis of *Xylella fastidiosa* isolates from different hosts using sequences homologous to the *Xhantomonas rpf* genes. *Molecular Plant Pathology* 4: 327-335.
- Montero-Astúa, M; Hartung, JS; Aguilar, E; Chacón, C; Li, W; Albertazzi, FJ; Rivera, C. 2007. Genetic Diversity of *Xylella fastidiosa* strains from Costa Rica, São Paulo, Brazil, and United States. *Phytopathology* 97: 1338-1347.
- Montero-Astúa, M; Saborio, G; Chacón, C; Villalobos, W; Moreira, L; Hartung, J; Rivera, C. 2008. First report of *Xylella fastidiosa* in Avocado. *Plant Disease* 92: 175.
- Moreira, L; Villalobos, W; Rodríguez, CM; Rivera, C. 2002. Presencia de *Xylella fastidiosa* en algunas especies de Costa Rica. *In Resúmenes 42<sup>a</sup> Reunión de la Sociedad Americana de Fitopatología-División Caribe Guatemala 17-19 de junio.* p. 75.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academic of Science.* 76: 5269-5273
- Pooler, M; Hartung, J. 1995a. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31: 377-381.
- Pooler, M; Hartung, JS. 1995b. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. *Current Microbiology* 31: 134-137.
- Rodríguez, CM; Obando, JJ; Villalobos, W; Moreira, L; Rivera C. 2001. First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica. *Plant Disease* 85: 1027.
- Rosato, Y. B., Neto, J. R., Miranda, V. S., Carlos, E. F., and Manfio, G. P. 1998. Diversity of a *Xylella fastidiosa* population from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. *Systematic Applied Microbiology* 21: 593-598.
- Rossetti, V; Gonzales, MA; Donadio, LC. 1998. History. *In Citrus variegated chlorosis*, Donadio; LC; Soares, C. eds. Bebedouro, Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. p. 1-18.

- Qin, X; Miranda, VS; Machado, MA; Lemos, EG; Hartung, JS. 2001. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from disease citrus and coffee in São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 91: 599-605.
- Schaad, NW; Postnikova, E; Lacy, G; Fatm, MB; Chang, CJ. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp *multiplex*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp *pauca*, subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 290-300.
- Schuenzel, EL; Scally, M; Stouthamer, R; Nunney, L. 2005. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in north American strains of plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3832-3839.
- Simpson, AJS; Reinach, FC; Arruda, P; Abreu, FA; Acencio, M; Alvarenga, R; Alves, LMC; Araya, JE; Baia, GS; Baptista, CS; Barros, MH; Bonaccorsi, ED; Bordin, S; Bové, JM; Briones, MRS; Bueno, MRP; Camargo, AA; Camargo, LEA; Carrazo, DM; Carrer, H; Colauto, NB; Colombo, C; Costa, FF; Costa, MCR; Costa-Neto, CM; Coutinho, LL; Cristofani, M; Dias-Neto, E; Docena, C; El-Dorry, H; Facincani, AP; Ferreira, AJS; Ferreira, VCA; Ferro, JA; Fraga, JS; Franca SC; Franco, MC; Frohme, M; Furlan, LR; Garnier, M; Goldman, GH; Goldman, MHS; Gomes, SL; Gruber, A; Ho, PL; Hoheisel, JD; Junqueira, ML; Kemper, EL; Kitajima, JP; Krieger, JE; Kuramae, EE; Laigret, F; Lambais, MR; Leite, LCC; Lemos, EGM; Lemos, MVF; Lopes, SA; Lopes, CR; Machado, JA; Machado, MA; Madeira, AMBN; Madeira, HMF; Marino, CL; Marques, MV; Martins, EAL; Martins, EMF; Matsukuma, AY; Menck, CFM; Miracca, EC; Miyaki, CY; Monteiro-Vitorrello, CB; Moon, DH; Nagai, MA; Nascimento, ALTO; Netto, LES; Nhani-Junior, A; Nobrega, FG; Nunes, LR; Oliveira, MA; Oliveira, MC de; Oliveira, RC de; Palmieri, DA; Paris, A; Peixoto, BR; Pereira, GAG; Pereira Junior, HA; Pesquero, JB; Quaggio, RB; Roberto, PG; Rodrigues, V; Rosa, Aj de M; Rosa Junior, VE de; Sá, RG de; Santelli, RV; Kawasaki, HE; Silva, ACR da; Silva, AM da; Silva, FR da; Silva Junior, WA; Silveira, JF da; Silvestre, MLZ; Siueira, WJ; Souza, AA de; Souza, AP de; Terenzi, MF; Truffi, D; Tsai, SM; Tsuhako, MH; Vallada, H; Van Sluys, MA; Verjovski-Almeida, S; Vettore, AL; Zago, MA; Zatz, M; Meidanis, J; Setubal, JC. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406: 151-157.
- Van Sluys, MA; Oliveira, MC; Vitorrello, CB; Miyaki, CY; Furlan, LR; Camargo, LE; Da Silva, AC; Moon, DH; Takita, MA; Lemos, EG; Machado, MA; Ferro, MI; Da Silva, FR; Goldman, MH; Goldman, GH; Lemos, MV; El-Dorry, H; Tsai, SM; Carrer, H; Carraro, DM; De Oliveira, RC; Nunes, LR; Siqueira, WJ; Coutinho, LL; Kimura, ET; Ferro, ES; Harakava, R; Kuramae, EE; Marino, CL; Giglioti, E; Abreu, IL; Alves, LM; Do Amaral, AM; Baia, GS; Blanco, SR; Brito, MS; Cannavan, FS; Celestino, AV; Da Cunha, AF; Fenille, RC; Ferro, JA; Formighieri, EF; Kishi, LT; Leoni, SG; Oliveira, AR; Rosa Jr, VE; Sasaki, FT; Sena, JA; De Souza, AA; Truffi, D; Tsukumo, F; Yanai, GM; Zaros, LG; Civerolo, EL; Simpson, AJ; Almeida Jr, NF; Setubal, JC; Kitajima, JP. 2003. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's Disease and

- Citrus Variegated Chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology* 185: 1018-1026.
- Van de Peer, Y; De Wachter, R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Application Bioscience* 10: 569-570.
- Villalobos, H. 2000 Análisis genético molecular de tres valiosas especies nativas maderables de Costa Rica. Tesis Magister. Scientiae. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 109 p.
- Wells, JM; Raju, BC; Hung, HY; Weisburg, WG; Mandelco-Paul, L; Brenner, DJ. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. nov: Gram negative, xylem limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 136-143.
- Yeh, F. C., Boyle, T., Yang, R. C., Ye, Z., and Xiyan, J. M. 1999. POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research.

## **CAPÍTULO V**

---

### **Discusión general**

## Discusión General

---

En Costa Rica, el primer informe de la presencia de una enfermedad asociada a *Xylella fastidiosa* se dió en 1978, cuando Goheen y colaboradores aislaron la bacteria causante del mal de Pierce de plantas de vid sintomáticas procedentes de la zona de Montezuma en la provincia de Puntarenas (Goheen *et al.* 1979). Estudios posteriores realizados entre 1982 y 1983 demostraron que existían hospedantes alternos y vectores de la bacteria en las provincias de Puntarenas, Alajuela, Guanacaste y Cartago (Mora 1982, Barrantes 1983).

En el 2002, síntomas similares a los causados por la clorosis variegada de los cítricos y Mal de Pierce se observaron por primera vez en Costa Rica en árboles de naranja dulce [*Citrus sinensis* (L) Osbeck] y nuevamente en plantaciones de vid, respectivamente (Cap II, figura 1, Cap. III, figura 1) (Aguilar *et al.* 2005)

En este estudio se confirmó mediante la técnica de DAS-ELISA que dichos síntomas son causados por la bacteria *X. fastidiosa* en 21 de 35 (60%) árboles de naranja dulce procedentes de ocho diferentes distritos de Costa Rica y en 16 de 24 (66%) plantas de *Vitis vinifera* procedentes de la Garita (Alajuela) y de Santa Ana y La Uruca en San José (Cap. II, cuadro 1 y cap. III, cuadro 1).

La técnica de DAS-ELISA es el método por excelencia utilizado para realizar diagnósticos iniciales de la presencia de *X. fastidiosa* en tejido vegetal (Sherald y Lei 1991); sin embargo, como lo muestran los resultados en este trabajo, no en todos los casos donde se observaron síntomas de CVC y mal de Pierce se obtuvieron resultados positivos para la presencia de la bacteria al analizar el tejido vegetal. Varias razones pueden explicar este hecho: (i) la baja concentración de la bacteria existente en las muestras analizadas. Nomé *et al.* (1980) y Raju *et al.* (1983) informaron que la bacteria puede ser detectada en tejido vegetal por ELISA sólo cuando ésta se encuentra en concentraciones de  $10^5$  células por mililitro. Minsavage *et al.* (1994), al realizar ensayos consistentes en diluir suspensiones de la bacteria y posteriormente adicionarlas a extractos de pecíolos de cítricos y vid, observaron que la bacteria se detectó por ELISA, sólo si se encontraba a una

concentración de  $2 \times 10^4$  o  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (cfu) por mililitro. Varios investigadores han informado que la concentración de la bacteria en el tejido vegetal puede verse afectada dependiendo de la época del año. Hopkins (1981) informó que en plantas de vid, en Estados Unidos, se encuentran altas concentraciones de la bacteria en los meses de junio y julio, pero en el mes de octubre éstas se reducen considerablemente. En el caso de cítricos, Hopkins *et al.* (1991) observaron que la detección de la bacteria en extractos de raíces y tallo fue posible entre los meses de junio-agosto y diciembre-febrero, mientras que en abril, mayo y octubre no fue posible llevar a cabo la detección. (ii) La distribución no es homogénea de la bacteria en el tejido vegetal, ya que *X. fastidiosa* no presenta una colonización uniforme de los vasos del xilema de la planta hospedera, y normalmente se encuentra en forma de agregados que tienden a acumularse en partes específicas de la planta (Nomé *et al.* 1980, Hopkins 1989, Nomé *et al.* 1992, Purcell y Hopkins 1996, He *et al.* 2000, Yorinori *et al.* 2003). (iii) En última instancia, en el caso de los árboles de cítricos, el hecho de no detectar la bacteria en el tejido vegetal puede deberse a que los síntomas observados sean causados por otros factores, no determinados en este estudio como por ejemplo deficiencias nutricionales.

A partir de cada una de las plantas de vid y naranja dulce, previamente identificadas como positivas para la presencia de la bacteria, se realizaron diferentes intentos de aislamiento en medio de cultivo líquido. Dos medios de cultivo (“periwinkle wilt” PW y “periwinkle wilt supplemented” PWS) fueron inicialmente utilizados en el caso de vid; sin embargo, en intentos subsecuentes de aislamiento, el medio PWS dejó de utilizarse debido a que se contaminaba más rápidamente y con mayor frecuencia que el PW. Esto se debe a que el medio PWS es mucho más rico en nutrientes, lo cual favorece el crecimiento de microorganismos saprófitos. Por lo tanto, sería más recomendable utilizar el medio PWS para subcultivos de colonias puras de la bacteria y no para intentos iniciales de aislamiento a partir de tejido vegetal ya que éste viene con una alta carga de contaminantes. En el caso de los aislamientos a partir de cítricos únicamente se utilizó el medio PW por las razones antes mencionadas.

A pesar de que 21 árboles de cítricos y 16 plantas de vid fueron positivos para la presencia de la bacteria, sólo a partir del 19% (4/21) y 35.7% (6/16) de los cítricos y vid,

respectivamente, fue posible aislar y purificar la bacteria en medio sólido (Cap. II, cuadro 1). Al igual que en otros estudios realizados por diversos investigadores (Davis *et al.* 1981, Purcell y Hopkins 1996, Buzcan *et al.* 2005), se observó que la contaminación del medio líquido y sólido con hongos y bacterias saprófitas fue el principal factor limitante en el aislamiento de la bacteria en conjunto con su lenta tasa de crecimiento (cap II, Cuadro 2). Hopkins *et al.* (1991), obtuvieron un porcentaje de aislamiento menor al 10% a partir de árboles de cítricos identificados como positivos para la presencia de la bacteria, atribuyendo este resultado al crecimiento acelerado de contaminantes que se encuentran en la muestra y que inhiben el crecimiento de *X. fastidiosa*. Al igual que en la detección de la bacteria por DAS-ELISA, la concentración de la bacteria en el tejido vegetal y la distribución heterogénea de la bacteria en el mismo, pueden también tener un efecto en el éxito del aislamiento de la bacteria. Por ejemplo, Campanharo *et al.* (2003), realizando investigaciones sobre métodos de cultivo de *X. fastidiosa*, observaron que la bacteria crece de manera rápida y con fases lag cortas cuando un alto número de células es utilizado como inóculo; sin embargo, cuando el inóculo contiene un bajo número de células, la fase lag es muy larga. Esto sugiere que probablemente en el crecimiento de la bacteria intervenga un sistema de sensibilidad al número de células (Campanharo *et al.* 2003).

Se observaron diferencias en el crecimiento en el medio líquido, los aislamientos de vid tienden a formar agregados en el fondo del tubo de cultivo (Cap. III), lo cual nunca se observó en los aislamientos de cítricos (Cap. II). Davis *et al.* (1981) observaron agregados de células adheridas al vidrio y en la superficie del medio de cultivo cuando aislados de *X. fastidiosa* obtenidos de ciruela y vid fueron cultivados en PW líquido. Además, al cultivar los aislados de vid se observó que el medio PW se tornaba color rojo oscuro (Cap. III), esto no se observó en el caso de los aislamientos a partir de cítricos (Cap. II). Davis *et al.* (1981) atribuyen este hecho al cambio de pH que se da en el medio debido a las sustancias de desecho liberadas por el metabolismo de la bacteria.

En el medio PW sólido se observaron diferencias en el tiempo de crecimiento y el diámetro de las colonias de *X. fastidiosa*. Todos los aislamientos de vid y la mayoría de los aislamientos de cítricos crecieron en un período de 15 días y sus diámetros oscilaron entre 0,5-1 mm (Cap. II y III). Los aislamientos CR-Xf-C.s.-IIIc1, CR-Xf-C.s.-IIIc2 y CR-Xf-



C.s.-IIIc3 obtenidos a partir de una planta de cítricos procedente de Grecia crecieron en un período de 30 días y el diámetro de las colonias fue de 0,4-0,7 mm (Cap. II). Múltiples informes sobre diferencias en el crecimiento, tamaño de las colonias y requerimientos nutricionales entre aislamientos de *X. fastidiosa* procedentes de la misma planta hospedera, así como, entre aislamientos procedentes de diferentes hospederos han sido publicados (Fry y Milholland 1990, Uchiababa *et al.* 1992, Chang y Donaldson 1993 Campanharo *et al.* 2003, Lemos *et al.* 2003, Almeida *et al.* 2004).

Todos los aislamientos obtenidos de cítricos y vid mostraron reacción Gram negativa, además, los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas (catalasa y oxidasa) fueron similares a los informados en la literatura al momento de describir el género *Xylella* y la especie *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.* 1987) (Cap. II y III). Células con pared celular rugosa de aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro y 3,8  $\mu\text{m}$  de longitud similares a lo descrito por Mollenhauer y Hopkins (1974) se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión (Cap. II, figura 3 y cap III, figura 3).

La identidad de todos los aislados de vid y cítricos se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los imprimadores 272-1int/272-2int y los RST-31/ RST-33 diseñados para la detección de *X. fastidiosa* aislada de distintos hospederos (Minsavage *et al.* 1994, Pooler y Hartung 1995), se utilizaron con éxito en este estudio, ya que se logró la amplificación de bandas de 500 pb y 733 pb, respectivamente, a partir de todos los aislados (Cap, II figura 4 y cap III, figura 4)

Al evaluar los aislamientos de cítricos por PCR utilizando los primers 272-1int/CVC-1, diseñados por Pooler y Hartung (1995), para la detección específica de *X. fastidiosa* aislada de cítricos y causante de CVC, se obtuvo la primera evidencia de diferencias genéticas entre aislamientos, ya que únicamente a partir de los aislamientos CR-Xf-C.s.-IIIc1, CR-Xf-C.s.-IIIc2 y CR-Xf-C.s.-IIIc3 se logró amplificar una banda de 500 pb (Cap. II, figura 4c).

Estas diferencias se estudiaron más profundamente utilizando la técnica de RFLPs y RAPDs. Para ello, además de los aislamientos de vid y cítricos se incluyeron en el estudio aislamientos de café de Costa Rica, vid de Estados Unidos y cítricos de Brasil. Cortes de los productos de amplificación obtenidos con los imprimadores 272-1int/272-2int a partir

de todos los aislamientos de vid, cítricos y café de Costa Rica, vid de Estados Unidos y cítricos de Brasil, se realizaron con la enzima *Cfo*-I debido a que en un estudio realizado por Qin *et al.* (2001) se pudo diferenciar cepas de *X. fastidiosa* de café de las de cítricos, ambas procedentes de Brasil. En este estudio caso, todas las cepas aisladas de diferentes hospederos en Costa Rica y la cepa de vid de Estados Unidos mostraron el mismo perfil de restricción. Las cepas de cítricos de Brasil mostraron un patrón diferente con respecto a las cepas de cítricos, café, vid de Costa Rica y vid de Estados Unidos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Montero-Astúa *et al.* (2007) y sugieren que probablemente las cepas de cítricos de Costa Rica tengan un origen diferente al de las cepas de cítricos de São Paulo, Brasil.

Al comparar la secuencia del producto de los imprimadores 272-1/272-2int de cepas de cítricos, café, vid de Costa Rica, vid Estados Unidos con la cepa Lar 20/11 de cítrico de Brasil (Cap. IV, figura 6), se observó que en la secuencia de la cepa de Brasil en la posición existe una transición (cambio de A por G), lo cual hace que en la secuencia de este aislamiento haya ganancia de un sitio de corte (G\_CG'C) para la enzima *Cfo*-I, generando de esta forma perfiles de restricción diferentes (Cap. IV, figura 1).

Mayor variación genética se obtuvo al cortar el producto de los imprimadores JB-1/JB-2 (Ferreira *et al.* 2000) con 11 enzimas de restricción (*Alu*-I, *Bam*H-I, *Bcl*-I, *Cfo*-I, *Eco*R-I, *Hae*-III, *Hinf*-I, *Hpa*-II, *Mse*-I, *Rsa*-I, *Sau*3A-I, *Taq*-I). Al cortar con las enzimas *Alu*-I, *Cfo*-I, *Hinf*-I, *Hpa*-II y *Taq*-I se observó que tres cepas (CR-Xf-Cs.-IIIc1, CR-Xf-Cs.-IIIc2, CR-Xf-Cs.-IIIc3) mostraban perfil similar a las cepas de Brasil pero diferente con respecto a los demás aislados de cítricos de Costa Rica los cuales mostraron perfil similar a los aislados de café, vid de Costa Rica y vid de Estados Unidos. Con la enzima *Hinf*-I se obtuvo un patrón que asocia las cepas de vid de Estados Unidos con las de cepas café, vid y todos las cepas de cítricos de Costa Rica, exceptuando las cepas CR-Xf-C.s IIIc1, CR-Xf-C.s IIIc2, CR-Xf-C.s IIIc3 que se asocian con las cepas de cítricos de Brasil (Cap. IV, figura 2). Los resultados obtenidos en esta parte del estudio sugieren que en Costa Rica existen al menos dos grupos de cepas de *X. fastidiosa* asociadas a cítricos. Uno de los grupos está más relacionado con las cepas provenientes de Brasil y el otro está relacionado con las cepas de café y vid de Costa Rica, y vid de Estados Unidos. Al generar el

dendrograma a partir de los datos generados con los RFLPs, se observó que los aislados se dividen en tres grupos (1) vid y café de Costa Rica-vid Estados Unidos, (2) cítricos de Costa Rica, (3) las cepas de cítricos de Costa Rica (CR-Xf-Cs-IIIc1, CR-Xf-Cs-IIIc2, CR-Xf-Cs-IIIc3)-cítricos de Brasil (Lar 20/11, Taq 30). Por tanto, la técnica de RAPDs con la serie de imprimadores empleados permite la separación de las cepas de vid de Costa Rica con respecto a las de café de Costa Rica y vid de Estados Unidos (Cap. IV, figura 7).

Mediante la técnica de RAPDs no fue posible establecer si existe alguna asociación genética entre las de cepas de *X. fastidiosa* aisladas de cítricos en Costa Rica con las cepas de Brasil debido a que no se contó con ADN de las cepas de Brasil al momento de realizar esta prueba, por lo que se sugiere en un futuro verificar estas relaciones.

El análisis molecular de varianza (Cap. IV, cuadro 6) reflejó que existen diferencias genéticas entre aislados obtenidos de la misma planta. Estas diferencias pueden ser el resultado de múltiples inoculaciones por los vectores o recombinaciones genéticas naturales, aunque aún no se conoce si *X. fastidiosa* es naturalmente competente para llevar a cabo este proceso; sin embargo, existen bacteriófagos, integrones, transposones, plásmidos presentes en esta especie bacteriana que pueden contribuir al proceso de recombinación como vectores naturales de genes (Coletta-Filho *et al.* 2001).

Debido a las diferencias establecidas mediante PCR con los imprimadores 272-2int/CVC-1, RFLPs y RAPDs entre las cepas aisladas de cítricos de Costa Rica (Cap. IV, figura 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), las cuales forman dos grupos independientes, es necesario realizar otros estudios aumentando el número de cepas y regiones de procedencia de los hospederos, para determinar si existe mayor diversidad entre las cepas de *X. fastidiosa* de Costa Rica.

El hecho de encontrar la bacteria infectando árboles de cítricos en las diferentes zonas donde se realizó este estudio, y además en zonas donde se encuentran las grandes plantaciones de cítricos de Costa Rica representa una amenaza para el cultivo de naranja dulce en Costa Rica donde, en el año 2005, la producción de naranja dulce alcanzó 400.000 tm (Coronado 2005). El 10% del total de esta producción se destina al consumo interno fresco y el 90% restante se dirige al proceso agroindustrial de concentrado, el cual se exporta a países centroamericanos, Estados Unidos, Holanda, Gran Bretaña (Cockrell y

Barrantes 1998, Coronado 2005). Por tal razón se recomienda establecer un plan de prácticas de manejo dirigidas a evitar pérdidas económicas como las que se han dado en Brasil a causa de la presencia de este patógeno.

#### IV.2 Literatura citada

- Aguilar, E; Villalobos, W; Moreira, L; Rodriguez, CM; Kitajima, EW; Rivera, C. 2005. First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica. *Plant Disease* 89: 687.
- Almeida, RP; Mann, R; Purcell, AH. 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. *Current Microbiology* 48: 368-372.
- Barrantes, V.A. 1983. Insectos portadores de la bacteria causante del mal de pierce de la vid en Costa Rica. Tesis Licenciatura, San José, CR, Universidad de Costa Rica. 62p.
- Buzkan, N; Kocsis, L; Walker, LA. 2005. Detection of *Xylella fastidiosa* from resistant and susceptible grapevine by tissue sectioning and membrane entrapment immunofluorescence. *Microbiological Research* 160: 225-231.
- Campanharo, JC; Lemos, MV; Lemos, EG. 2003. Growth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Opinion Microbiology* 46: 99-102.
- Chang, CJ; Donaldson, RC. 1993. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. *Phytopathology* 83: 192-194.
- Cockrell, MB; Barrantes, ES. 1998. Cítricos fruticultura especial. EUNED, San José, Costa Rica. 98p.
- Coronado, MA. 2005. Memoria curso sobre producción y comercialización de la naranja *Citrus sinensis*. Guanacaste, Costa Rica.
- Coletta-Filho, HD; Takita, MA; Alves, A; Aguilar, CI; Machado, MA. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Applied Environmental Microbiology* 67: 4091-4095.
- Davis, M; French, J.W; and Schaad, N.W. 1981 Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* 6: 309-314.
- Ferreira, H; Goncalves, RE; Rodriguez, NJ; Rosato, YB. 2000. Primers specifics for *Xylella fastidiosa* based on RAPD differential fragments. *Summa Phytopathologica* 26: 15-20.
- Fry, SM; Milholland, RD. 1990. Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's disease bacterium, *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 80: 66-69.
- Goheen, AC; Raju, BC; Lowe, SK; Nyland, G. 1979. Pierce's disease of grapevine in Central America. *Plant Disease Reporter* 63: 788-792.

- He, CX; Li, WB; Ayres, AJ; Hartung, JS; Miranda, VS; Teixeira, DC. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease* 84: 622-626.
- Hopkins, DL. 1989. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review Phytopathology* 27: 271-290
- Hopkins, DL. 1981. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles and leaf veins. *Phytopathology* 71: 415-418.
- Hopkins, DL; Bistline, FW; Russo, LW; Thompson, CM. 1991. Seasonal fluctuation in the occurrence of *Xylella fastidiosa* in root and stem extracts from citrus with blight. *Plant Disease* 75: 145-147.
- Lemos, EG; Alves, LM; Campanharo, JC. 2003. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiology* 219: 39-45.
- Minsavage, GV; Thompson, CM; Hopkins, DL; Leite, RMVBC; Stall, RE. 1994. Development of a Polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-461.
- Mollenhauer, HH; Hopkins DL. 1974. Ultrastructural study of Pierce's disease bacterium in grape xylem tissue. *Journal of Bacteriology* 119: 612-618.
- Montero-Astúa, M; Hartung, JS; Aguilar, E; Chacon, C; Li, W; Albertazzi, F; Rivera, C. 2007 Genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from Costa Rica, Sao Paulo, Brazil, and United States. *Phytopathology* 97: 1338-1347
- Mora, J.M. 1982. Determinación de los hospedantes alternos del mal de pierce de vid en Costa Rica, mediante técnicas inmunológicas de adsorción con conjugados enzimáticos. Tesis-Universidad de Costa Rica, Facultad de Fitotecnia, San José, CR.
- Nomé, SF; Haekterman, RM; Docampo, DM; Prativiera, AG; Di Feo, LV. 1992 Escaldadura de las hojas del almendro en Argentina. *Fitopatología Brasileira* 17: 57-60.
- Nomé, SF; Raju, BC; Goheen, AC; Nyland, G; Docampo, D. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for pierce's disease bacteria in plant tissues. *Phytopathology* 70: 746-749.
- Pooler, M; Hartung, J. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31: 377-381.
- Purcell, HA; Hopkins, DL. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review Phytopathology* 34: 131-151.

- Qin, X; Miranda, VS; Machado, MA; Lemos, EG; Hartung, JS. 2001. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from disease citrus and coffee in São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 91: 599-605.
- Raju, BC; Goheen, AC; Frazier, NW. 1983. Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. *Phytopathology* 73: 1309-1313.
- Sherald, JL; Lei, JD. 1991. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape trees. *Plant Disease* 75: 200-203.
- Uchiababa, EY; Leite Junior, RP; Leite, RMVBC. 1992. Avaliação de meios de cultura gerais e específicos para cultivo de *Xylella fastidiosa* isolada de ameixeira com escaldadura da folha. *Fitopatologia Brasileira* 17: 252-257.
- Wells, JM; Raju, BC; Hung, HY; Weisburg, WG; Mandelco-Paul, L; and Brenner, DJ. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. Nov., sp. nov: Gram negative, xylem limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 136-143.
- Yorinori, MA; Ribas, AF; Ueno, B; Massola-Junior, NS; Leite-Junior, RP. 2003. Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 28: 427-430.

## Conclusiones y Recomendaciones

---

1. En Costa Rica está presente *Xylella fastidiosa* causando síntomas similares a los de CVC en árboles de *Citrus sinensis*.
2. La selección del tejido y la época del año en que se realizan las evaluaciones tienen efectos en la detección de la bacteria por la técnica de DAS-ELISA en el tejido vegetal y en el aislamiento a partir de dicho tejido.
3. La contaminación y el crecimiento lento de la bacteria son los factores que más limitan el aislamiento de la bacteria a partir de tejido vegetal.
4. Existen diferencias en el tiempo de crecimiento y diámetro de las colonias entre aislados de *Xylella fastidiosa* obtenidos de plantas de cítricos y los obtenidos de plantas de vid.
5. Mediante la reacción de PCR utilizando los imprimadores 272-1int/CVC1 diseñados para la detección específica de *X. fastidiosa* causante de CVC, se pudo establecer una diferencia genética preliminar entre aislados obtenidos de cítricos de Costa Rica, ya que únicamente tres de estos aislados generaron una banda de 500 pb.
6. Los perfiles de restricción generados al cortar el producto obtenido con los imprimadores 272-1/272-2int con la enzima *Cfo*-I, permitieron únicamente diferenciar cepas de cítricos de Brasil con respecto a cepas de cítricos, café y vid de Costa Rica y vid de Estados Unidos.
7. La secuenciación del producto de los imprimadores 272-1/272-2 int reveló múltiples transversiones y la traslocación de un segmento de 16 nucleótidos en la secuencia de



Lar 20/11 lo cual explica las diferencias en los perfiles de restricción al digerir con la enzima *Cfo*-I.

8. El corte con las enzimas *Alu*-I, *Cfo*-I, *Hinf*-I, *Hpa*-II y *Taq*-I del producto obtenido con los imprimadores JB-1/JB-2 permitió asociar tres cepas de cítricos de Costa Rica (CR-Xf-Cs.-IIIc1, CR-Xf-Cs.-IIIc2, CR-Xf-Cs.-IIIc3) con cepas de Brasil y a su vez diferenciarlas de las demás cepas de cítricos, vid y café de Costa Rica, y vid de Estados Unidos.
9. Las técnicas de RAPDs y RFLPs generaron dendrogramas similares al separar cepas de cítricos de Costa Rica entre sí.
10. La técnica de RAPDs permitió separar las cepas de vid de Costa Rica, de las cepas de café de Costa Rica y de las de vid de Estados Unidos.
11. Se observó variabilidad genética entre cepas de *X. fastidiosa* aisladas del mismo y de diferentes hospederos.
12. Las cepas de *Xylella fastidiosa* aisladas de cítricos en Costa Rica, forman dos grupos completamente independientes uno del otro.
13. Se recomienda realizar evaluación en la zona norte del país para determinar hasta donde se ha expandido la enfermedad.
14. Se recomienda realizar otros estudios aumentando el número de cepas y regiones de procedencia de los hospederos, para determinar si existe mayor diversidad entre las cepas de *X. fastidiosa* de Costa Rica.