

NIMP 27

Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas

PD 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa en frutas

Adoptado 2014; publicado 2016

ÍNDICE

1.	Información sobre la plaga	2
2.	Información taxonómica	3
3.	Detección	3
3.1	Síntomas en los frutos	3
3.2	Síntomas en las hojas y las ramas	5
3.3	Comparación de los síntomas de la mancha negra de los cítricos con los causados por otros organismos o factores abióticos	5
4.	Identificación	5
4.1	Método A: Aislamiento y cultivo de <i>P. citricarpa</i>	6
4.1.1	Medios de cultivo	7
4.1.2	Características del cultivo	7
4.1.3	Morfología	7
4.1.4	Comparación de las características morfológicas y de cultivo de <i>P. citricarpa</i> con las de otras especies semejantes de <i>Phyllosticta</i>	8
4.2	Método B: Ensayos moleculares	9
4.2.1	Identificación de <i>P. citricarpa</i> por la RCP convencional	9
4.2.1.1	Información general	9
4.2.1.2	Métodos	10
4.2.1.3	Información esencial sobre el procedimiento	11
4.2.2	Identificación de <i>P. citricarpa</i> mediante la RCP en tiempo real	11
4.2.2.1	Información general	11
4.2.2.2	Métodos	12
4.2.2.3	Información esencial sobre el procedimiento	13
4.2.3	Identificación de <i>P. citricarpa</i> mediante secuenciación de los ETI	13
4.2.3.1	Información general	13
4.2.3.2	Métodos	13
4.2.3.3	Información esencial sobre el procedimiento	14
5.	Registros	14
6.	Puntos de contacto para obtener información adicional	15
7.	Agradecimientos	15
8.	Referencias	15
9.	Figuras	19

1. Información sobre la plaga

Phyllosticta citricarpa (McAlpine) Aa, agente causante de la plaga de la “mancha negra de los cítricos”, es un hongo que produce manchas en las hojas y los frutos, que afecta a *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella* y sus híbridos. Salvo *Citrus aurantium* y sus híbridos y *Citrus latifolia*, todas las especies de *Citrus* cultivadas comercialmente son susceptibles (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002; Kotzé, 2000). *Citrus limon* es particularmente susceptible, por lo que suele ser la primera especie de *Citrus* que muestra síntomas de la plaga cuando se ha introducido el patógeno en una nueva zona (Kotzé, 2000).

La mancha negra de los cítricos se registró por primera vez en Australia en 1895 en *Citrus sinensis* (Benson, 1895). Ahora está presente en algunas zonas productoras de cítricos de África, Asia, Australia y América del Norte y del Sur (CABI, 2011; NAPPO, 2010; Schubert *et al.*, 2012). No está notificado la presencia del organismo en Europa, América Central o la región del Caribe (CABI, 2011; CABI/EPPO, 1998; EPPO/CABI, 1997; NAPPO, 2010).

P. citricarpa tiene repercusiones económicas debido sobre todo a las manchas externas que provoca, lo que hace que la fruta no sea idónea para el mercado de productos frescos (Spósito, 2003). Las infecciones graves pueden dar lugar a la caída prematura de los frutos (Kotzé, 2000). En los años favorables para el desarrollo de la plaga y cuando los frutos se mantienen en el árbol después de alcanzar el estado óptimo de maduración se producen algunas pérdidas debidas a su caída (CABI, 2011). Además, en los frutos con una infección latente (asintomática) en el momento de la cosección pueden aparecer síntomas durante el transporte o el almacenamiento (Kotzé, 1996).

En la epidemiología de la mancha negra de los cítricos influyen la disponibilidad de inóculo, la presencia de condiciones ambientales favorables para la infección (es decir, calor y humedad), el ciclo de crecimiento del árbol y la edad de los frutos y las hojas en relación con su susceptibilidad a la infección (Kotzé, 1981, 2000). En las zonas en las que la lluvia se limita a una sola estación, la principal fuente de inóculo son los pseudotecios con ascosporas que se producen exclusivamente en la hojarasca. Cuando la lluvia no se reduce a una sola estación, si bien al final de la floración y la fructificación quedan en los árboles frutos fuera de estación con lesiones o se produce una floración sucesiva e irregular en las especies y variedades cultivadas de cítricos, también son importantes como fuente de inóculo los picnidios con conidios de *P. citricarpa* (Kotzé, 1981; Spósito *et al.*, 2008, 2011).

La formación de pseudotecios se produce entre 60 días después de la caída de la hoja, en función de la frecuencia de la humedad y la sequedad, así como de las temperaturas predominantes (Kotzé, 1981). En algunos países caen hojas de cítricos a lo largo de todo el año y en otros en una estación determinada, y esto afecta a la disponibilidad de inóculo. La temperatura óptima para la formación de pseudotecios es de 21–28 °C por debajo de 7 °C y por encima de 35 °C no se forman (Lee y Huang, 1973). Durante las precipitaciones y ocasiones durante el riego, o cuando hay un rocío intenso, se liberan ascosporas (Kiely, 1949a; Kotzé, 2000). En la descarga de ascosporas influye directamente el régimen de lluvias (Kotzé, 1981). Las ascosporas salen despedidas hasta una altura de 1,2 cm por encima de los pseudotecios y las corrientes de aire las arrastran a grandes distancias a través de la cubierta vegetal (Kiely, 1949). El período crítico para la infección comienza con la fructificación y dura 4-6 meses, pero los primeros síntomas en los frutos no aparecen hasta más de seis meses después de la fructificación (Baldassari *et al.*, 2006). En el Brasil, los frutos de las variedades “Valencia” y “Natal” de *C. sinensis* son susceptibles por lo menos hasta 24 semanas después de la caída del 75 % de los pétalos, cuando tienen un diámetro de 5-6 cm (Baldassari *et al.*, 2006).

Después de la infección, el hongo se mantiene en estado quiescente hasta que el fruto ha crecido totalmente o madurado, manifestándose los síntomas muchos meses después de haberse producido la infección (Kotzé, 2000). Las hojas conservan la susceptibilidad a la infección desde el desarrollo hasta los 10 meses de edad (Truter *et al.*, 2007).

Se producen picnidios con conidios en los frutos, las hojas, las ramas muertas, los pedicelos de los frutos y, en abundancia, en la hojarasca (Kotzé, 2000). Pueden salir despedidos sobre la cubierta vegetal o ser arrastrados de los frutos infectados que quedan en el árbol a otros más jóvenes y a las hojas que están

todavía en la etapa susceptible (Agostini *et al.*, 2006; Spósito *et al.*, 2008). *P. citricarpa* tiene asimismo un estado asexual microconidial, que se ha descrito en el género *Leptodothiorella* (Kiely, 1949a). Este estado microconidial, también conocido como estado “espermogonial” (Kiely, 1949a), suele aparecer en las hojas caídas antes de la formación de pseudotecios. Sin embargo, sigue sin estar clara la función de los microconidios en la biología de *P. citricarpa*.

La aparición de síntomas en los frutos maduros se ve potenciada por el aumento de la temperatura, la intensidad luminosa elevada, la sequía y el escaso vigor del árbol. Los árboles más viejos suelen tener más mancha negra de los cítricos que los más jóvenes (Kotzé, 2000). Se supone que la propagación de *P. citricarpa* a nuevas zonas se debe más a las plantas de vivero u otro material de plantación que a los cítricos (Kotzé, 2000; Timmer, 2004).

Hay que señalar que en un cítrico asintomático o con manchas muy pequeñas (<2 mm de diámetro) sin picnidios puede estar presente el endofito no patógeno *Phyllosticta capitalensis* Henn. antes denominado incorrectamente *Guignardia mangiferae* A.J. Roy (Glienke *et al.*, 2011), registrado en numerosas familias de plantas. Baayen *et al.* (2002) han descrito las características del cultivo, morfológicas y moleculares que diferencian *P. capitalensis* (2002). Además, los síntomas de *P. citricarpa* se pueden confundir con los producidos por *Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous & Gruyter, patógeno descrito recientemente que hasta el momento solo se ha encontrado en *Citrus maxima* (Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009). Se desconoce la patogenicidad de *P. citriasiana* para otras especies de *Citrus*. Wulandari *et al.* (2009) han descrito las características del cultivo, morfológicas y moleculares que diferencian *P. citriasiana* de *P. citricarpa*, la especie patógena para los cítricos. (2009). Recientemente se han descrito dos especies de *Phyllosticta* asociadas con *Citrus* spp. *Phyllosticta citrichinaensis* produce pequeñas manchas pardas hemicirculares con los bordes de color pardo oscuro y halos de color verde oliva en las hojas de pomelo. El patógeno también induce la aparición de pequeñas manchas de color entre pardo y negro semejantes a la melanosis de las mandarinas y las naranjas (Wang *et al.*, 2012). En el Brasil se ha detectado la presencia de *P. paribraziliensis* como endofito en hojas sanas de *Citrus* spp. (Glienke *et al.*, 2011).

2. Información taxonómica

Nombre: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa, 1973

Sinónimos: *Asoma citricarpa* McAlpine, 1899

Guignardia citricarpa Kiely, 1948

Phyllostictina citricarpa (McAlpine) Petr., 1953

Leptodothiorella sp. (spermatial state)

Posición taxonómica: Eukaryota, Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Botryosphaerales, Botryosphaeriaceae

Nombres comunes: Mancha negra de los cítricos (véanse en CABI [2011] los nombres comunes en otros idiomas)

Referencia: MycoBank 320327

3. Detección

P. citricarpa puede estar potencialmente presente en los frutos, los pedicelos, las hojas y las ramas de *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella* y sus híbridos (CABI, 2011).

3.1 Síntomas en los frutos

En los frutos aparecen varios síntomas (por ejemplo manchas duras, manchas moteadas, falsa melanosis, manchas virulentas), en función de la temperatura y la madurez del fruto (Kotzé, 2000). Es poco probable que pueda confirmarse con exactitud exclusivamente con un examen visual la presencia de *P. citricarpa* en los frutos, ya que el aspecto de los síntomas es variable y se pueden confundir fácilmente con los provocados por otros patógenos de los cítricos o por daños mecánicos, del frío o de insectos

(Kotzé, 2000; Snowdon, 1990; L. Díaz, comunicación personal). Los cuatro síntomas siguientes están ampliamente reconocidos tal como los describe Kiely (1949a, 1949b, 1960).

Mancha dura. Es el síntoma más típico de la mancha negra de los cítricos y consiste en lesiones superficiales de 3-10 mm de diámetro, con el centro entre gris y bronceado y los bordes de color entre pardo oscuro y negro (Figura 1A). En las etapas avanzadas de la evolución del síntoma, el centro de las lesiones adquiere la forma de cráter. Las distintas lesiones consistentes en manchas duras se pueden mantener de tamaño pequeño o bien unirse para formar lesiones de mayor tamaño. Alrededor de estas lesiones puede aparecer un halo amarillo cuando el fruto es verde o un halo verde cuando el fruto es amarillo o anaranjado. En el centro de estas manchas se producen con bastante frecuencia picnidios (Figura 1a), que se pueden detectar utilizando una lupa o un microscopio de disección. Las manchas duras suelen aparecer cuando el fruto comienza a madurar, incluso antes del cambio de color, y en la parte más expuesta a la luz solar (Kotzé, 1981, 2000). La mancha negra de los cítricos es fácil de identificar cuando hay manchas duras con picnidios.

Mancha moteada. Son manchas grises, bronceadas, rojizas o incoloras, de 1-3 mm de diámetro, ligeramente hundidas en el centro y sin halo alrededor (Figura 1B). Las manchas cambian a color pardo con el tiempo y casi nunca tienen picnidios (Figura 1b). Las manchas moteadas casi siempre aparecen cuando el fruto ha cambiado de color y también se pueden formar como manchas satélite alrededor de las manchas duras (Bonants et al., 2003) (Figura 1C). Las manchas moteadas aisladas se pueden unir para formar lesiones de mayor tamaño que se convierten en manchas difusas (Figura 2C), especialmente durante el almacenamiento de la fruta (Kotzé, 1981, 2000).

Falsa melanosis o mancha moteada. Suele aparecer en los frutos verdes en forma de pequeñas protuberancias de color entre pardo oscuro y negro, a menudo rodeadas de motas oscuras (FUNDECITRUS, 2005) (Figuras 2A, 2a, 2B). Las lesiones no tienen picnidios y se pueden unir a medida que avanza la estación (CABI, 2011). Estos síntomas se observan en las zonas de cultivo de cítricos en las que ha estado presente *P. citri* durante mucho tiempo (FUNDECITRUS, 2005).

Mancha virulenta, mancha extendida o mancha gorgopante. Son manchas irregulares hundidas, de color entre rojo y pardo o incoloras, que aparecen en los frutos maduros muy infectados hacia el final de la estación (Figura 2C). En condiciones de humedad elevada terminan formándose en estas lesiones numerosos picnidios (Kotzé, 2000). Las manchas virulentas crecen con rapidez, cubriendo dos tercios de la superficie del fruto en cuatro o cinco días. Es el síntoma más dañino, puesto que a diferencia de los otros penetra profundamente en el mesocarpio (albedo), atravesando en ocasiones todo el grosor de la cáscara y provocando la calentura del fruto y fuertes pérdidas post-cosecha (Kotzé, 1981).

También se ha informado de la aparición en los cítricos de otros dos síntomas que se describen a continuación, aunque no son frecuentes.

Mancha reticulada. Lesiones amarillas superficiales con el centro de amarillo oscuro a pardo, textura lisa y bordes no definidos (Aguilar-Vildoso et al., 2002) (Figura 2D). Este síntoma aparece en los frutos verdes y puede cubrir gran parte de su superficie (Goes, 2001). Las lesiones carecen de picnidios y con frecuencia aparecen como una red parda sobre una superficie amarilla. Los frutos que muestran manchas reticuladas al parecer suelen estar agregados en la cubierta arbórea (M. Spósito, comunicación personal).

Mancha agrietada. Lesiones superficiales ligeramente elevadas de color entre pardo oscuro y negro, de tamaño variable, con una superficie agrietada y bordes irregulares (Goes et al., 2000) (Figura 2E). Las lesiones carecen de picnidios y aparecen en frutos de más de seis meses. Este síntoma se ha asociado con la presencia de *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead (FUNDECITRUS, 2005; Spósito, 2003).

Hay que señalar que el mismo fruto puede mostrar más de uno de los síntomas descritos o etapas intermedias entre ellos (Figura 1C, 1c).

En algunas zonas con una presión elevada de inóculo, también pueden aparecer síntomas en los frutos pequeños, el cáliz y los pedúnculos. Los síntomas en el cáliz son lesiones de color entre rojo y pardo oscuro semejantes a las manchas moteadas. En los frutos pequeños y los pedúnculos, los síntomas

aparecen como pequeñas manchas negras (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002). Dichos síntomas en los frutos pequeños, el cáliz y los pedúnculos se han descrito solamente en el Brasil.

3.2 Síntomas en las hojas y las ramas

La mancha negra de los cítricos suele estar presente en las hojas como infección quiescente sin síntomas visibles (Sutton y Waterston, 1966). Si aparecen síntomas, comienzan como manchas punteadas visibles en las dos caras de la hoja. Las manchas, que pueden aumentar de tamaño hasta los 3 mm de diámetro, son circulares, con el centro que adquiere un color gris o pardo claro rodeado de un borde pardo oscuro o negro y un halo amarillo (Kotzé, 2000) (Figura 3A). En ocasiones puede haber picnidios en el centro de las lesiones en la cara adaxial de la hoja.

También pueden aparecer lesiones semejantes a las de las hojas en las ramas pequeñas, con mayor frecuencia en *C. limon* que en otras especies de cítricos (M. Truter, comunicación personal). Los síntomas son pequeñas lesiones (0,5-2 mm de diámetro) redondas ligeramente hundidas, con bordes entre pardos y negros y el centro de gris a pardo claro (Figura 3B). Puede haber ocasionalmente picnidios en el centro de las lesiones.

3.3 Comparación de los síntomas de la mancha negra de los cítricos con los causados por otros organismos o factores abióticos

El aspecto de los síntomas que aparecen en los frutos es variable y a menudo se semeja a los causados por otros patógenos de los cítricos (como *P. citriasiana*, *P. citrinidinaensis*, *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella citri*, *Alternaria alternata* pv. *citri*, *Septoria* spp., *Colletotrichum* spp.) o por insectos, daños mecánicos o del frío, en particular en el caso de la mancha moteada (Bonants *et al.*, 2003; Snowden, 1990; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009; L. Díaz, comunicación personal).

Debido a que los síntomas causados por *P. citricarpa* en los cítricos son semejantes a los debidos a otros patógenos, solamente se puede conseguir un diagnóstico fiable utilizando los métodos que se describen a continuación.

4. Identificación

En este protocolo se describe la detección e identificación de *P. citricarpa* en cítricos sintomáticos. Se debería inspeccionar cualquier síntoma típico de la mancha negra de los cítricos (véase el apartado 3). Si se observan síntomas sospechosos en forma de manchas o lesiones, se examinan con una lupa o un microscopio de disección para detectar la presencia de picnidios. Si en las manchas duras descritas en el apartado 3.1.1 hay picnidios con características morfológicas que corresponden a la descripción del apartado 4.1.3 puede haber presencia de *P. citricarpa*. Sin embargo, dado que los picnidios y los conidios de *P. citricarpa* son muy semejantes a los de *P. citriasiana*, patógeno descrito recientemente en *C. max* (Wulandari *et al.*, 2009), la identidad de *P. citricarpa* se puede confirmar con seguridad mediante los métodos de diagnóstico que se describen más abajo (Figura 4). El método de diagnóstico A (aislamiento/cultivo) se utiliza para la identificación de *P. citricarpa* en el fruto, pero también se puede aplicar a las hojas, ramas y los pedicelos, mientras que el método B (ensayo molecular) solo se aplica al fruto.

Si tras la aplicación del método A las características de crecimiento de las colonias cultivadas en medios de agar-decocción de cerezas (CHA) y agar-harina de avena (OA) no son compatibles con las de *P. citricarpa* (véase el apartado 4.1.4, requisitos i), ii), iii) y iv)), el material vegetal se considera libre de *P. citricarpa*. En cultivos semejantes a los de *P. citricarpa* que no producen picnidios maduros en 14 días, se recomienda la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) convencional y la secuenciación de los espaciadores de transcripción interna (ETI) (véase el apartado 4.2.1) o la RCP en tiempo real (véase el apartado 4.2.2). Sin embargo, el aislamiento y cultivo del organismo en los medios adecuados seguido de una prueba molecular directa de los cultivos es un procedimiento que requiere mucho tiempo, por lo que no resulta conveniente cuando es urgente realizar el diagnóstico en los envíos.

Para la detección e identificación de *P. citricarpa* en los cítricos hay dos métodos de RCP (convencional y en tiempo real, véanse los apartados 4.2.1 y 4.2.2). Sin embargo, en pruebas sistemáticas de frutos de *C. maxima* con síntomas típicos se ha observado recientemente que en el método de la RCP en tiempo real creado por Gent-Pelzer *et al.* (2007) no se obtiene amplificación (Meffert, comunicación personal). El motivo es que en *C. maxima* los síntomas semejantes a los de la mancha negra de los cítricos son provocados por *P. citriasiana*, especie descrita recientemente que guarda estrecha relación con *P. citricarpa* (Wulandari *et al.*, 2009). Dado que no está claro si *P. citricarpa* puede provocar los síntomas típicos en *C. maxima*, en el fruto de esta especie de *Citrus* con síntomas semejantes a los de la mancha negra de los cítricos también se debería comprobar la presencia de *P. citricarpa*.

El método de la RCP en tiempo real creado por Gent-Pelzer *et al.* (2007) (véase el apartado 4.2.2) se puede utilizar para un diagnóstico positivo de *P. citricarpa*, puesto que solo se obtendrá un resultado positivo en presencia de *P. citricarpa* y no en el caso de *P. citriasiana* o *P. capitalensis*. El método de la RCP convencional (descrito en el apartado 4.2.1) producirá una amplificación en presencia de *P. citricarpa* o *P. citriasiana*. En este caso, tras un resultado positivo se debería recurrir al aislamiento y cultivo (véase el apartado 4.1), la RCP en tiempo real (véase el apartado 4.2.2) o la secuenciación de los ETI (véase el apartado 4.2.1) para distinguir entre las dos especies. En estos ensayos moleculares no hay datos disponibles sobre las reacciones de *P. citrichinaensis* de China, descrita recientemente.

Hay que señalar que en ocasiones pueden encontrarse acérvulos del hongo endofítico común *Colletotrichum* spp. con un aspecto parecido a los picnidios de *P. citricarpa*. Sin embargo, es posible diferenciar *Colletotrichum* spp. por la presencia de sedas en sus acérvulos, la producción en condiciones de humedad de masas de conidios de color rosa o salmón en la superficie de las lesiones y la morfología de sus conidios (Kotzé, 2000).

En el presente protocolo, los métodos (incluidas las referencias y los nombres comerciales) se describen tal como se han publicado, puesto que en ellos se define el nivel original de especificidad alcanzado. Los procedimientos de laboratorio presentados en el protocolo pueden ajustarse a la norma de cada laboratorio, siempre que estén debidamente validados.

4.1 Método A: Aislamiento y cultivo de *P. citricarpa*

Se extrae material lesionado del fruto con un perforador de corcho o un escalpelo, bañado en etanol al 70 % durante 30 segundos, se desinfecta la superficie con hipoclorito de sodio (ClONa) al 1% durante 2 minutos, se enjuaga tres veces con agua destilada estéril y se seca (Peres *et al.*, 2007). Para aumentar la frecuencia del aislamiento y extracción se debe efectuar con cuidado y eliminar el tejido asintomático antes de la siembra en placa (N.A. Weiss, comunicación personal). A continuación, el material extraído se coloca de manera aseptica en placas de Petri (9 cm de diámetro) con CHA o agar-dextrosa-papa (PDA) (véase el apartado 4.1.1) o PDA con la adición de 50 µg/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (Gent-Pelzer/EPPC 2003). Si se utiliza el PDA y se forman cultivos oscuros de crecimiento lento parecidos a los de *P. citricarpa*, se transfieren a placas de CHA para comprobar la velocidad de crecimiento de las colonias y a placas de OA (véase el apartado 4.1.1) para evaluar la producción de pigmento. Al mismo tiempo, los cultivos obtenidos en un medio de PDA se deberían colocar bajo luz ultravioleta cercano (NUV) a 22 °C para facilitar la inducción de formación de picnidios. Los cultivos que i) crecen lentamente en CHA (véase el apartado 4.1.2); ii) producen los picnidios y conidios característicos de *P. citricarpa* (véase el apartado 4.1.2); y iii) producen un pigmento amarillo en OA – aunque no todos los aislados de *P. citricarpa* producen ese pigmento (Baayen *et al.*, 2002) – se identifican como pertenecientes a *P. citricarpa*.

El método tiene los siguientes inconvenientes: a) *P. citricarpa* es un hongo de crecimiento bastante lento y con frecuencia su cultivo se ve invadido por otros hongos (por ejemplo, *C. gloeosporioides*) (Peres *et al.*, 2007), porque ninguno de los medios de cultivo utilizados es selectivo para *P. citricarpa*, y b) es un método que requiere bastante tiempo, ya que se necesitan de 7 a 14 días para la producción de picnidios.

4.1.1 Medios de cultivo

Agar-decocción de cerezas (CHA). El zumo de cerezas se obtiene hirviendo 1 kg de cerezas, sin hueso ni peciolo, en 1 litro de agua del grifo durante unas dos horas. El extracto se filtra por una gasa, se introduce en botellas, se esteriliza durante 30 minutos a 110 °C (pH 4,5) y se conserva hasta el uso. En una botella con 0,8 litros de agua destilada, se añaden 20 g de agar técnico n.º 3 y la mezcla se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C. Inmediatamente después de la esterilización, se incorporan 0,2 litros del extracto de cereza esterilizado, se mezcla bien y se esteriliza durante 5 minutos a 102 °C (Gams *et al.*, 1998).

Agar-harina de avena (OA). El OA es comercializado. También se puede preparar utilizando el siguiente método: Se colocan 30 g de copos de avena en una gasa y se suspende en una olla con agua del grifo. Después de cocer a fuego lento durante unas 2 horas, los copos se estrujan, se filtra por una gasa y el extracto se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C. En una botella con 1 litro de extracto de harina de avena, se añaden 20 g de agar técnico n.º 3 y la mezcla se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C (Gams *et al.*, 1998).

Agar-dextrosa-papa (PDA). El PDA está comercializado. También se puede preparar siguiendo el método descrito por Hawksworth *et al.* (1995).

4.1.2 Características del cultivo

Las colonias de *P. citricarpa* tienen un crecimiento lento en CHA; su diámetro medio es de 25–30 mm después de 7 días a 22 °C en la oscuridad (Baayen *et al.*, 2002). En PDA, las colonias tienen bordes irregulares rodeados por una zona translúcida de micelio sumergido incoloro (Figura 5A). El centro de la colonia es oscuro, con un micelio aéreo de color entre gris y verde claro, a menudo con numerosos penachos pequeños. El reverso de la colonia tiene el centro muy oscuro y está rodeado de zonas de color sepia grisáceo y castaño claro (Baayen *et al.*, 2002). Después de 7–8 días comienzan a formarse estromas y se suelen producir picnidios maduros a partir de los 10–14 días (Figura 5B). En OA, después de 14 días a 25 °C en la oscuridad, las colonias son planas, extendidas, de color gris oliváceo que pasa a gris oliváceo pálido hacia el borde, con un micelio aéreo cuya densidad es de escasa a moderada (Glienke *et al.*, 2011). En OA se produce a menudo un pigmento amarillo característico que se difunde en el medio alrededor de la colonia (Figura 5D, fila superior), aunque no todos los aislados de *P. citricarpa* los producen (Baayen *et al.*, 2002). La producción de este pigmento amarillo en CHA y PDA es escasa.

4.1.3 Morfología

Los datos publicados sobre la morfología de *P. citricarpa* varían considerablemente, en parte debido a la confusión acerca de la identidad de las distintas especies de *Phyllosticta* relacionadas con *Citrus* (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al.*, 2009). Las siguientes características morfológicas y morfométricas se refieren a las fructificaciones y esporas de *P. citricarpa* que se producen fundamentalmente en cultivo; se basan en los datos de Sutton y Waterston (1966) y van der Aa (1977), revisados y modificados por Baayen *et al.* (2002).

Ascosporios. Se forman pseudotecios en la hojarasca y en cultivo (De Holanda Nozaki, 2007), pero no se encuentran en ningún otro material vegetal (por ejemplo en las hojas adheridas, o en los frutos). Son solitarios o agregados, de globosos a piriformes, inmersos, de color entre pardo oscuro y negro, de 125–360 µm, con un solo ostiolo entre papilado y rostrado, y su superficie muestra con frecuencia excrescencias irregulares de hifas. La capa externa de la pared se compone de células angulares con paredes gruesas de color pardo, mientras que la capa interna tiene las células de angulares a globosas con paredes incoloras más finas.

Ascas. Fasciculadas, bitunicadas, clavadas, con ocho esporas de ápice redondeado. Sus dimensiones antes de la ruptura de la pared externa son de 40–65 µm × 12–15 µm y antes de la dehiscencia se convierten en cilíndrico-clavadas y alcanzan hasta los 120–150 µm de longitud.

Ascosporas. Cortas, sin septos, hialinas, cilíndricas, engrosadas en el centro, ligeramente curvadas, de 12–16 $\mu\text{m} \times 4.5\text{--}6.5 \mu\text{m}$, heteropares con extremos obtusos desiguales. El extremo superior más pequeño tiene un apéndice semejante a un casquete mucoso no celular truncado de 1–2 μm de longitud y el extremo inferior tiene un apéndice agudo o ramificado de 3–6 μm de largo.

Picnidios. Se producen en el fruto, las hojas adheridas, las ramas muertas y la hojarasca, así como en cultivo. Son solitarios y en ocasiones agregados, globosos, inmersos, de color entre pardo claro y oscuro, y de 70–330 μm de diámetro. La pared picnidial está conformada por cuatro capas de células, las externas esclerosadas y las internas pseudoparenquimatosas, con ostiolo más oscuro, ligeramente papilado, circular y de 10–15 μm de diámetro.

Conidios. De obovados a elípticos, hialinos, sin septos, multigutulados, de 9,4–12,7 μm (3,1–8,5) μm , con un apéndice subulado incoloro y una cubierta gelatinosa incolora apenas visible de <1,5 μm de grosor (Figuras 5C, 5D, 6A). Se forman como blastosporas a partir de conidiforos unicelulares cilíndricos hialinos de hasta 9 μm de longitud.

Estado espermial. Descrito en el género *Leptodothiorella*, se produce tanto en huéspedes como en cultivo puro. Los espermios tienen forma de pesas, raramente cilíndricos, rectos o ligeramente curvados, de 5–8 $\mu\text{m} \times 0,5\text{--}1 \mu\text{m}$.

4.1.4 Comparación de las características morfológicas de cultivo de *P. citricarpa* con las de otras especies semejantes de *Phyllosticta*

Los cultivos de *P. citricarpa* son muy semejantes a los de *P. citrinovirga* (Wulandari et al., 2009) y a los de *P. capitalensis* (Baayen et al., 2002; Glienke et al., 2011), que es endofítica y no patógena para *Citrus*.

La identificación de las colonias de *P. citricarpa* es posible gracias a la combinación de los factores siguientes:

- (1) el crecimiento de las colonias en *Citrus* (en que sus hojas se pueden superponer);
- (2) el grosor de la cubierta mucosa que rodea los conidios (Figuras 5C, 5D, 6A, 6B, 6C);
- (3) la longitud del apéndice conidial;
- (4) la presencia de pigmento amarillo en OA, aunque no todos los aislados de *P. citricarpa* producen un pigmento amarillo (Baayen et al., 2002; Wulandari et al., 2009).

El Cuadro 1 contiene información detallada sobre las características distintivas de *P. citricarpa* y sus especies afines. Además, *P. chishimensis* se puede distinguir de *P. citricarpa* por su apéndice conidial más largo, de 14–20 μm (Wang et al., 2012).

Cuadro 1. Principales características morfológicas y del cultivo de *Phyllosticta citricarpa*, *Phyllosticta citriasiana* y *Phyllosticta capitalensis* (Baayen et al., 2002; Wulandari et al., 2009)

Característica	<i>P. citricarpa</i>	<i>P. citriasiana</i>	<i>P. capitalensis</i>
Tamaño medio de los conidios (µm)	10-12 × 6-7,5	12-14 × 6-7	11-12 × 6,5-7,5
Anchura de la cubierta mucoide (µm)	<1,5	1	1,5-2,5 (-3)
Longitud del apéndice apical (µm)	4-6 (-10)	7-10 (-14)	4-6 (-10)
Tamaño medio de las ascosporas (µm)	12-16 × 4,5-6,5	Se desconoce	15-17,5 × 6,5-7,5
Tamaño medio de los espermacios (µm)	5-8 × 0,5-1	3-5 × 1-2	7-10 × 1,8-2,5
Diámetro medio de las colonias (mm)*	25-30	18—20	>40
Temperatura máxima de crecimiento (°C)	30-36	30-33	30-36
Producción de pigmento amarillo en un medio de agar-harina de avena (OA)	Sí†	No	No

* En un medio de agar-decocción de cerezas (CHA) después de 7 días a 22 °C en la oscuridad.

† Hay que señalar que no todos los aislados de *P. citricarpa* producen un pigmento amarillo.

4.2 Método B: Ensayos moleculares

Se han preparado distintos métodos moleculares para la identificación de *P. citricarpa* directamente en cultivos puros y en las lesiones de los frutos (Bonants et al., 2003; Gent-Pelzer et al., 2007; Meyer et al., 2006, 2012; Peres et al., 2007; Stringari et al., 2009). Para la identificación de *P. citricarpa* se describen dos métodos: un ensayo de la RCP convencional preparado por Peres et al. (2007), y un ensayo de la RCP en tiempo real, preparado por Gent-Pelzer et al. (2007). Hay que señalar que el uso de la RCP en tiempo real genera una señal positiva a partir de una sola lesión de mancha negra en el fruto, mientras que en algunos casos los resultados de la RCP convencional pueden no ser concluyentes. También se observa que no hay datos disponibles sobre reacciones positivas en los ensayos moleculares de *P. citrichinaensis* descritos recientemente en frutos en China.

4.2.1 Identificación de *P. citricarpa* por la RCP convencional

La especificidad (especificidad analítica) se evaluó en un estudio con 36 aislados de *P. citricarpa*, 13 aislados de *P. capitalensis* y aislados de plagas comunes de los cítricos, como *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella citri* y *Penicillium digitatum*. Solo *P. citricarpa* dio una reacción positiva. La sensibilidad (sensibilidad analítica; límite de detección) es de 1 pg de ADN/µl (Peres et al., 2007). En este método se amplifica el ADN de *P. citricarpa* o bien de *P. citriasiana*. Hay tres métodos para distinguir entre las dos especies tras la reacción de la RCP convencional: aislamiento y cultivo (véase el apartado 4.1), ensayos de la RCP en tiempo real (véase el apartado 4.2.2) y secuenciación de los espaciadores de transcripción interna (ETI) (véase el apartado 4.2.3).

4.2.1.1 Información general

El protocolo fue preparado por Peres et al. (2007). La fuente de ácido nucleico es el micelio o las lesiones diseccionadas del fruto. El ensayo está concebido para amplificar parte de la región de los ETI a fin de producir un amplicón de 300 pares de bases (pb). Los oligonucleótidos iniciadores utilizados son:

Iniciador directo: GCN (5'-CTG AAA GGT GAT GGA AGG GAG G -3')

Iniciador inverso: GCMR (5'-CAT TAC TTA TCG CAT TTC GCT GC -3').

Para la amplificación de la RCP se utiliza MasterMix 2,5× de Eppendorf®¹, que contiene ADN polimerasa Taq y tampón de reacción con Mg²⁺ y nucleótidos. Para preparar las mezclas de reacción se

¹ La utilización en este protocolo de diagnóstico de la marca Eppendorf® para la amplificación de la RCP no implica su aprobación ni la exclusión de otras marcas que también puedan ser adecuadas. Esta información se

utiliza agua de grado molecular (MGW): dicha agua debería estar purificada (desionizada o destilada), estéril (mediante autoclave o filtración por poros de 0,45 µm) y sin nucleasas. La amplificación se realiza en un termociclador tipo Peltier con tapa caliente.

4.2.1.2 Métodos

Extracción y purificación de ácidos nucleicos

El ADN se extrae de cultivos de hongos que han crecido durante siete días en un caldo de papa y dextrosa o de lesiones aisladas de los frutos. En el segundo caso se disecciona el tejido sintomático, eliminando en la medida de lo posible todo el mesocarpio (albedo) y la corteza exterior.

La extracción del ADN a partir del micelio se realiza utilizando el equipo de extracción de ADN disponible en el mercado (por ejemplo, DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, QuickPilot SML Plant DNA (Bio-Nobile), robot de aislamiento KingFisher® (Thermo)) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la extracción de ADN a partir de lesiones aisladas de los frutos, se puede utilizar el protocolo de extracción de ADN mediante lisis alcalina (Klimyuk *et al.*, 1993) que se indica a continuación, seguido de purificación utilizando un método de varilla que ha demostrado ser el más eficaz (Peres *et al.*, 2007).

Método de extracción de ADN mediante lisis alcalina. Se coloca tejido sintomático del fruto en microtubos estériles de 2 ml con 40 µl de NaOH 0,25 M y se incuban en un baño de agua hirviendo (100 °C) durante 30 segundos (período crítico). El contenido de los tubos se neutraliza mediante la adición de 40 µl de ClH 0,25 M, 20 µl de Tris-ClH 0,5 M y Nonidet P-40 a pH 8,0 y 0,25% (v/v), y los tubos se colocan de nuevo en el baño de agua hirviendo durante 2 minutos. El material obtenido se puede purificar directamente aplicando el método de la varilla (véase infra) o almacenar a 4 °C durante varias semanas. Antes de la purificación tras el almacenamiento, las muestras se incuban en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos.

Método de purificación de ADN de varilla. Tras lisis alcalina (véase supra) se añaden 150 µl de etanol al 100 % y un pequeño fragmento de placa de celulosa para cromatografía de capa fina (varilla) a los microtubos de 2 ml. Los tubos se colocan de lado sobre hielo y se agitan durante 30 minutos. Se aspira el líquido y se añaden 500 µl de tampón de lavado (Tris ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)-Na₂ e hipoclorito de sodio (ClNa, pH 10) 10 mM, etanol al 95%) diluido al 25% y los tubos se invierten para mezclar el contenido. El lavado se repite dos veces. Las varillas se introducen en nuevos tubos y se secan en condiciones de vacío. Los tubos se colocan luego de lado y se añaden 50 µl de tampón Tris-EDTA a cada tubo. Después de incubarlos durante 5 minutos, los tubos se centrifugan 10 segundos, se retiran y desechan las varillas y se recupera el ADN. El ADN purificado se puede utilizar de manera inmediata o conservar a 4 °C durante una noche o a -20 °C para períodos más prolongados.

Otra posibilidad es extraer el ADN de las lesiones del fruto mediante un equipo de extracción de ADN disponible en el mercado siguiendo las instrucciones del fabricante.

ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que se obtienen los mismos resultados.

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

La mezcla patrón (concentración para cada reacción de 20 µl) se compone de los reactivos siguientes:

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Agua de grado molecular (MGW)	n/d	0,4	n/d
MasterMix 2,5× de Eppendorf®1 (ADN polimerasa Taq, 0,06 U/µl)	2,5×	8,0	1× (0,024 U Taq/µl)
Tampón de reacción Taq 2,5× (Mg ²⁺ 4 mM, cada dNTP 500 µM)	2,5×	8,0	1× (Mg ²⁺ 1,6 mM, cada dNTP 200 µM)
Iniciador GCN	10 µM	0,8	0,4 µM
Iniciador GCMR	10 µM	0,8	0,4 µM
Total parcial	-	18,0	-
ADN	-	2,0	-
Total	-	20,0	-

Los parámetros de ciclado de la RCP son: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; 39 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, a 64 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 1 minuto, y extensión a 72 °C durante 10 minutos. Un producto de la RCP de 300 pb indica la presencia de ADN de *P. citricarpa*.

4.2.1.3 Información esencial sobre el procedimiento

Tras la amplificación, se combinan 10 µl de la mezcla de reacción con 2 µl de tampón de carga de ADN 6× (Promega) y se carga junto con un marcador de peso molecular (escala de ADN de 100 pb) en un gel de agarosa al 1,5 %, se separa por electroforesis, se tinea con bromuro de etidio u otro reactivo alternativo y se observa y fotografía bajo luz UV (Sambrook *et al.*, 1989).

Para garantizar el éxito de la amplificación se debe incluir ADN de una cepa de referencia de *P. citricarpa* (control positivo) como muestra adicional. También se ha de realizar la amplificación de la RCP en una muestra en la que el extracto de ADN de *P. citricarpa* se ha sustituido por el extracto de ADN de otra especie afín o en una muestra de exocarpo sano (control negativo). Para vigilar la posible contaminación del reactivo y la aparición de falsos positivos, se debe sustituir una muestra por agua (control de la reacción). Es aconsejable incluir un control interno de amplificación (CIA) para verificar la inhibición.

4.2.2 Identificación de *P. citricarpa* mediante la RCP en tiempo real

Se evaluó la especificidad (especificidad analítica) con la cepa de referencia de *P. citricarpa* CBS 111.20 (representativa de la presencia de los ETI de 10 aislados de *P. citricarpa* del grupo I; Baayen *et al.*, 2002), la cepa de referencia de *P. capitalensis* GC14 (representativa de la secuencia de los ETI de 22 aislados de *P. capitalensis* del grupo II; Baayen *et al.*, 2002), otras 12 plagas de los cítricos (*Alternaria* spp., *Aspicillium* spp., *Colletotrichum* spp.), *Phyllosticta artocarpina* y *Guignardia bidwellii*. Solamente dio una reacción positiva *P. citricarpa*. La sensibilidad (sensibilidad analítica; límite de detección) es de 10 fg de ADN por reacción y la sensibilidad del diagnóstico es del 100 % (Gent-Pelzer *et al.*, 2007).

4.2.2.1 Información general

El protocolo fue elaborado por Gent-Pelzer *et al.* (2007). La fuente de ácido nucleico es el micelio o las lesiones diseccionadas del fruto. El ensayo está concebido para amplificar una parte de la región de los ETI produciendo un amplicón de 69 pb. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados son:

Iniciador directo: GcF1 (5'-GGT GAT GGA AGG GAG GCC T-3')

Iniciador inverso: GcR1 (5'-GCA ACA TGG TAG ATA CAC AAG GGT-3').

La sonda de hidrólisis GcP1 (5'-AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT TCA-3') está marcada en el extremo 5' con el colorante fluorescente indicador FAM (6-carboxifluoresceína) y modificada en el extremo 3' con el colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) o Eclipse® Dark Quencher (Eurogentec).

Para la amplificación de la RCP se utiliza la mezcla patrón Premix Ex Taq 2× (Takara)², que contiene polimerasa Taq y un tampón de reacción con Cl₂Mg y nucleótidos. A la mezcla patrón Premix Ex Taq se le añade colorante de referencia ROX (concentración 50×, Takara). En la preparación de mezclas de reacción se utiliza agua de grado molecular, que debe estar purificada (desionizada o destilada), esterilizada (mediante autoclave o filtración por un poro de 0,45 µm) y sin nucleasas. En el caso de la RCP en tiempo real, la amplificación se realiza utilizando un termociclador.

4.2.2.2 Métodos

Extracción y purificación de ácidos nucleicos

Se extrae ADN de muestras de micelio (0,5 cm de diámetro) tomadas del borde de una colonia cultivada en CHA (véase el apartado 4.1.1) a 22 °C en la oscuridad o de lesiones en el fruto. Las lesiones se separan de la piel, eliminando en la medida de lo posible todo el anillo circundante y el tejido de la piel. Las muestras de micelio o las lesiones se cortan en pequeños trozos y se colocan en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con un tapón plano y ajuste de seguridad, en el que se introducen una cuenta de acero inoxidable (3,2 mm de diámetro) y 125 µl de solución de extracción (tampón fosfato salino 0,02 M (PBS), Tween 20 al 0,5%, polivinilpirrolidona (PVP) al 1%, albúmina de suero bovino al 0,2%). El tubo se coloca en un agitador y se mantiene durante 80 segundos a 5 000 r.p.m. La mezcla se centrifuga durante 5 segundos a velocidad máxima (10 100 g) en una microcentrífuga y para la extracción del ADN se utilizan 75 µl del sobrenadante obtenido. El ADN se puede extraer con equipo de extracción disponible en el mercado, siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la solución de ADN es de 50 µl. El ADN se purifica de nuevo en columnas de centrifuga que se han rellenado con PVP. Las columnas se preparan rellenando columnas de separación Axygen Multi-Spin (Dispolab) con polivinilpolipirrolidona (PVPP) de 0,5 cm, que se coloca en un tubo de reacción vacío y se lava dos veces con 250 µl de MGW, centrifugando la columna durante 5 minutos a 4 000 g. La suspensión de ADN se pasa a una columna de PVPP y se centrifuga durante 5 minutos a 4 000 g. La fracción no retenida se utiliza como material para la prueba de la RCP. El ADN purificado se puede utilizar de manera inmediata o conservarse a 4 °C durante una noche o a -20 °C para períodos más prolongados. La PVP se utiliza en el tampón de extracción como componente soluble. La PVPP es PVP reticulada y se utiliza como material de filtración insoluble.

Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla patrón (concentración para cada reacción de 30 µl) se compone de los reactivos siguientes:

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Agua de grado molecular (MGW)	n/d	13,1	n/d
Mezcla patrón Premix Ex Taq 2× (Takara)	2×	15,0	1×
Iniciador GcF1	50 µM	0,15	0,25 µM
Iniciador GcR1	50 µM	0,15	0,25 µM
Sonda GcP1	5 µM	0,6	0,10 µM

² La utilización en este protocolo de diagnóstico de la marca Takara para la mezcla patrón Premix Ex Taq 2× no implica su aprobación ni la exclusión de otras marcas que también puedan ser adecuadas. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que se obtienen los mismos resultados.

Total parcial	-	29,0	-
ADN	-	1,0	-
Total	-	30,0	-

Se pueden añadir, si procede, 0,6 µl del colorante de referencia ROX 50×; en ese caso se utilizan 12,5 µl de agua de grado para la RCP.

Los parámetros de ciclado de la RCP son 50 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, y 60 °C durante 1 minuto. El límite de 40 ciclos se obtuvo utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7700 o 7900 (Applied Biosystems) y usando los materiales y reactivos que se describen más arriba. Hay que señalar que:

- la curva de amplificación debería ser exponencial
- una muestra se considera positiva si produce un valor del ciclo umbral (Ct) < 40, siempre que los controles de contaminación sean negativos
- una muestra se considera negativa si produce un valor del Ct ≥ 40 siempre que los controles de inhibición del ensayo y la extracción sean positivos.

El límite del ciclo se debe verificar en cada laboratorio al realizar la prueba por primera vez.

4.2.2.3 Información esencial sobre el procedimiento

Para garantizar el éxito de la amplificación se debe incluir ADN de una cepa de referencia de *P. citricarpa* (control positivo) como muestra adicional. La amplificación de la RCP se debe realizar también sobre una muestra en la que el extracto de ADN de *P. citricarpa* se ha sustituido por el extracto de ADN de otra especie afín (por ejemplo, *C. citrifolia*) o en una muestra de exocarpo sano (control negativo). Para vigilar la posible contaminación del reactivo y la aparición de falsos positivos, se debe sustituir una muestra por agua (control de contaminación).

A fin de comprobar la aparición de falsos negativos en las reacciones a causa de la inhibición de la reacción de amplificación, se pueden añadir a las mezclas de reacción 12,5 fg de un CIA, un iniciador directo del CIA 75 nM (5'-TGG ACC GGT CCT TAT ACC AG-3'), un iniciador inverso del CIA 75 nM (5'-TTT TCG TTG GGA TCT TAC GAA-3') y una sonda de hidrólisis MGB del CIA 50 nM (5'-ACA CAA TCT GCC-3') marcada con el colorante fluorescente indicador VIC™ (Eurogentec) y el colorante amortiguador Eclipse® DNA Quencher (Eurogentec).

4.2.3 Identificación de *P. citricarpa* mediante secuenciación de los ETI

4.2.3.1 Información general

La identidad de las muestras positivas obtenidas en la RCP convencional se puede confirmar mediante secuenciación (Baayen *et al.*, 2002). A continuación se describe el método para la secuenciación de las regiones 1 y 2 del ARN ribosómico del hongo.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados son:

Iniciador directo: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

Iniciador inverso: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990).

4.2.3.2 Métodos

Extracción y purificación de ácidos nucleicos

El ADN se debe extraer de una muestra de 1 cm² tomada de un cultivo puro del aislado de prueba. Se utiliza un equipo de extracción de ADN apropiado o se extrae siguiendo un método más tradicional, como el descrito en Hughes *et al.* (2000). El ADN extraído se debe conservar a 4 °C para su uso inmediato o a -20 °C si la prueba no se va a realizar el mismo día.

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

El volumen total de la reacción para cada RCP es de 50 µl y está formado por los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Agua de grado molecular (MGW)	n/d	37,5	n/d
Tampón de reacción de la RCP 10x (++15 mM Cl ₂ Mg ₂) (Roche) ³	2x	5,0	1x (0,024 U Taq/µl)
dNTP	10 mM (cada una)	4,0	0,8 mM (cada una)
Iniciador ET11	10 µM	0,6	0,12 µM
Iniciador ET14	10 µM	0,6	0,12 µM
ADN polimerasa Taq (Roche)3	5 U/µl	0,3	0,03 U/µl
Total parcial	-	48,0	-
ADN	-	2,0	-
Total	-	50,0	-

Los parámetros de ciclado de la RCP son 94 °C durante 30 segundos, 40 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 30 segundos; y 72 °C durante 5 minutos. El tamaño del amplicón es de 550 pb (Baayen *et al.*, 2002).

Secuenciación de los amplicones

La mezcla amplificada (5 µl de ella) se hace pasar por un gel de agarosa al 1,5 % para verificar las reacciones positivas de la prueba. Los 45 µl restantes de las reacciones positivas de la prueba se purifican utilizando un equipo de purificación de la RCP adecuado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realiza la secuenciación con el iniciador directo ET11 y el iniciador inverso ET14.

4.2.3.3 Información esencial sobre el procedimiento

Amplificación y análisis

El ADN extraído se debe descongelar, en caso necesario. Hay que preparar suficiente mezcla de reacción para analizar por lo menos una muestra del aislado desconocido, un control positivo que contenga ADN amplificado y un control negativo con agua en lugar de ADN. Las muestras se analizan por resolución en un gel de agarosa al 1,5 % con las secuencias de consenso para las muestras del análisis (excluidas las secuencias de los iniciadores) se comparan con una cepa confirmada para el ex-epitipo de *P. citricarpa* CBS 127454 (número de muestra JF343583 del Banco de germoplasma) en la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El nivel de identificación del aislado está en el 99 % y el 100 %.

5. Registros

Se debe mantener los registros y las evidencias detallados en la NIMF 27.

En los casos en los que las partes contratantes puedan verse afectadas negativamente por los resultados del diagnóstico, los registros y las evidencias de los resultados (en particular los cultivos, las placas, las fotografías de las estructuras fúngicas, las fotografías de los síntomas y signos, las fotografías de los extractos de ADN y los geles de separación) se deben conservar durante un año por lo menos.

³ La utilización en este protocolo de diagnóstico de la marca Roche para el tampón de reacción de la RCP y la ADN polimerasa Taq no implica su aprobación ni la exclusión de otras marcas que también puedan ser adecuadas. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que se obtienen los mismos resultados.

6. Puntos de contacto para obtener información adicional

Se puede obtener información adicional sobre *P. citricarpa* y los métodos para su detección e identificación en las siguientes fuentes (por orden alfabético):

ARC-Plant Protection Research Institute, Biosystematics Division: Mycology, Private Bag x134, Queenswood 0121, Sudáfrica (Dra. Mariette Truter; tel.: +27 12 8088281; fax: +27128088297; correo electrónico: truterm@arc.agric.za).

Plant Research International, PO Box 26, 6700 AA Wageningen, Países Bajos (Dr. Peter J.M. Bonants; tel.: +31 31 7480648; fax +31 31 7418094; correo electrónico: peter.bonants@wur.nl).

Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil (Dr. Marcel B. Spósito; tel.: +55 19 34294190 ext. 311; fax +55 19 34294414; correo electrónico: mbsposito@usp.br).

University of Florida, Citrus Research and Education Center (CREC), 700 Experiment Station Rd., Lake Alfred, FL 33850, Estados Unidos (Dr. Lavern W. Timmer; tel.: +1 888 39561151; fax: +18639564631; correo electrónico: lwtimmer@ufl.edu).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico a las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) por conducto de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (conpc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El presente protocolo fue redactado inicialmente por:

Irene Vloutoglou, Benaki Phytopathological Institute, 8, St Delfi St, GR-145 61 Kifissia, Atenas, Grecia (tel.: +30 210 8180231; fax: +302108077506; correo electrónico: i.vloutoglou@bpi.gr).

Dr. Johan Meffert, Plant Protection Service, 15, Hertjesweg, 6706 EA Wageningen, Países Bajos (tel.: +31 417 496837; fax: +31 317 421700; correo electrónico: j.p.meffert@minlnv.nl).

Dr. Luis E. Díaz, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Departamento de Micología, Milán 4703, CP 12900, Montevideo, Uruguay (tel.: +598 2 3043992; fax: +59823043992; correo electrónico: ldiaz@mgap.gub.uy).

8. Referencias

La presente norma refiere a las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. Las NIMF se encuentran disponibles en el Portal Fitosanitario Internacional (IPP – www.IPPC.int).

Aa, H.A., van der. 1973. Studies in *Phyllosticta* I. *Studies in Mycology*, 5: 1-110.

Agostini, J., Peres, A.A., Mackenzie, S.J., Adaskaveg, J.E. & Timmer, L.W. 2006. Effect of fungicide and storage conditions on postharvest development of citrus black spot and survival of *Guignardia citricarpa* in fruit tissues. *Plant Disease*, 90: 1419-1424.

Aguilar-Roldoso, C., Baldini, J., Feichtenberger, E., de Goes, A. & Spósito, M. 2002. *Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos Citros*. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Projeto CE-MERCOSUL ALA 93/143. 59 páginas.

Baayen, R.P., Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carroll, G.C., van der Aa, H.A., de Weerd, M., van Brouwershaven, I.R., Schutte, G.C., Maccheroni Jr, W., Glienke de Blanco, C. & Azevedo, J.L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92: 464-477.

- Baldassari, R.B., Reis, R.F. & de Goes, A.** 2006. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 337-341.
- Benson, A.H.** 1895. Some fruit pests: Black spot of the orange. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 6: 249-251.
- Bonants, P.J.M., Carroll, G.C., de Weerd, M., van Brouwershaven, I.R. & Baayen, R.P.** 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the Citrus Black Spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 503-513.
- CABI.** 2011. *Guignardia citricarpa*. *Crop Protection Compendium*, 2011 edn. Wallingford, Reino Unido, CAB International. Disponible en <http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=26154&loadmodule=datasheet&page=481&size=144> (última consulta: 19 de agosto de 2014).
- CABI/EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 1998. *Guignardia citricarpa*. *Distribution maps of quarantine pests for Europe*, no. 26. Wallingford, Reino Unido, CAB International.
- De Holanda Nozaki, M.** 2007. Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* EM *Citrus* spp. Tesis doctoral, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil. 85 páginas.
- EPPO/CABI.** 1997. *Guignardia citricarpa*. En I.M. Smith, D.G. Namara, P.R. Scott & M. Holderness, eds. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn, pp. 772-781. Wallingford, Reino Unido, CAB International. 1440 páginas.
- FUNDECITRUS.** 2005. Manual de Pinta Preta. Brazil, Araraquara: Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. 10 pp. (Boletim Técnico).
- Gams, W., Hoekstra, E.S. & Aptroot, A.** 1998. *CMS course of mycology*, 4th edn. Baarn/Delft, Países Bajos, Centraal Bureau voor Schimmelcultures. 150 páginas.
- Gent-Pelzer, M.P.E. van, van Brouwershaven, I.R., Kox, L.F.F. & Bonants, P.J.M.** 2007. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. *Journal of Phytopathology*, 155: 357-363.
- Glienke, C., Pereira, O.L., Stengari, M., Labris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunningham, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W.** 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia*, 16: 47-56.
- Goes, A. de, Baldassari, R.B., Feichtenberger, E., Aguilar-Vildoso, C.I. & Spósito, M.B.** 2000. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. En Abstracts of the 9th Congress of the International Society of Citriculture, pág. 145. Orlando, FL, Estados Unidos, University of Florida.
- Goes, A. de.** 2001. Mancha preta dos Citros: Situação atual e perspectivas futuras. *Ciência e Prática*, Belo Horizonte, 1 de diciembre de 2001, págs. 5-7.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. & Pegler, D.N.** 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 8ª ed. Wallingford, Reino Unido, CAB International. 650 páginas.
- Hughes, K.J.D., Inman, A.J. & Cooke, D.E.L.** 2000. Comparative testing of nested PCR-based methods with bait-plant tests for detecting *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in infected strawberry roots from fruit crops in the UK. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 533-538.
- Kiely, T.B.** 1949a. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp., the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp., and its relation to black spot of citrus. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 73: 249-292.
- Kiely, T.B.** 1949b. Black spot of citrus. *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 60: 17-20.
- Kiely, T.B.** 1960. Speckled blotch of citrus. *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 71: 474-476.

- Klimyuk, V.I., Carroll, B.J., Thomas, C.M. & Jones, J.D.** 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis: technical advance. *Plant Journal*, 3: 493-494.
- Kotzé, J.M.** 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease*, 65: 945-950.
- Kotzé, J.M.** 1996. History and epidemiology of citrus black spot in South Africa. *En International Society of Citriculture. Proceedings of the 8th International Citrus Congress* (Sun City, Sudáfrica, 1966), págs.1296–1299. Orlando, FL, Estados Unidos, ISC.
- Kotzé, J.M.** 2000. Black spot. *En* L.W. Timmer, S.M. Garnsey & J.H. Graham, eds. *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd edn, págs. 23–25. Saint Paul, MN, Estados Unidos, APS Press. 128 páginas.
- Lee, Y.S. & Huang, C.S.** 1973. Effect of climatic factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus. *Journal of Taiwan Agricultural Research*, 13: 135-144.
- Meyer, L., Sanders, G.M., Jacobs, R. & Korsten, L.** 2006. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Disease*, 90: 97-101.
- Meyer, L., Jacobs, R., Kotzé, J.M., Truter, M. & Korsten, L.** 2012. Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. *South African Journal of Science*, 108.
- NAPPO** (Organización Norteamericana de Protección a las Plantas). 2010. Phytosanitary Alert System: Confirmation of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Florida, United States. NAPPO. Se puede consultar en <http://www.pestalert.org/oprDetails.htm?oprID=421> (consultado el 26/09/2011).
- OEPP/EPPO** 2003. Diagnostic protocols for regulated pests. *Guignardia citricarpa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 33: 271-280.
- Peres, N.A., Harakava, R., Carroll, G.C., Adaskin, J.E. & Timmer, L.W.** 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Disease*, 91: 525-531.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schubert, T.S., Dewdney, M.M., Peres, N.A., Palm, M.E., Jeyaprakash, A., Sutton, B., Mondal, S.N., Wang, N., Rascón, J. & Picton, D.D.** 2012. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. *Plant Disease*, 96: 1225.
- Snowdon, A.** 1990. Black spot. *En* A.L. Snowdon, ed. 2014-08-19, Vol. I. *General Introduction and fruits*, págs. 61-63. Londres, Reino Unido, Wolfe Scientific Ltd. 302 páginas.
- Spósito, M.B.** 2008. Dinâmica temporal e especial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. Tesis doctoral, Universidade de São Paulo, Brasil. 112 páginas.
- Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A. & Hau, B.** 2008. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. *Plant Pathology*, 57: 103-108.
- Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Felipe, M.R. & Czermainski, A.B.C.** 2011. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. *Crop Protection*, 30: 1546-1552.
- Stringari, D., Glienke, C., Christo, D., Maccheroni Jr, W. & Azevedo, J.L.** 2009. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 1063-1073.
- Sutton, B.C. & Waterston, J.M.** 1966. *Guignardia citricarpa*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 85. Wallingford (Reino Unido), CAB International.

- Timmer, L.W.** 2004. Evaluating the risks of introduction of citrus black spot into the U.S. En *2004 Annual Report*, págs. 36–38. Visalia, CA, Estados Unidos, California Citrus Research Board.
- Truter, M., Labuschagne, P.M., Kotzé, J.M., Meyer, L. & Korsten, L.** 2007. Failure of *Phyllosticta citricarpa* pycnidiospores to infect Eureka lemon leaf litter. *Australasian Plant Pathology*, 36: 87–93.
- Wang, X., Chen, G., Huang, F., Zhang, J., Hyde, K.D. & Li, H.** 2012. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity*, 52: 209–224.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. & Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*, págs. 315–322. San Diego, CA, Academic Press. 482 páginas.
- Wulandari, N.F., To-anun, C., Hyde, K.D., Duong, L.M., de Gruyter, S., Meffert, J.P., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W.** 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity*, 34: 23–39. Se puede consultar en <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-2.pdf> (consultado el 29/8/2014).

9. Figuras

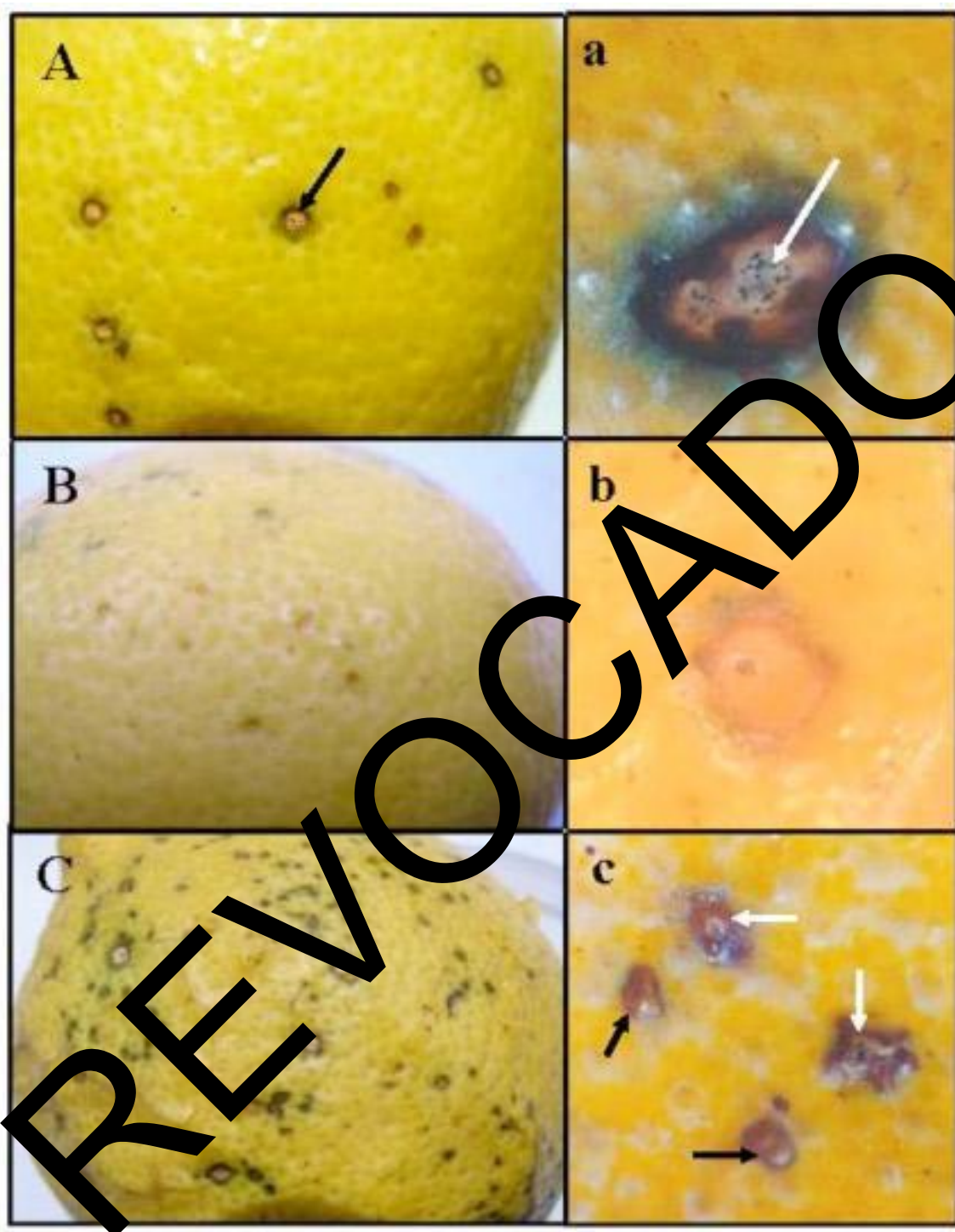


Figura 1. Síntomas de mancha dura y mancha moteada producidos por *Phyllosticta citricarpa* en naranjas dulces (*Citrus sinensis*) y limones (*Citrus limon*): A, a) lesiones de mancha dura en una naranja dulce, con la presencia en las lesiones más grandes de picnidios del anamorfo *Phyllosticta citricarpa* (flechas); B) lesiones de mancha moteada en un limón; b) lesiones de mancha moteada en una naranja dulce (las lesiones están ligeramente hundidas en el centro y no tienen picnidios); C) lesiones de mancha dura y moteada en un limón; c) lesiones de mancha moteada (flechas negras) y etapa intermedia entre las lesiones de mancha moteada y dura con picnidios (flechas blancas) en una naranja dulce.

Fotografías cedidas por E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brasil.

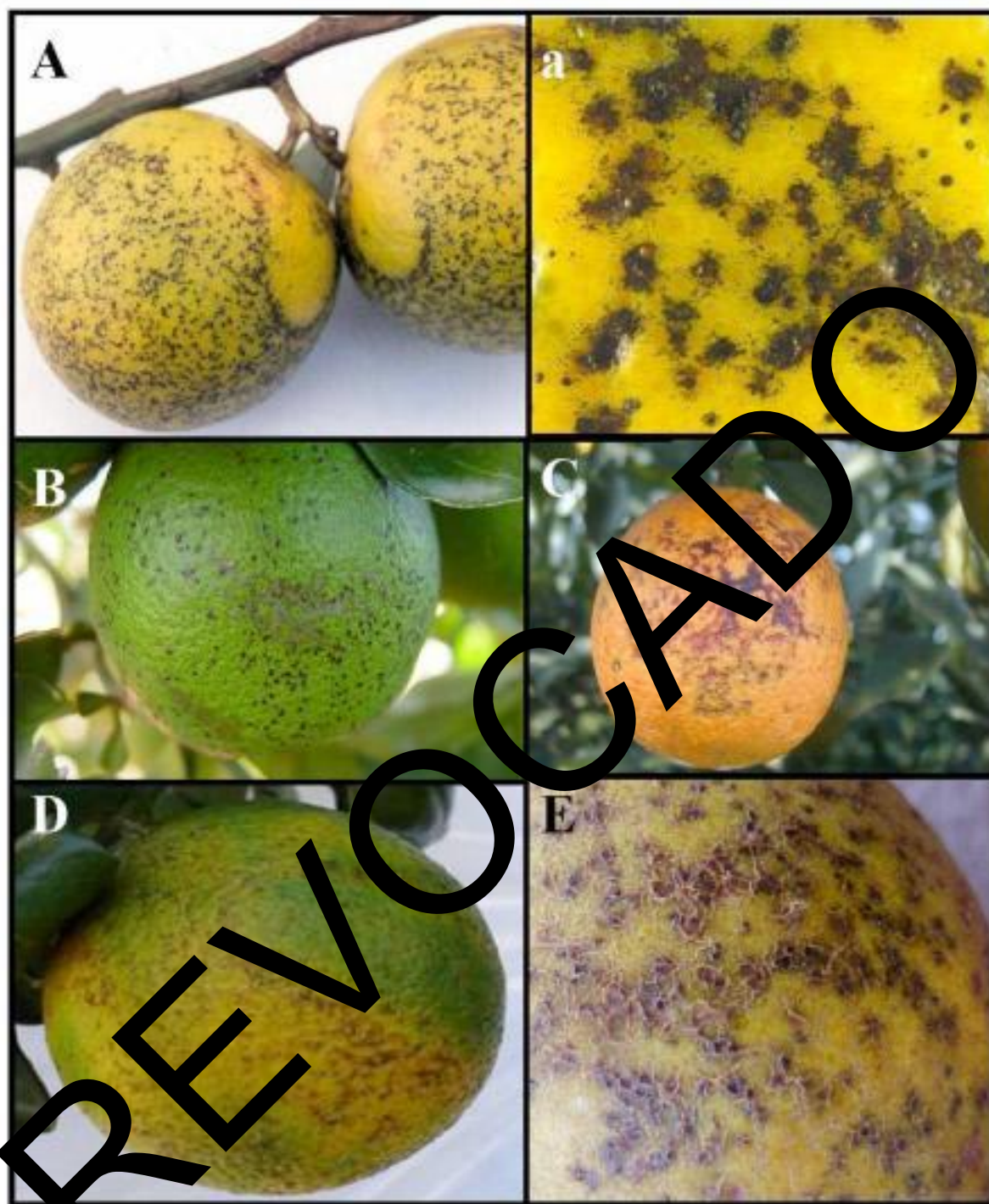


Figura 2. Síntomas de falsa melanosis, mancha virulenta, mancha punteada y mancha agrietada producidos por *Phyllosticta citricarpa* en naranjas dulces (*Citrus sinensis*) y limones (*Citrus limon*): A) lesiones de falsa melanosis en una naranja dulce madura; a) lesiones de falsa melanosis rodeadas de puntos oscuros en una naranja dulce madura; B) lesiones de falsa melanosis en una naranja dulce verde; C) lesiones de mancha virulenta en una naranja dulce (las lesiones están hundidas y penetran profundamente en el albedo); D) síntomas de mancha punteada en una naranja dulce verde; E) lesiones de mancha agrietada en una naranja dulce (las lesiones están ligeramente elevadas, agrietadas, con bordes irregulares y sin picnidios).

Fotografías cedidas por FUNDECITRUS (A, B, C, D, E) y E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brasil (a).

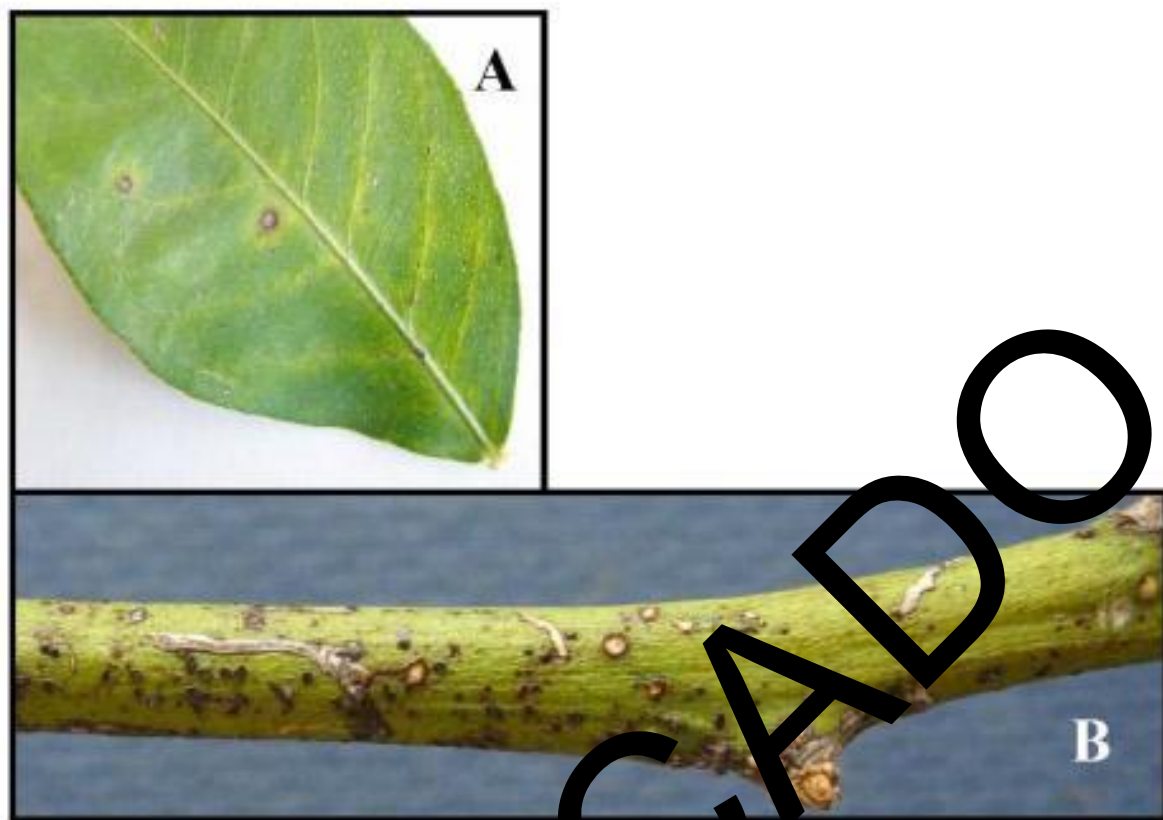


Figura 3. Síntomas de mancha negra de los cítricos producidos por *Mylosticta citricarpa* en hojas (A) y ramas (B) de limonero (*Citrus limon*).

Fotografías cedidas por E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brasil (A) y M. Truter, Plant Protection Research Institute, Agricultural Research Council, Pretoria, Sudáfrica (B).

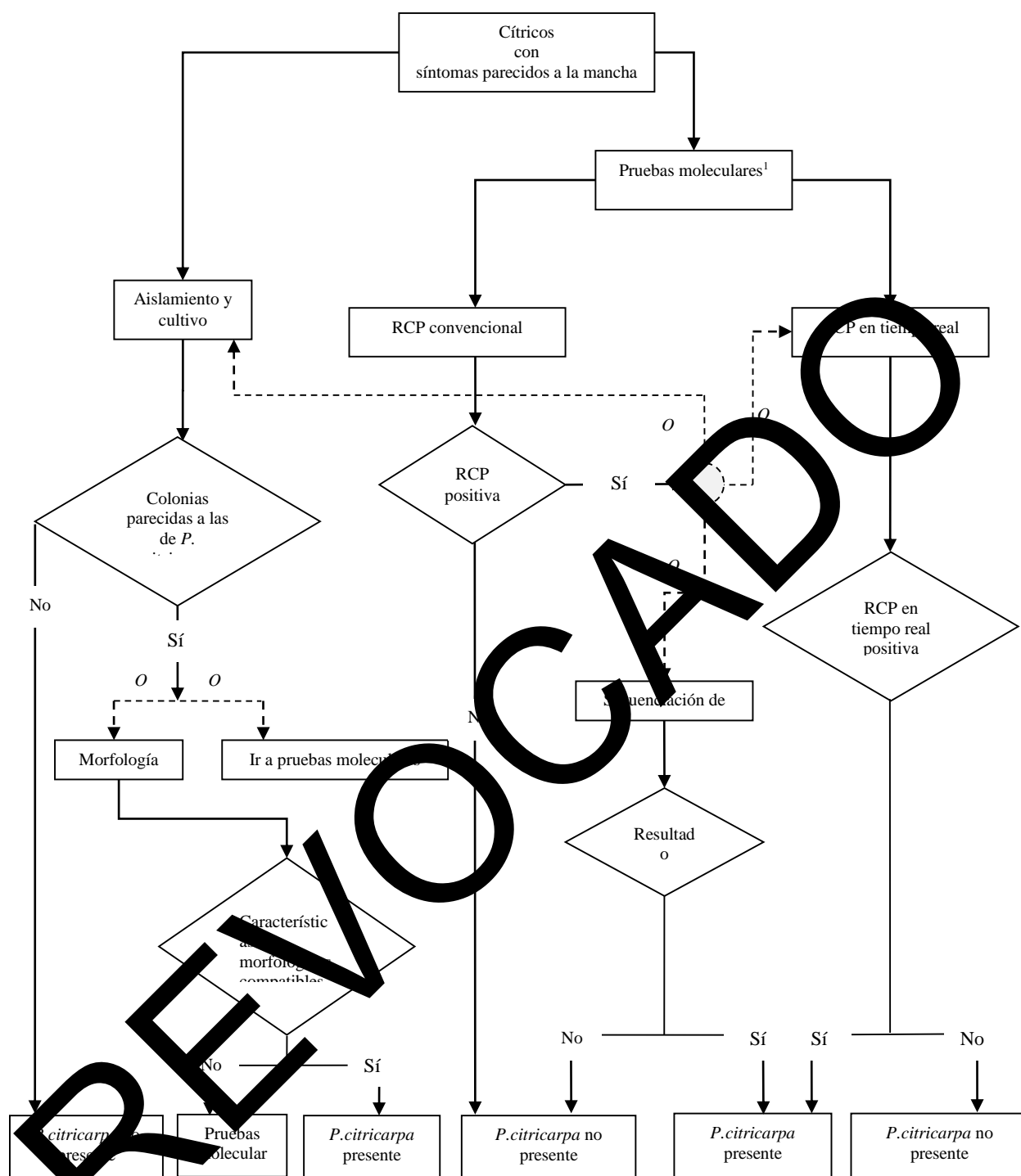


Figura 4. Diagrama de flujo para el diagnóstico de *Phyllosticta citricarpa* en cítricos

¹Los ensayos moleculares se han validado para la identificación del organismo en cultivos puros y en las lesiones de los frutos, pero no en otros materiales vegetales (por ejemplo hojas o ramas). ETI, espaciador de transcripción interna; RCP, reacción en cadena de la polimerasa.

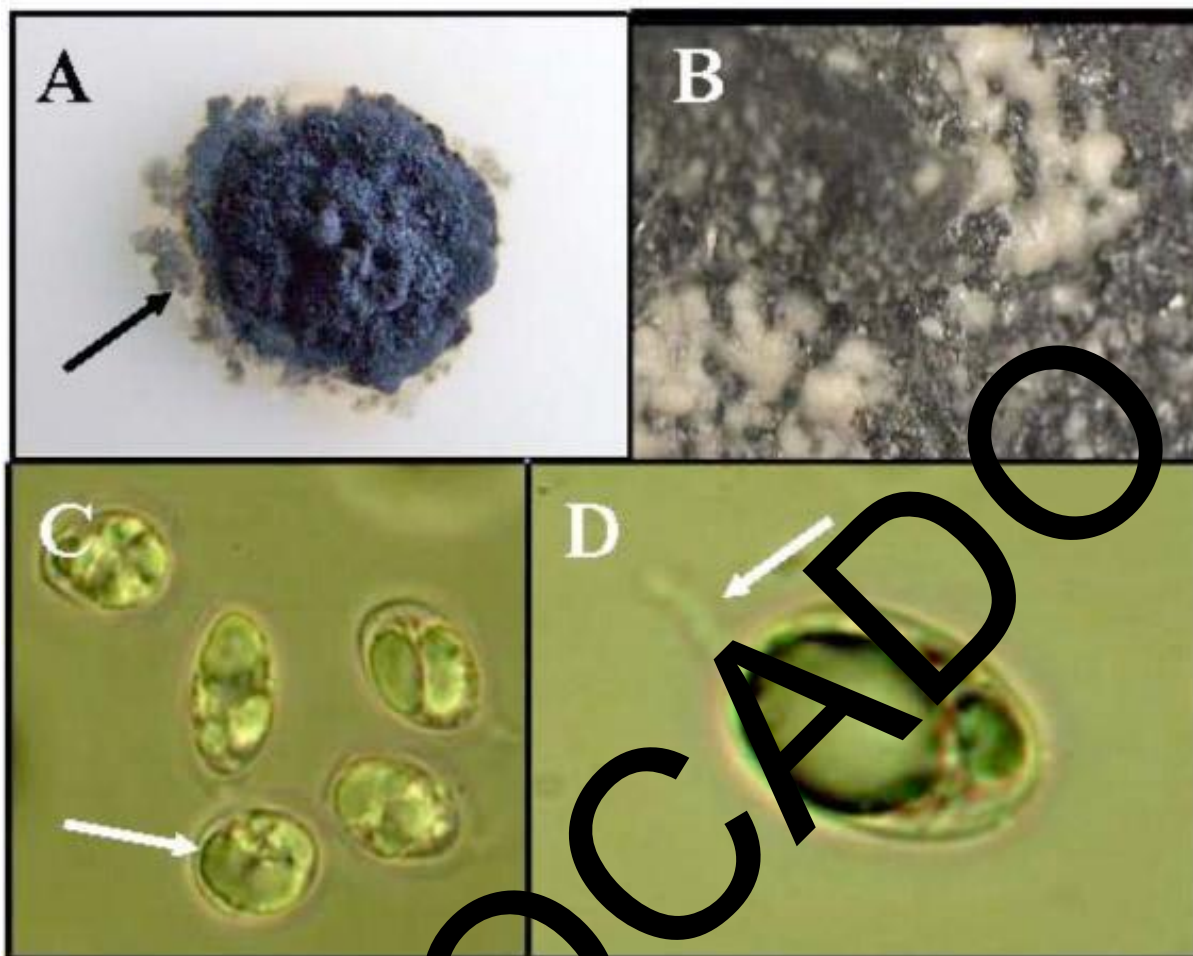


Figura 5. Características de las colonias y morfología de los conidios de *Phyllosticta citricarpa*: A) colonia con borde irregular rodeada de una zona translúcida de medio sumergido incoloro (flechas) después de 30 días de crecimiento en agar-dextrosa-papa pH 5, a 25 °C y con un fotoperíodo de 12 horas; B) mucílago conidial rezumando de los picnidios maduros; C, D) conidios con una cubierta mucoide fina (C, flecha) y un apéndice subulado incoloro (D, flecha, aumento de 1 000x con aceite de inmersión).

Fotografías cedidas por L.E. Díaz, Instituto de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay.



Figura 6. Morfología de los conidios y características de los cultivos de *Phyllosticta citricarpa* y *Phyllosticta capitalensis*. A) conidios de *P. citricarpa* con una cubierta mucoide fina ($<1,5 \mu\text{m}$); B, C) conidios de *P. capitalensis* con una cubierta mucoide gruesa ($>1,5 \mu\text{m}$) (barra de escala = $10 \mu\text{m}$) (la fotografía C se tomó en un microscopio óptico con contraste de interferencia diferencial); D, E) colonias de *P. citricarpa* (D) y *P. capitalensis* (E) después de siete días de crecimiento en agar-harina de avena (fila superior), agar-extracto de malta (fila media) y agar-decocción de cerezas (fila inferior) (obsérvese la producción de un pigmento amarillo alrededor de la colonia de *P. citricarpa* cultivada en agar-harina de avena (D, flechas) y la ausencia de este pigmento en los cultivos de *P. capitalensis* obtenidos en el mismo medio (E)).

Fotografías cedidas por G. Verkley, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Países Bajos (A, B, C) y W. van Lienden, Plant Protection Service, Wageningen, Países Bajos (D, E).

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

Esta historia de la publicación se refiere sólo a la versión española. Para la historia completa de la publicación, consulte la versión en inglés de la norma.

2006-03 La CMF-1 añadió este tema al programa de trabajo Hongos y organismos similares a los hongos, 2006-006

2004-11 El CN añadió el tema *Guignardia citricarpa* (2004-023)

2011-11 Aprobación por el CN para consulta a los miembros mediante decisión por medios electrónicos (2011_eSC_Nov_06)

2012-07 Consulta a los miembros

2013-03 Se cambió el título en *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa en frutas (2004-023)

2013-07 El GTPD revisó el texto y lo remitió al CN a fin de que lo aprobara para su adopción (2013_eTPDP_Jun_01)

2013-10 Aprobación del CN por medios electrónicos para el período de notificación de 45 días (2013_eSC_Nov_13)

2014-12/01 Período de notificación del PD; se recibió una objeción formal

2014-02/03 El GTPD revisó el texto en una reunión virtual

2014 Aprobación del CN para el período de notificación de 45 días (2014_eSC_Nov_01)

2014-07/08 Período de notificación del PD

2014-08 El CN aprobó el PD en nombre de la CMF

NIMF 27. Anexo 5. *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa en frutas (2014) Roma, CIPF, FAO.

2015-09 La Secretaría de la CIPF incorporó las enmiendas a tinta en conformidad con el procedimiento de revocación de las normas aprobado por la CMF-10 (2015).

Última actualización de la historia de la publicación: 2015-12.