

NIMP 27

Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas

PD 6: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Adoptado en 2014; publicado en 2016

ÍNDICE

1.	Información sobre la plaga	2
2.	Información taxonómica	2
3.	Detección	3
3.1	Detección en plantas sintomáticas	3
3.1.1	Síntomas	3
3.1.2	Aislamiento	4
3.1.3	Detección serológica: inmunofluorescencia indirecta	4
3.1.4	Detección molecular	5
3.1.4.1	Controles para las pruebas moleculares	5
3.1.4.2	Extracción de ADN de tejido infectado de cítricos	6
3.1.4.3	PCR convencional	7
3.1.4.4	PCR en tiempo real	8
3.1.5	Interpretación de los resultados de la PCR convencional y en tiempo real	8
3.1.6	Detección mediante bioensayos	9
3.1.6.1	Prueba de inoculación en discos de hojas	9
3.1.6.2	Enriquecimiento de hojas desprendidas	9
3.2	Detección en plantas sintomáticas	10
4.	Identificación	10
4.1	Métodos de PCR	11
4.2	Detección serológica	12
4.2.1	DAS-ELISA	12
4.2.2	ELISA indirecto	13
4.3	Pruebas de patogenicidad	13
4.4	Descripción y características bioquímicas	13
4.5	Identificación molecular	14
4.5.1	Análisis de secuencias multilocus	14
4.5.2	Identificación por rep-PCR	14
5.	Registros	15
6.	Puntos de contacto para información adicional	15
7.	Agradecimientos	16
8.	Referencias	16
9.	Figuras	20

1. Información sobre la plaga

Xanthomonas citri subsp. *citri* es el principal agente causal de la cancrrosis bacteriana de los cítricos. Genera daños en muchas especies de *Rutaceae* (EPPO, 1979) – principalmente *Citrus* spp., *Fortunella* spp. y *Poncirus* spp. – que se cultivan en los entornos tropicales y subtropicales predominantes en muchos países de Asia, América del Sur, Oceanía y África, así como en Florida (Estados Unidos) (CABI, 2006; EPPO, 2006). Se han identificado cepas atípicas de *X. citri* subsp. *citri*, denominadas cepas A* y A^w (Sun *et al.*, 2004; Vernière *et al.*, 1998), con una gama de hospedantes restringida. La cepa A* afecta a *Citrus aurantiifolia* (lima mexicana) en condiciones naturales en Asia. La cepa A^w provoca cancrrosis en *Citrus aurantiifolia* (lima mexicana) y *Citrus macrophylla* (Alemow) en Florida (Estados Unidos), en condiciones naturales (Cubero y Graham, 2002, 2004). Se ha constatado que ambas cepas causan lesiones atípicas en otras especies de cítricos, en condiciones experimentales (Escalon *et al.*, 2013).

La cancrrosis bacteriana de los cítricos suele afectar a los plantones y árboles jóvenes y adultos de hospedantes vulnerables con crecimiento activo de vástagos y hojas desde finales del verano y durante el otoño en la mayoría de las zonas de cultivo de cítricos. Las lesiones se forman en las hojas, los vástagos, las ramillas y los frutos de los hospedantes vulnerables. Las heridas, producidas por el viento, las espinas, los insectos y otros daños físicos y mecánicos, facilitan la infección de los tejidos maduros. Las invasiones de *Phyllocnistis citrella*, el minador de las hojas de los cítricos, pueden aumentar la vulnerabilidad de las hojas al cáncer de los cítricos (Vall *et al.*, 2000).

X. citri subsp. *citri* puede sobrevivir en tejidos vegetales enfermos, como epífita en plantas hospedantes y no hospedantes, y como saprofita en cubiertas vegetales de paja o en el suelo. No obstante, las lesiones invernantes, en particular las que presentan los vástagos angulosos, son la fuente más importante de inóculo para la temporada siguiente. Los principales mecanismos de dispersión a corta distancia son la lluvia impulsada por el viento y las salpicaduras de agua en una misma planta o entre plantas: las bacterias se propagan por el agua pluvial que recorre la superficie de las lesiones y que luego salpica los vástagos sanos (CABI, 2006). Se ha constatado que el desplazamiento de material vegetal infectado, como material de propagación, patrones y árboles injertados, contribuye a la dispersión a larga distancia. No existen pruebas de que este patógeno se transmita a través de las semillas (CABI, 2006).

2. Información taxonómica

Nombre: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Gabriel *et al.* 1989) Schaad *et al.* (2007)

Sinónimos: *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* Gabriel *et al.*, 1989, Schaad *et al.*, 2007

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Hasse) Vauterin *et al.*, 1995

Xanthomonas citri (ex Hasse, 1915) Gabriel *et al.*, 1989

Xanthomonas campestris pv. *aurantifolii* Gabriel *et al.*, 1989

Xanthomonas campestris pv. *citri* (Hasse) Dye, 1978

Xanthomonas citri f.sp. *aurantifoliae* Namekata y Oliveira, 1972

Pseudomonas citri Hasse, 1915

Posición taxonómica: Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae

Nombres comunes: cáncer (o cancro o chancro) de los cítricos, cancrrosis bacteriana de los cítricos, cáncer asiático u oriental

Nota: Recientemente, *X. axonopodis* pv. *citri* (cepas del grupo A de *X. campestris* pv. *citri*) se ha reclasificado como *X. citri* subsp. *citri*. Se ha recuperado la nomenclatura de Gabriel *et al.* (1989) y el nombre aceptado del patógeno de la cancrrosis bacteriana de los cítricos es actualmente *X. citri*

subsp. *citri* (Bull *et al.*, 2010; Schaad *et al.*, 2006). Las cepas de los otros grupos de *X. campestris* pv. *citri* se han reclasificado como *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (grupos B, C y D) y *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (grupo E) (Schaad *et al.*, 2006).

3. Detección

3.1 Detección en plantas sintomáticas

El cáncer de los cítricos se puede diagnosticar observando las características morfológicas de las colonias en medios nutritivos, así como mediante pruebas serológicas (por inmunofluorescencia (IF)), pruebas moleculares (mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) y bioensayos en discos de hojas u hojas desprendidas. Todas las pruebas deberán incluir controles negativos y positivos (los controles de referencia se describen en la sección 4).

3.1.1 Síntomas

Los síntomas característicos de la enfermedad son costras o lesiones características en la cáscara (corteza) de los frutos y en las hojas, los tallos y los vástagos. Los síntomas del cáncer de los cítricos pueden darse en plantones, en todas las estaciones, y en árboles jóvenes, desde finales del verano y durante el otoño, cuando se produce un crecimiento abundante de vástagos angulosos (CABI, 2006) (figuras 1-4). La enfermedad se hace más esporádica a medida que los árboles alcanzan el desarrollo óptimo para la producción de frutos, debido a que se generan menos vástagos angulosos y a que el tejido foliar más antiguo y los frutos maduros son más resistentes a la infección por cáncer de los cítricos en condiciones naturales. La gravedad de la enfermedad también depende de la vulnerabilidad de las especies vegetales y cultivares hospedantes (Goto, 1992).

Síntomas en los frutos. Se desarrollan lesiones características en la superficie del fruto, ya sea dispersas en puntos aislados o formando patrones irregulares por la unión de varias lesiones. En los frutos jóvenes infectados se podrá observar la exudación de sustancias resinosas. Las lesiones nunca se extienden a través de la cáscara.

Síntomas en las ramas. En condiciones de sequedad, la mancha del cáncer es suberosa o esponjosa, sobresale y presenta una superficie resquebrajada. En condiciones húmedas, la lesión aumenta rápidamente de tamaño, pero su superficie no se resquebraja y presenta un borde aceitoso. En los cultivares menos vulnerables, podrá formarse una capa de callo entre los tejidos enfermos y sanos. La cicatriz de cáncer podrá identificarse raspando la superficie rugosa con un cuchillo para retirar la capa suberosa exterior y revelar la presencia de lesiones de color marrón claro a marrón oscuro en los tejidos sanos de la corteza verde. La zona afectada por el cambio de color puede tener formas diversas y su tamaño puede variar entre los 5 y los 10 mm, en función de la vulnerabilidad de la planta hospedante.

Síntomas en las hojas. El primer síntoma es la aparición de manchas de color amarillo vivo en el envés de las hojas. A continuación, aparecen lesiones protuberantes de color amarronado en ambas caras de las hojas. Las hojas se vuelven rugosas, agrietadas y suberosas. El cáncer podrá estar rodeado por un halo amarillo o clorótico impregnado.

Los síntomas del cáncer de los cítricos en las ramas, las hojas y los frutos se podrán confundir con síntomas similares en forma de costras o de manchas en las hojas provocados por otras bacterias u hongos que infectan a los cítricos o por desequilibrios fisiológicos. Otras bacterias que pueden causar síntomas similares a los del cáncer de los cítricos son *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* y *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*. Ambas bacterias afectan a una gama de hospedantes limitada, provocan síntomas menos agresivos y rara vez producen lesiones en los frutos (Schaad *et al.*, 2005, 2006). Se ha informado que la sarna de los cítricos provocada por el hongo *Elsinoë fawcettii* produce síntomas similares a los del cáncer de los cítricos, en particular en variedades de las especies hospedantes que muestran resistencia a la sarna de los cítricos (Taylor *et al.*, 2002), aunque en general sus lesiones son más secas y más irregulares que las del cáncer y a veces carecen del halo amarillo característico. La

sarna de los cítricos se puede diferenciar del cáncer de los cítricos por la ausencia de exudado bacteriano.

3.1.2 Aislamiento

Para el correcto aislamiento de *X. citri* subsp. *citri* a partir de material vegetal con síntomas es fundamental utilizar extractos de muestras recién preparados. El material vegetal debería analizarse lo antes posible después de su obtención; podrá almacenarse a una temperatura de entre 4 y 8 °C hasta su tratamiento. Cuando los síntomas están muy avanzados o las condiciones ambientales no son favorables, el material puede contener muy pocas células cultivables de *X. citri* subsp. *citri* y en su aislamiento pueden obtenerse placas saturadas con bacterias competidoras saprófitas o antagonistas. Debería ponerse especial atención en evitar confundir las colonias de *X. citri* subsp. *citri* con las colonias de *Pantoea agglomerans*, que también se suele aislar a partir de las lesiones de cáncer y genera colonias morfológicamente similares en medios de cultivo bacteriológico estándar. Por lo general, *P. agglomerans* crece más rápido y las colonias son de un amarillo más intenso que el color amarillo o limón pálido de las colonias de *X. citri* subsp. *citri*.

El aislamiento del agente causal se puede efectuar mediante la siembra en estrías de extractos de lesiones sobre placas con un medio de cultivo adecuado, en el que las colonias de *X. citri* subsp. *citri* presentan un aspecto característico. Todavía no existen medios de cultivo selectivos exclusivamente para *X. citri* subsp. *citri*.

Las lesiones se maceran en 0,5–1,0 ml de solución salina (agua destilada esterilizada con NaCl al 0,85 %, pH 7,0); en caso pertinente, se podrán desinfectar previamente con NaClO al 1 % durante 1 min, enjuagarse tres veces con agua destilada esterilizada y pulverizarse. La siembra sobre un medio nutritivo una porción del extracto. Los medios de aislamiento general adecuados son el agar nutritivo complementado con un 0,1 % de glucosa (NGA) o el agar levadura peptona glucosa o YPGA (extracto de levadura, 5 g; peptona Bacto™, 5 g; glucosa, 1 g; agar, 20 g; agua destilada, 1 litro; pH 7,0) y el medio Wakimoto (caldo de patata, 20 g/ml, extracto de levadura, 15 g; peptona, 5 g; Na₂HPO₄·12H₂O, 0,8 g; Ca(NO₃)₂·7 H₂O, 0,5 g; agar Bacto™, 20 g; agua destilada, 1 litro; pH 7,2). En caso necesario, se puede añadir cicloheximida esterilizada por filtración (100 mg/l) como fungicida después del autoclavado del medio de cultivo.

Las colonias presentan, en los tres medios, morfología circular y convexa, con bordes lisos, y tienen aspecto mucoso y color amarillo crema. El crecimiento se evalúa tras incubar de tres a cinco días a 25–28 °C. En las muestras de fruto comercializados, las bacterias pueden estar sometidas a factores adversos que podrán dificultar su cultivo, por lo que podrán requerirse períodos de incubación más prolongados, o bien las bacterias se pueden recuperar de las muestras mediante bioensayos, como se indica en la sección 3.1.6.2. La incorporación al medio de kasugamicina y cefalexina (medio semiselectivo KCB (KCB)) inhibe varias bacterias saprófitas y facilita el aislamiento del patógeno (Grabm et al., 1989; Pruvost et al., 2005).

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las menciones de nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en los métodos publicados se define la sensibilidad, la especificidad y la reproducibilidad logrados inicialmente. La mención de nombres de sustancias químicas (ej., marcas comerciales) no implica su aprobación ni la exclusión de otras que también podrán ser adecuadas. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las prácticas establecidas en cada laboratorio, siempre que se validen adecuadamente.

3.1.3 Detección serológica: inmunofluorescencia indirecta

Para la detección serológica (mediante inmunofluorescencia y ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)), es fundamental contar con controles adecuados para garantizar que los resultados de las pruebas sean fidedignos. Todas las pruebas deberán incluir controles negativos y positivos. Los controles positivos pueden consistir en una cepa de *X. citri* subsp. *citri* de referencia resuspendida en un extracto de plantas hospedantes sanas (para su detección en material vegetal) o en una solución salina con tampón fosfato (PBS) (para la identificación de cultivos bacterianos). Los controles

negativos deberían consistir en un extracto de plantas hospedantes sanas (para su detección en material vegetal) o en una suspensión de especies bacterianas distintas de la especie objetivo (para la identificación de cultivos bacterianos).

Para la detección serológica de células bacterianas, se recoge del cultivo fresco de la placa el contenido de un asa y se resuspende en 1 ml de PBS (NaCl, 8 g; KCl, 0,2 g; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 g; KH₂PO₄, 0,2 g; agua destilada, hasta 1 litro; pH 7,2) para obtener aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml (EPPO, 2009).

Para la detección serológica en tejido vegetal, deberían elegirse muestras con síntomas: vástagos, ramitas, hojas y frutos que presenten lesiones necróticas, o bien tejido de canchales en ramitas, ramas, el tronco o el pie. Las muestras se deberían procesar siguiendo el procedimiento general recomendado para la prueba serológica específica que vaya a utilizarse. Por lo general, el tejido vegetal se tritura en una solución tampón de maceración antioxidante recién elaborada (polivinilpirrolidona (PVP)–10, 20 g; manitol, 10 g; ácido ascórbico, 1,76 g; glutatión reducido, 3 g; PBS, 10 mM, 1 litro; pH 7,2) o en PBS (NaCl, 8 g; KCl, 0,2 g; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 g; KH₂PO₄, 0,2 g; agua destilada, hasta 1 litro; pH 7,2) antes de utilizarlo en las pruebas serológicas. Ambas soluciones se esterilizan por filtración con una membrana estéril de 0,22 µm.

Se pipetea 25 µl de cada una de las preparaciones bacterianas o muestras vegetales que se someterán a la prueba y se depositan sobre un portaobjetos de microscopio con varias cavidades y recubierto de plástico. Tras dejarlas secar al aire, se fijan suavemente con calor sobre una llama. Se preparan portaobjetos distintos para cada bacteria o muestra de la prueba, también para los controles positivos y negativos, como los que se utilizan para el ELISA. Se diluye el suero o anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado en PBS (pH 7,2) y se añaden 25 µl de diluciones adecuadas a las cavidades de todos los portaobjetos. Los controles negativos pueden ser suero normal (no inmunizado) en una dilución y en PBS. Los portaobjetos se incuban durante 30 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Se sacuden las gotículas de los portaobjetos, se enjuagan con PBS y luego se lavan en PBS tres veces, durante cinco minutos cada vez. Los portaobjetos se secan cuidadosamente con material absorbente antes de depositar con pipeta en cada cavidad 25 µl del conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la gammaglobulina anti-especie apropiada en la dilución adecuada. Los portaobjetos se incuban durante 30 minutos a oscuras y a temperatura ambiente, se enjuagan, se lavan y se secan con material absorbente. Por último, se añaden 10 µl de tampón fosfato glicerol 0,1 mM (pH 7,6) con un reductor del apareamiento (*antifading agent*) a cada una de las cavidades, y a continuación se cubren con una cubreobjetos.

Los portaobjetos se examinan con aceite de inmersión con un microscopio de fluorescencia a 600× o 1 000× aumentos. Bajo la luz ultravioleta del microscopio, el FITC presenta fluorescencia verde brillante. Si el control positivo, que contiene una bacteria conocida, muestra células bacterianas baciliformes fluorescentes, los controles negativos, que contienen suero normal y PBS, no muestran fluorescencia. Se examinan las cavidades con las muestras en busca de células bacterianas fluorescentes con el tamaño y la forma de *X. citri* subsp. *citri*. Este método permite detectar aproximadamente 10⁴ ufc/ml.

3.1.4 Detección molecular

3.1.4.1 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fidedigno el resultado de las pruebas, es fundamental emplear controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre necesario. Para la PCR, deberían utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico, un control interno y un control negativo de amplificación (control sin molde). A continuación se describen estos controles y otros que deberían considerarse para todas las series de extracciones de ácidos nucleicos de las muestras de su prueba.

Control positivo de ácido nucleico. Para controlar la eficiencia de la amplificación mediante PCR, se podrá utilizar como control ácido nucleico previamente preparado (almacenado), el ADN genómico completo o un control sintético (p. ej., un producto de PCR clonado).

Controles internos. Para la PCR convencional y en tiempo real, debería incorporarse como control al protocolo de PCR un gen de mantenimiento vegetal, por ejemplo el COX (Weller *et al.*, 2000), ADN ribosomal (ADNr) 16S (Weisberg *et al.*, 1991) o GADPH (Mafra *et al.*, 2012), a fin de descartar la posibilidad de falsos negativos debido a deficiencias en la extracción del ácido nucleico o a su degradación, o a la presencia de inhibidores de la PCR.

Control negativo de amplificación (control sin molde). Para la PCR convencional y en tiempo real, el agua de calidad apta para PCR que se utilizó para preparar la mezcla de reacción se añade a la fase de amplificación a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción.

Control positivo de extracción. Este control se utiliza para velar por que el ácido nucleico del objetivo sea de calidad suficiente para la amplificación mediante PCR. El ácido nucleico se extrae de tejido infectado del hospedante o de tejido vegetal sano al que se ha añadido una concentración del objetivo igual a la considerada como límite de detección del protocolo.

En el control positivo debe utilizarse aproximadamente una décima parte de la cantidad de tejido foliar utilizada por planta para la extracción de ADN. Para la PCR, deben tomarse precauciones para evitar la contaminación cruzada por aerosoles procedentes del control positivo de las muestras positivas. De ser necesario, el control positivo empleado en el laboratorio debería secuenciarse a fin de que esta secuencia se pueda comparar fácilmente con las secuencias obtenidas de los amplicones de la PCR del tamaño correcto. Otra opción es elaborar controles positivos internos que contengan una secuencia conocida que, de nuevo, se puede comparar con los amplicones de la PCR del tamaño correcto.

Control negativo de extracción. Este control se utiliza para controlar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico y la reacción cruzada con el tejido hospedante. El control comprende ácido nucleico extraído de tejido no infectado del hospedante y posteriormente amplificado. Cuando se analicen muestras positivas se recomienda utilizar varios controles.

3.1.4.2 Extracción de ADN de tejidos infectados de cítricos

La extracción de ADN de tejido infectado de cítricos fue realizada por primera vez por Hartung *et al.* (1993) con un protocolo de extracción con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), pero diversos métodos comerciales y un protocolo de extracción con isopropanol (para el que no se requiere fenol) se han evaluado ampliamente (Llop *et al.*, 1999). El ADN también se ha extraído satisfactoriamente de tejidos de cítricos mediante equipos comerciales de extracción de ADN (p. ej., el equipo de extracción de ADN genómico Promega Wizard) (Coletta-Filho *et al.*, 2006).

En el protocolo de isopropanol, las lesiones o el material vegetal que se sospecha que puede estar infectado se cortan en pequeños trozos, se cubren con PBS y se introducen en un agitador giratorio durante 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se filtra (para eliminar el material vegetal) y se centrifuga a 10 000 g durante 20 min. El sedimento se resuspende en 1 ml de PBS: 500 µl se guardan para un análisis ulterior o para su aislamiento directo en placas de agar, y 500 µl se centrifugan a 10 000 g durante 10 min. El sedimento se resuspende en 500 µl de tampón de extracción (200 mM de tris-HCl, pH 7,5; 250 mM de NaCl; 25 mM de etilendiaminotetraacético (EDTA); 0,5 % de dodecilsulfato sódico (SDS); 2 % de PVP), se mezcla en vórtex y se deja 1 h a temperatura ambiente con agitación continua. A continuación, la suspensión se centrifuga a 5 000 g durante 5 min y después se transfieren 450 µl del sobrenadante a un nuevo tubo y se mezclan con 450 µl de isopropanol. La suspensión se mezcla con suavidad y se deja reposar 1 h a temperatura ambiente. La precipitación se puede mejorar si se utiliza el coprecipitante Pellet Paint (Cubero *et al.*, 2001). La suspensión se centrifuga a 13 000 g durante 10 min, se desecha el sobrenadante y se seca el sedimento. El sedimento se resuspende en 100 µl de agua. Se utiliza una muestra de 5 µl para un volumen de PCR de 50 µl.

3.1.4.3 PCR convencional

Existen varios pares de cebadores para el diagnóstico de *X. citri* subsp. *citri*. Los cebadores 2 y 3 de Hartung *et al.* (1993) amplifican un fragmento de ADN polimórfico en la longitud de los fragmentos de restricción *Bam*HI que es específico para *X. citri* subsp. *citri*; son los que de uso más común en ensayos con material vegetal debido a su buena especificidad y sensibilidad (aproximadamente 10^2 ufc/ml). Los cebadores *J-pth1* y *J-pth2* amplifican un fragmento de 197 pares de bases (pb) de la señal de localización nuclear del gen de virulencia *pthA* en las cepas de *Xanthomonas* que producen los síntomas del cancro de los cítricos. Entre estas cepas se encuentran *X. citri* subsp. *citri*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* y las cepas atípicas A* y A^w de *X. citri* subsp. *citri*, detectadas en Florida (Cubero y Graham, 2002). Se trata de cebadores universales, pero presentan menos sensibilidad (10^4 ufc/ml en material vegetal) que los de Hartung *et al.* (1993). No obstante, los cebadores de Hartung no detectan la cepa A^w ni ninguna de las cepas A* de *X. citri* subsp. *citri*, ni tampoco *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*. En las situaciones en que se sospecha la presencia de cepas atípicas A* y A^w de *X. citri* subsp. *citri* — por ejemplo, cuando se observan síntomas del cáncer de los cítricos en los hospedantes *C. aurantiifolia* (lima mexicana) y *C. macrophylla* (Alemow)— deben usarse ambos pares de cebadores.

Protocolo de PCR de Hartung *et al.* (1993)

Los cebadores son:

2 (inverso): 5'-CAC GGG TGC AAA AAA TCT-3'

3 (directo): 5'-TGG TGT CGT CGC TTG TAT-3'.

La mezcla de la PCR se prepara en un tubo estéril y está compuesta por tampón de PCR (50 mM de tris-HCl, pH 9; 20 mM de NaCl; 1 % de Triton X-100; 0,1 % de glicerina; 3 mM de MgCl₂), 1 μM de cada cebador 2 y 3, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) y 1,25 U de polimerasa de ADN Taq. Se añade un volumen de 5 μl de muestra del ADN extraído a 45 μl de la mezcla de la PCR para obtener un total de 50 μl por reacción. Las condiciones de la reacción consisten en una fase inicial de desnaturalización a 95 °C durante 2 min seguida de 35 ciclos de 95 °C durante 60 s, 58 °C durante 70 s y 72 °C durante 75 s, y una fase de extensión final de 72 °C durante 10 min. El tamaño de los amplicones es de 222 pb.

Protocolo de PCR de Cubero y Graham (2002)

Los cebadores son:

J-pth1 (directo): 5'-CTT TAA CTC AAA CGCC GGA C-3'

J-pth2 (inverso): 5'-CAT CGC GCT GTT CGG GAG-3'.

La mezcla de la PCR se prepara en un tubo estéril y está compuesta por tampón de Taq 1×, 3 mM de MgCl₂, 1 μM de cada cebador *J-pth1* y *J-pth2*, 0,2 mM de cada dNTP y 1 U de polimerasa de ADN Taq. Se añade un volumen de 2,5 μl de muestra del ADN extraído a 22,5 μl de la mezcla de la PCR para obtener un total de 25 μl por reacción. Las condiciones de la reacción consisten en una fase inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min seguida de 40 ciclos de 93 °C durante 30 s, 58 °C durante 40 s y 72 °C durante 45 s, y una fase de extensión final de 72 °C durante 10 min. El tamaño de los amplicones es de 198 pb.

También se han desarrollado protocolos basados en la PCR anidada, la inmunocaptura y la detección colorimétrica de productos de la PCR anidada para la detección directa y sensible de *X. citri* subsp. *citri* en plantas (Hartung *et al.*, 1993). Se ha dado a conocer un examen comparativo de la sensibilidad de los distintos protocolos y cebadores en cultivos puros y extractos de frutos (Golmohammadi *et al.*, 2007).

3.1.4.4 PCR en tiempo real

Después de obtener el ADN del material vegetal mediante el protocolo anteriormente descrito de Llop *et al.* (1999), el sedimento se resuspende en 100 µl de agua ultrapura estéril y se almacena a -20 °C hasta su utilización.

Se diseñó un conjunto de cebadores, *J-pth3* (5'-ACC GTC CCC TAC TTC AAC TCA A-3') y *J-pth4* (5'-CGC ACC TCG AAC GAT TGC-3'), y la sonda TaqMan correspondiente (*J-Taqpht2*) (5'-ATG CGC CCA GCC CAA CGC-3') marcadas en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína y en el extremo 3' con tetrametilrodamina, a partir de secuencias del gen *pth*, un importante gen de virulencia utilizado en otros estudios para detectar específicamente cepas de *X. citri* subsp. *citri* (Cubero y Graham, 2005). Entre estas cepas se encuentran *X. citri* subsp. *citri*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* y las cepas atípicas A* y A^w de *X. citri* subsp. *citri* detectadas en Florida.

La PCR en tiempo real se efectúa añadiendo 2 µl de ADN molde a una mezcla de reacción que contiene 12,5 µl de QuantiMix Easy Kit, que contiene QuantiMix Easy Master Mix y MgCl₂ (50 mM), 1 µl de 10 µM de cebador directo (*J-RTpth3*), 1 µl de 10 µM de cebador inverso (*J-RTpth4*) y 0,5 µl de 10 µM de sonda TaqMan (*J-Taqpht2*), y completando con agua destilada estéril hasta un volumen final de reacción de 25 µl. El protocolo de PCR en tiempo real se ha desarrollado usando un sistema de detección ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. Con otro equipo se han obtenido resultados similares (María López, com. pers., 2013). Las condiciones de amplificación para los cebadores y las sondas consisten en una fase inicial de activación de 15 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Plant Print Diagnostics (<http://www.plantprint.com>) dispone de un equipo completo de PCR en tiempo real basado en este protocolo y que incluye la mezcla maestra y la enzima.

Con la PCR en tiempo real se consigue una especificidad similar a la de los cebadores del gen *pth* utilizados en el método de PCR convencional (Cubero y Graham, 2002, 2005); asimismo, permite la detección fidedigna de aproximadamente 10³ ufc de *X. citri* subsp. *citri* a partir de lesiones de hojas enfermas y de una dilución de células cultivadas (Mavrodieva *et al.*, 2004). Este método se ha comparado recientemente con la PCR convencional y la PCR anidada (Golmohammadi *et al.*, 2007) y se determinó una sensibilidad de la detección de *X. citri* subsp. *citri* en lesiones de los frutos de 10 ufc/ml.

3.1.5 Interpretación de los resultados de la PCR convencional y en tiempo real

PCR convencional

La PCR específica del patógeno solo se considerará válida si se cumplen los siguientes criterios:

- el control positivo produce un amplicón del tamaño correcto para la bacteria, y
- no se producen amplicones del tamaño correcto para la bacteria en el control negativo de extracción ni en el control negativo de amplificación.

Si también se usa a cebadores ADNr 16S de control interno, entonces el control negativo (tejido vegetal sano), si se utiliza, el control positivo y todas las muestras de la prueba producirán una banda de aproximadamente 1,6 kilobases (kb) (el tamaño de los amplicones dependerá de los cebadores ADNr 16S utilizados (Weisberg *et al.*, 1991)). Téngase en cuenta que si se utilizan controles positivos sintéticos o plásmidos no se producirá una banda de 1,6 kb. Si no se logra la amplificación de las muestras con los cebadores de control interno, la causa puede ser, por ejemplo, una deficiente extracción de ADN, que no se incluyó el ácido nucleico en la mezcla de la reacción, que hay presencia de compuestos inhibidores de la PCR en el extracto de ADN o que el ADN se ha degradado.

Las muestras se considerarán positivas si producen un amplicón del tamaño correcto.

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real solo se considerará válida si se cumplen los siguientes criterios:

- el control positivo produce una curva de amplificación con los cebadores específicos del patógeno, y
- no se observa ninguna curva de amplificación (esto es, el valor de ciclo umbral (Ct) es 40) con el control negativo de extracción ni con el control negativo de amplificación.

Si también se recurre a cebadores COX de control interno, entonces el control negativo, si se utiliza, el control positivo y todas las muestras de la prueba deben producir una curva de amplificación. Si las muestras no producen una curva de amplificación con los cebadores de control, la causa puede ser, por ejemplo, una deficiente extracción de ADN, que no se incluyó el ADN en la mezcla de reacción, que hay presencia de compuestos inhibidores de la PCR en el extracto de ADN o que el ADN se ha degradado.

Las muestras se considerarán positivas si producen una curva de amplificación típica. Debe verificarse el valor de ciclo umbral en cada laboratorio cuando la prueba se realice por primera vez.

3.1.6 Detección mediante bioensayos

3.1.6.1 Prueba de inoculación en discos de hojas

Esta prueba consiste en la inoculación de tejido foliar de cítricos vulnerables a *X. citri* subsp. *citri* con extractos de muestras de plantas enfermas y su incubación en condiciones adecuadas para la proliferación bacteriana y el desarrollo de pústulas indicativas de enfermedad.

El procedimiento de este bioensayo comienza con la esterilización de placas de ELISA durante 15 minutos en un horno de microondas y la adición a los pocillos de la placa de 200 µl de agar al 1,5 % en agua estéril en una cámara de flujo laminar a temperatura ambiente. Se desinfecta la superficie de las hojas jóvenes de *Citrus paradisi* var. Duncan (pomelo) o de otros cítricos hospedantes vulnerables, por ejemplo *Citrus aurantifolia* (lima mexicana) o *Poncirus trifoliata* (naranja trifoliado), con NACIO al 1 % durante 1 min. Las hojas deberían estar completamente desarrolladas pero no maduras ni viejas. Se enjuagan tres veces con agua destilada estéril y a continuación se seca su superficie en una cámara de flujo laminar a temperatura ambiente. Los discos de hojas, extraídos mediante un perforador (desinfectado con etanol al 95 %), se colocan en el agar de agua con la superficie basal (el haz) hacia abajo en todos los pocillos. Se añaden 50 µl de macerado de lesiones de cáncro de los cítricos a cuatro pocillos por cada muestra vegetal).

Se utiliza una suspensión de 10^5 ufc/ml de *X. citri* subsp. *citri* como control positivo y una solución salina estéril como control negativo (cuatro de cada). Se tapan herméticamente las placas (p. ej., con Parafilm) para que alcancen una humedad relativa cercana al 100 %, y se incuban durante 12 días a 28 °C con luz constante; se revisa su evolución con regularidad. A partir del tercer día se estudia la formación de pústulas incipientes de aspecto blanquecino en los discos de hojas por medio de un microscopio estereoscópico y aplicando las técnicas de aislamiento descritas en la sección 3.1.2 para *X. citri* subsp. *citri*. Los discos que no presenten síntomas se pueden analizar ulteriormente mediante su aislamiento en medios semiselectivos para detectar la presencia de bacterias vivas (Verdier *et al.*, 2008). Después de 12 días, si hay presencia de *X. citri* subsp. *citri*, las células bacterianas se habrán multiplicado en el tejido vegetal y se podrán aislar en mayor número en otros medios. Este bioensayo es un método de diagnóstico sumamente específico y sensible (10^2 ufc/ml) (Verdier *et al.*, 2008).

3.1.6.2 Enriquecimiento de hojas desprendidas

X. citri subsp. *citri* también se puede enriquecer de forma selectiva en hojas con heridas desprendidas de *C. paradisi* var. Duncan (pomelo) o de otros hospedantes muy vulnerables, como *C. aurantifolia* (lima mexicana) o *P. trifoliata* (naranja trifoliado). Las hojas terminales jóvenes de plantas cultivadas en invernaderos se lavan durante 10 minutos en agua del grifo corriente, se desinfecta su superficie con NACIO al 1 % durante 1 min y se enjuagan de forma concienzuda y aséptica con agua destilada estéril. Se infligen heridas asépticas en la superficie inferior de las hojas mediante punción con una

aguja o haciendo pequeños cortes con un bisturí, y se colocan las hojas enteras, con su superficie inferior hacia arriba, en agua estéril con agar al 1 % en los pocillos de las placas de ELISA. Se añaden a las heridas gotículas de 10–20 µl de macerado de lesiones de cáncer de los cítricos. Se utilizan controles positivos y negativos iguales a los descritos para los bioensayos de discos de hojas. Después de incubar durante 4–12 días a 25 °C en una estufa iluminada, se evalúa el desarrollo de las pústulas. *X. citri* subsp. *citri* se puede aislar de las pústulas o del tejido foliar con heridas que no presenta síntomas, como se describió anteriormente (EPPO, 1998).

3.2 Detección en plantas asintomáticas

La detección de *X. citri* subsp. *citri* en plantas asintomáticas puede realizarse mediante aislamiento y enriquecimiento en medios semiselectivos (véase a continuación), técnicas serológicas (inmunofluorescencia (sección 3.1.3)) y pruebas moleculares (sección 3.1.4).

El aislamiento de *X. citri* subsp. *citri* a partir de plantas asintomáticas en medios semiselectivos puede realizarse lavando las muestras de hojas o frutos en tampón de peptona, concentrando el sobrenadante y, por último, sembrando en el medio (Verdier *et al.*, 2008). Diez hojas o un fruto contienen una muestra.

Las muestras se agitan durante 20 min a temperatura ambiente en 200 ml de tampón de peptona (NaCl, 8,5 g; peptona, 1 g; Tween 20, 250 µl; agua destilada, 1 l; pH 7,2). Para muestras compuestas, se pueden utilizar 200 ml de tampón de peptona para 100 hojas o frutos (una por muestra) se agitan durante 20 min a temperatura ambiente en bolsas estériles que contienen 200 ml de tampón de peptona.

El sobrenadante se centrifuga a continuación a 6 000 g durante 20 min y a continuación se decanta y el sedimento se resuspende en 10 ml de solución salina al 0,85 %. Se siembran en estrías, por triplicado, cantidades iguales (100 µl) de diluciones a 1:100 y 1:1000 de cada una de las suspensiones en medios semiselectivos XOS (sacarosa, 20 g; peptona, 1 g; glutamato monosódico, 5 g; Ca(NO₃)₂, 0,3 g; K₂HPO₄, 2 g; EDTA-Fe, 1 mg; cicloheximida, 10 mg; cefalexina, 20 mg; kasugamicina, 20 mg; violeta de metilo 2B, 0,3 mg; agar Fecto™, 1 g; agua destilada, 1 l; pH 7,0) (Monier, 1992). Tras incubar 5–6 días a 28 °C, se evalúa el crecimiento de colonias, así como su tipo y morfología (sección 3.1.2).

4. Identificación

La identificación de plantas con colonias de *X. citri* subsp. *citri* debería verificarse mediante varias técnicas, ya que es posible aislar de los cítricos otras especies de *Xanthomonas*, como *X. fuscans* subsp. *aurantifolia* y *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*. Además de la observación de las características morfológicas en medios nutritivos, hay otras técnicas: las pruebas serológicas, las pruebas moleculares, los bioensayos de discos de hojas u hojas desprendidas y las pruebas de patogenicidad.

Para identificar un cultivo puro tiene que obtenerse como mínimo un resultado positivo en cada una de las tres técnicas siguientes: 1) PCR con dos pares de cebadores (sección 4.1); 2) una técnica serológica (inmunofluorescencia, ELISA en fase doble de anticuerpos (DAS-ELISA) o ELISA indirecto, secciones 4.2, y 4.2.1 y 4.2.2) que utiliza anticuerpos monoclonales específicos, y 3) pruebas de patogenicidad mediante la inoculación de cítricos hospedantes para cumplir los requisitos de los postulados de Koch (secciones 4.3 y 3.1.6). Se podrán efectuar pruebas complementarias (secciones 4.4 y 4.5) para caracterizar más detalladamente la cepa presente. Todas las pruebas deberán incluir controles negativos y positivos. En las secciones sucesivas se describen las técnicas recomendadas.

Se pueden obtener cepas de referencia de *X. citri* subsp. *citri* de las siguientes colecciones, entre otras (se indican las cepas aisladas de *X. citri* subsp. *citri* recomendadas para su utilización como controles positivos):

- NCPPB 3234, de la Collection of Plant Pathogenic Bacteria, del Central Science Laboratory, York (Reino Unido).

- CFBP 2911, de la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, de la Station de Phytobactériologie de l'INRA, Angers (Francia) (se trata de una cepa A* de *X. citri* subsp. *citri*).
- ICMP 24, de la International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research (Manaaki Whenua) New Zealand Ltd, Auckland (Nueva Zelanda).
- ATTC 49118, de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia (Estados Unidos).
- IBSBF 1594, de la Coleção de Culturas de Fitobactérias, del Instituto Biológico, del Laboratório de Bacteriologia Vegetal del Centro Experimental Central do Instituto Biológico (CEIB), Campinas (Brasil).

La autenticidad de las cepas solo se puede garantizar si se obtienen directamente de las colecciones de cultivos.

4.1 Métodos de PCR

Se recomienda que, además del protocolo de PCR descrito en la sección 3.1.4.3, la identificación de cultivos puros de cepas sospechosas se confirme utilizando dos pares diferentes de cebadores. Uno de los pares debería ser el formado por los cebadores *J-pth1/J-pth2* o *J-Rxg/J-Rxc2* (Cubero y Graham, 2002) y el otro par el compuesto por *Xac01/Xac02* (Coletto-Filho *et al.*, 2005) o *XACF/XACR* (Park *et al.*, 2006) (cuadro 1). Esto se debe a que se ha constatado que los pares de cebadores utilizados en la mayoría de los estudios publicados carecen de especificidad (Belcourt *et al.*, 2013). Una confirmación adicional de la identificación puede obtenerse secuenciando los amplicones resultantes de la PCR y comparando sus secuencias con las de las cepas de *X. citri* subsp. *citri* depositadas en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI).

El protocolo de PCR de Cubero y Graham (2002) desarrolló cebadores de PCR para las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) de los ARNr 16S y 23S específicos de *X. citri* subsp. *citri*. La variación de las secuencias del ITS permitió diseñar cebadores específicos para *X. citri* subsp. *citri*, los cuales detectan las cepas atípicas A* y A₁ (Cubero y Graham, 2002). Estos cebadores son:

J-Rxg: 5'-GCGTTGAGGCTGGGACATG-3'
J-RXc2: 5'-CAAGTTGCCTCGAGCTATC-3'.

La PCR se efectúa en mezclas de reacción de 25 µl que contienen tampón de Taq 1×, 1,5 mM de MgCl₂, 0,04 µM de cebador *J-Rxg*, 0,04 µM de cebador *J-RXc2*, 0,2 mM de cada dNTP y 1 U de polimerasa de ADN Taq. Las condiciones de la amplificación mediante PCR son las mismas que las empleadas con los cebadores *J-pth1* y *J-pth2* descritas en la sección 3.1.4.3.

El protocolo de PCR de Coletta-Filho *et al.* (2006) desarrolló cebadores basados en el complejo génico *rpf*. Estos cebadores son:

Xac01: 5'-GACCATCGCCACCACCACGAC-3'
Xac02: 5'-AAATCGCTCAATGCCATCCACTTCA-3'.

La PCR se efectúa en mezclas de reacción de 25 µl que contienen tampón de Taq 1×, 2,0 mM de MgCl₂, 0,36 µM de cada cebador, 0,25 mM de cada dNTP y 1 U de polimerasa de ADN Taq. Las condiciones de la amplificación mediante PCR consisten en una fase inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 min, seguida de 36 ciclos de 94 °C durante 45 s, 60 °C durante 45 s y 72 °C durante 45 s, y una fase de extensión final de 72 °C durante 5 min. El tamaño de los amplicones es de 582 pb.

El protocolo de PCR de Park *et al.* (2006) desarrolló cebadores basados en las secuencias génicas *hrpW*. Estos cebadores son:

XACF: 5'-CGTCGCAATACGATTGGAAC-3'
XACR: 5'-CGGAGGCATTGTCTGAAGGAA-3'.

La PCR se efectúa en mezclas de reacción de 25 µl que contienen tampón de Taq 1×, 1,5 mM de MgCl₂, 0,10 µM de cada cebador, 0,25 mM de cada dNTP, 0,01 % de gelatina y 2 U de polimerasa de ADN Taq. Las condiciones de la amplificación mediante PCR consisten en una fase inicial de

desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de 94 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y una fase de extensión final de 72 °C durante 7 min. El tamaño de los amplicones es de 561 pb.

Cuadro 1. Resumen de los métodos de PCR descritos en el presente protocolo de diagnóstico.

Los datos de especificidad se toman de Delcourt *et al.* (2013). * La detección no específica se refiere al porcentaje de xantomonas y saprofitos patógenos cuyas pruebas dieron positivo. ** No dieron positivo con cepas saprófitas.

Par de cebadores	Referencia	Tamaño de los amplicones (pb)	Detección de cepas de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Detección no específica (%)*	Límites de detección en material vegetal
2/3	Hartung <i>et al.</i> (1993)	224	No detecta cepas A ^w ni todas las cepas A [*]	17	10 ² ufc/ml
<i>J-pth1/J-pth2</i>	Cubero y Graham (2002)	198	Todas las cepas	5	10 ³ ufc/ml
<i>J-Rxg/J-Rxc2</i>	Cubero y Graham (2002)	179	Todas las cepas	36	10 ⁴ ufc/ml
<i>Xac01/Xac02</i>	Coletto-Filho <i>et al.</i> (2005)	582	Todas las cepas	16	10 ⁴ ufc/ml
<i>XACF/XACR</i>	Park <i>et al.</i> (2006)	561	Todas las cepas	6**	No hay datos

4.2 Detección serológica

Se recomienda utilizar diferentes anticuerpos para identificar cultivos puros, además del protocolo de inmunofluorescencia descrito en la sección 3.1. Asimismo, se puede recurrir al DAS-ELISA o ELISA indirecto como pruebas serológicas alternativas para identificar cultivos puros.

4.2.1 DAS-ELISA

Para el DAS-ELISA, las placas de microtitulación se cubren con 100 µl/pocillo de tampón de recubrimiento de carbonato (Na₂CO₃, 1,59 g; NaHCO₃, 2,93 g; NaN₃, 0,2 g; agua destilada, 1 litro; pH 9,6) que contiene inmunoglobulinas (IgG) anti-*X. citri* subsp. *citri* debidamente diluidas y se incuban a 4 °C durante la noche. Después de lavar las placas tres veces con PBS-Tween (NaCl, 8 g; KH₂PO₄, 0,2 g; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 g; KCl, 0,2 g; NaN₃, 0,2 g; Tween 20, 0,25 ml; agua destilada, 1 litro; pH 7,4), se añaden (200 µl/pocillo) la muestra de la prueba, el control negativo (material vegetal sano) o el control positivo (cepa de referencia de *X. citri* subsp. *citri*). Las placas se incuban a 37 °C durante 2 h. Después del lavado, se añade (200 µl/pocillo) una dilución apropiada de las IgG anti-*X. citri* subsp. *citri* conjugadas con fosfatasa alcalina en PBS-Tween y las placas se incuban a 37 °C durante 2 h. Después del lavado, se añade (200 µl/pocillo) tampón sustrato de p-nitrofenil-fosfato (1 mg/ml) y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30–60 min. Se miden las absorbancias con un espectrofotómetro dotado de un filtro de 405 nm. El criterio para determinar que una muestra es positiva es que su densidad óptica (DO) sea el doble que la del control de material vegetal sano. El límite de detección del DAS-ELISA es de 10⁴–10⁵ ufc/ml (Civerolo y Fan, 1982). Este método no se recomienda para la detección directa en tejido vegetal.

Existen anticuerpos monoclonales para ELISA, pero se aconseja utilizarlos únicamente para identificar cultivos puros debido a su escasa sensibilidad de detección en tejido vegetal. Se comercializan equipos para la detección de *X. citri* subsp. *citri* mediante ELISA (p. ej., de Agdia, Inc.). Para los datos de especificidad, consúltase la información técnica facilitada por el fabricante. Se han constatado reacciones cruzadas de varios anticuerpos monoclonales con *X. axonopodis* pv. *phaseoli*,

X. campestris pv. *zinnea*, *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* y *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*; no obstante, la presencia de estos patovares en cítricos es poco probable.

4.2.2 ELISA indirecto

El ELISA indirecto con anticuerpos monoclonales descrito por Álvarez *et al.* (1991) se puede utilizar para identificar cultivos. Se comercializan equipos de ELISA que incluyen todos los componentes necesarios para la identificación de *X. citri* subsp. *citri* (p. ej., de Agdia, Inc.). En teoría, se pueden identificar todas las cepas de *X. citri* subsp. *citri*, pero se ha constatado que varias cepas con fenotipos diferenciados aisladas en Asia sudoccidental no reaccionan con los anticuerpos monoclonales disponibles (Vernière *et al.*, 1998).

Las suspensiones de cultivos puros se centrifugan durante 2 min a 10 000 g, aproximadamente, y el sobrenadante se desecha. Se añade 1 ml de PBS 1× y las células se resuspenden mezclando en vortex. Esta operación se repite dos veces más. Después del tercer lavado, las células se resuspenden en tampón de recubrimiento. La concentración bacteriana se ajusta espectrofotométricamente a una DO₆₀₀ de 0,01 (aproximadamente $2,5 \times 10^7$ ufc/ml). Se cargan porciones de las muestras en placas de microtitulación (dos pocillos por muestra, 100 µl/pocillo). Debería incluirse un control positivo (un cultivo o muestra de referencia facilitados por el fabricante) y un control de tampón negativo con otra bacteria. Las placas se incuban a 37 °C durante la noche hasta su secado. Se añade 200 µl/pocillo de solución de bloqueo (5 % de leche desnatada en polvo en PBS). Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30 min y a continuación se lavan dos veces con PBS-Tween 1×. Se añade (100 µl/pocillo) el anticuerpo principal a la dilución apropiada en 2,5 % de leche en polvo en PBS-Tween. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 h y a continuación se lavan cinco veces con PBS-Tween 1×. Se añade (100 µl/pocillo) el conjugado enzimático a la dilución apropiada en 2,5 % de leche en polvo en PBS-Tween. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 h y a continuación se lavan cinco veces con PBS-Tween 1×. Se añade (100 µl/pocillo) solución de sustrato recién preparada que contiene 1 mg/ml 4-nitrofenil-fosfato en tampón de dietanolamina (pH 9,8). Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 30–60 min. Se mide la DO con un espectrofotómetro dotado de un filtro de 405 nm. Las muestras positivas se determinan de la misma forma que para el DAS-ELISA.

4.3 Pruebas de patogenicidad

Para confirmar el diagnóstico, debería determinarse la patogenicidad de *X. citri* subsp. *citri* para un conjunto de hospedantes indicadores como *C. paradisi* var. Duncan (pomelo), *Citrus sinensis* (naranja dulce var. Valencia) o *C. aurantium* (lima mexicana).

La patogenicidad de colonias bacterianas puede comprobarse en ensayos en hojas de cultivares vulnerables de hospedantes del género *Citrus* mediante infiltración con una jeringuilla con o sin aguja. Es preferible utilizar hojas maduras, con una expansión del 50 al 70 %, debido a su mayor nivel de vulnerabilidad. Las lesiones se desarrollan de 7 a 14 días después de la inoculación de hojas intactas o deprendidas (Francis *et al.*, 2010; Koizumi, 1971) tras su incubación a 25 °C con humedad elevada. Con estos ensayos, se puede distinguir perfectamente la reacción eruptiva de tipo calloso de *X. citri* subsp. *citri*. Se resuspenden en agua destilada estéril bacterias cultivadas en medios líquidos o colonias de una placa de agar recién sembrada y se ajusta la concentración a 10^6 – 10^8 ufc/ml para su inoculación en los hospedantes. Deberían incluirse siempre controles negativos y positivos. Las plantas inoculadas con la cepa de control positivo deberían mantenerse apartadas de las plantas analizadas en la prueba.

4.4 Descripción y características bioquímicas

X. citri subsp. *citri* es una bacteria gramnegativa, recta y baciliforme que mide 1,5–2,0 µm × 0,5–0,75 µm. Posee movilidad gracias a un único flagelo polar. Comparte numerosas propiedades fisiológicas y bioquímicas con otras especies del género *Xanthomonas*. Es quimioorganotrofa y aerobia estricta, con metabolismo oxidativo de la glucosa. Contiene el pigmento amarillo xantomonadina. En el cuadro 2 figuran algunas de las características bioquímicas distintivas de *X. citri* subsp. *citri*.

Cuadro 2. Principales características bioquímicas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Prueba	Resultado
Catalasa	+
Oxidasa	– o débil
Reducción de nitratos	–
Hidrólisis de:	
almidón	+
caseína	+
Tween 80	+
esculina	+
Licuación de la gelatina	+
Licuación del gel de pectato	+
Utilización de la asparagina	–
Necesidades para el crecimiento:	
metionina	+
cisteína	+
0,02 % (m/v) de cloruro de trifetil tetrazolio	–

4.5 Identificación molecular

Se han caracterizado a nivel molecular las propiedades de diversas especies de xantomonas que infectan a los cítricos, incluidas *X. citri* subsp. *citri* y el género *Xanthomonas* en su conjunto, a fin de desarrollar métodos rápidos y exactos para su identificación. Se han utilizado, entre otros procedimientos, la hibridación Southern (Hartung *et al.*, 1995), la identificación genética (Hartung *et al.*, 1987; Lazo *et al.*, 1997), el análisis de secuencias multilocus (Young *et al.*, 2008) y la rep-PCR (Cubero y Graham, 2002, 2004).

4.5.1 Análisis de secuencias multilocus

Se ha utilizado un método basado en el análisis de secuencias multilocus (MLSA) para la identificación específica de *X. citri* subsp. *citri*. (Almeida *et al.*, 2010; Bui Thi Ngoc *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2008). Los genes de mantenimiento se amplifican mediante cebadores y condiciones de PCR como las descritas por Almeida *et al.* (2010), Bui Thi Ngoc *et al.* (2010) y Young *et al.*, (2008). El MLSA consiste en la secuenciación de varios locus (por lo general, entre cuatro y ocho genes de mantenimiento) y la comparación de sus secuencias con secuencias de referencia de especies de *Xanthomonas* depositadas en bases de datos de nucleótidos; por ejemplo, la base de datos de fitopatógenos del Associated Microbes Database, PAMDB (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) (Almeida *et al.*, 2010) y el banco de datos de genotipos microbianos MLVAbank (http://bioinfo-proc.ird.fr/MLVA_bank/Genotyping/).

4.5.2 Identificación por rep-PCR

La identificación mediante rep-PCR con cebadores diseñados a partir de elementos palindrómicos extragenómicos repetitivos (REP) – secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias (ERIC) y el elemento BOX (Louws *et al.*, 1994) – se puede utilizar para identificar y caracterizar cepas en condiciones de PCR determinadas (Cubero y Graham, 2002).

El ADN se puede extraer de suspensiones bacterianas (absorbancia a 600 nm de 0,2 a 0,5) en un único paso con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. A continuación, se precipita en etanol y se resuspende en agua ultrapura. El ADN se almacena a -20 °C hasta su uso. También se puede utilizar el procedimiento de extracción del ADN descrito en la sección 3.1.4.2.

La PCR BOX se efectúa en mezclas de reacción de 25 µl que contienen tampón de Taq 1×, 6 mM de MgCl₂, 2,4 µM de cebador BOX1R (5'-CTACG-GCAAGGCGACGCTGCAG-3') (Louws *et al.*, 1994), 0,2 mM de cada dNTP, 2 U de polimerasa de ADN Taq y 5 µl de ADN extraído de cepas de xantomonas. Las condiciones de la reacción consisten en una fase inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 48 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, y una fase de extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se analizan en geles de agarosa al 3 % en tampón de tris-acetato-EDTA (TAE) 1× (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA; pH 8,0) teñidos con bromuro de etidio que se corren durante 2 h a 110 V.

La PCR ERIC se efectúa en mezclas de reacción de 25 µl que contienen tampón de Taq 1×, 3 mM de MgCl₂, 1,2 µM de cebador ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCT-GGGGATTTCAC-3') y ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACT-GGGGTGAGCG-3') (Louws *et al.*, 1994), 0,2 mM de cada dNTP, 2 U de polimerasa de ADN Taq y 5 µl de ADN extraído de cepas de xantomonas. Las condiciones de la reacción son las mismas que se emplean para la PCR BOX. Para la visualización de los productos de la PCR se sigue el mismo procedimiento que para la PCR BOX.

Las huellas genéticas (patrones de bandas) se pueden comparar y analizar a simple vista en busca de similitudes, pero también se pueden transformar los patrones en gráficos y compararse las cepas mediante un programa informático como BioNumerics (Applied Maths). La identificación debería basarse en la similitud con los patrones de las cepas de control (referencia/rección).

En las figuras 5 y 6 se representan esquemas para la detección y la identificación de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en material vegetal sintomático y asintomático, respectivamente.

5. Registros

Los registros y las pruebas deberían conservarse según lo descrito en la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En los casos en que los resultados de los diagnósticos puedan repercutir sobre otras partes contratantes, se recomienda conservar, al menos durante un año, los cultivos de la muestra original de la plaga (etiquetados para facilitar la rastreabilidad), los especímenes conservados o preparados para observación microscópica, o los materiales de las pruebas (p. ej., fotografías de geles, copias impresas de los resultados de los ELISA o implices de la PCR), especialmente en casos de incumplimiento (NIMF 13 (*Directrices para la notificación de incumplimiento y acción de emergencia*)) o cuando las plagas se detecten por primera vez en un país o zona.

6. Puntos de contacto para información adicional

Departamento de Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Av. Millán 450, CP 112900, Montevideo (Uruguay) (Enrique F. Verdier; correo electrónico: emverdiar@adg.gov.uy; tel.: +598 23043992).

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia, España) (María M. López; correo electrónico: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax: +34 963424001).

Instituto Nacional de Investigación Agraria y Tecnología Alimentaria, INIA, Ctra. de La Coruña km 6, Madrid (España) (Jaime Cubero; correo electrónico: cubero@inia.es; tel.: +34 913473900; fax: +34 913572293).

Podrán presentar solicitudes de revisión de los protocolos de diagnóstico 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 CIPF (ippc@fao.org), que las remitirá al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El primer proyecto del presente protocolo fue redactado por el Sr. E. F. Verdier, del Departamento de Laboratorios Biológicos de la Dirección General de Servicios Agrícolas del Uruguay (véase la sección 6 para más información), y revisado por la Sra. R. Lanfranchi, del Laboratorio de Fitopatología del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Av. Ing. Huergo 1001 CP 1107, Buenos Aires (Argentina) (Rita Lanfranchi; correo electrónico: ritalanfranchi@hotmail.com; tel.: +5411 43621177 int. 118); el Sr. Ed Civerolo, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Estados Unidos (correo electrónico: emciv@comcast.net), y la Sra. M. M. López, del IVIA (España) (véase la sección 6 para más información). Asimismo, el Sr. J. Cubero, del INIA (España) (véase la sección 6 para más información), colaboró de forma destacada en la elaboración del presente protocolo.

8. Referencias

La presente norma refiere a las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF). Las NIMF se encuentran disponibles en el PFI en <https://www.ipn.int/collective-standards-setting/ispm>.

- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schacht, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bell, C. T., Lerman, J., Guttman, D. S., Setubal, J. C. & Vinatzer, B. A. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208–215.
- Álvarez, A. M., Benedict, A. A., Mizumoto, C. Y., Ford, L. A. & Civerolo, E. L. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X.c.* pv. *citri* var. *citri* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 81: 857–865.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jouen, E., Ah-Yuen, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin, L. & Pruvost, O. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *philvae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3): 515–525.
- Bull, C. T., De Boer, S. H., Penny, T. P., Ferrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E. & Tsukagawa, Y. 2010. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *Journal of Plant Pathology*, 92(3): 551–592.
- CABI. 2006. *Crop Protection Compendium*. Wallingford, UK, CABI.
- Civerolo, E. L. & Fan, F. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 66: 231–236.
- Coletta-Filho, R. A., Takita, M. A., Souza, A. A., Neto, J. R., Destefano, S. A. L., Hartung, J. S. & Machado, M. A. 2006. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2): 279–285.
- Cubero, J. & Graham, J. H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1257–1264.
- Cubero, J. & Graham, J. H. 2004. The leucine-responsive regulatory protein (*lrp*) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 429–437.
- Cubero, J. & Graham, J. H. 2005. Quantitative real time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95: 1333–1340.
- Cubero, J., Graham, J. H. & Gottwald, T. R. 2001. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2849–2852.

- Delcourt, S., Vernière, C., Boyer, C., Pruvost, O., Hostachy, B. & Robène-Soustrade, I.** 2013. Revisiting the specificity of PCR primers for diagnostics of *Xanthomonas citri* pv. *citri* by experimental and in silico analyses. *Plant Disease*, 97(3): 373–378.
- Dye, D. W.** 1978. Genus IX. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., & Robbs, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21(1): 153–177.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1979. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Data Sheets on Quarantine Pests. EPPO A1 list No. 1. Paris, EPPO.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1998. *Phytosanitary procedure Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Inspection, test and survey methods*. EPPO Standard PM 3/27(1). Paris, EPPO.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2000. PQR database (versión 4.5). Paris, EPPO.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. *Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria*. EPPO Standard PM 7/1(1). Paris, EPPO.
- Escalon, A., Javegny, S., Vernière, C., Noël, L. D., Vital, K., Poussier, S., Hajri, A., Boureau, T., Pruvost, O., Arlat, M. & Gagnevin, L.** 2013. Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* genotypes. *Molecular Plant Pathology*, 14(5): 483–496.
- Francis, M. I., Pena, A. & Graham, J. H.** 2010. Detached leaf inoculation of germplasm for rapid screening of resistance to citrus canker and citrus bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4): 571–578.
- Gabriel, D. W., Kingsley, M. T., Hunter, E. & Gottwald, T.** 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseola* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(1): 14–22.
- Golmohammadi, M., Cubero, J., Peñaalver, J., Quesada, J. M., López, M. M. & Llop P.** 2007. Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker in commercial fruits by isolation and PCR based method. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2309–2315.
- Goto, M.** 1992. Citrus canker. In J. Kumer, H. S. Chaube, U. S. Singh and A. N. Mukhopadhyay, eds. *Plant diseases of international importance*, Vol. III, *Diseases of fruit crops*, pp. 170–208. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall.
- Graham, J., Gottwald, T. R., Civerolo, E. L. & McGuire, R. G.** 1989. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*, 43(4): 423–427.
- Hall, D. G., Gottwald, T. R. & Bock, C. H.** 2010. Exacerbation of citrus canker by citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* in Florida. *Florida Entomologist*, 93(4): 558–566.
- Hall, D. G. & Civerolo, E. L.** 1987. Genomic fingerprinting of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America and Florida. *Phytopathology*, 77: 282–285.
- Hartung, S., Daniel, J. F., Pruvost, O. P. & Civerolo, E. L.** 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 1143–1148.
- Hasse, CH.** 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. A preliminary report. *Journal of Agricultural Research* 4, 97–100.
- Koizumi, M.** 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached citrus leaves. *Bulletin of the Horticultural Research Station (Japan), Series B*, 11: 167–182.

- Lazo, G. R., Roffey, R. & Gabriel, D. W.** 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 214–221.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M. M.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology Methods*, 37: 23–31.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Taylor Stephens, C. & Bruijn, F. J.** 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2286–2295.
- Mafra, V., Kubo, K. S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R. M., Boavista, L. P., Rodrigues, C. M. & Machado, M. A.** 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PloS One*, 7(2), e31263.
- Mavrodieva, V., Levy, L. & Gabriel, D. W.** 2004. Improved sampling method for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, 94: 61–68.
- Monier, L.** 1992. *Contribution à la mise au point d'un milieu de culture semi-sélectif pour la détection de Xanthomonas campestris pv. citri, agent du chancre bactérien des agrumes*. Angers, France, École Nationale d'Ingénieurs des Travaux de l'Horticulture et du Paysage d'Angers, Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (IRFA). 62 pp [in French].
- Namekata, T. de Oliveira, A. R.** Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime. In Proceedings of International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Wageningen, The Netherlands, 1979, pp.151-152
- Park, D., Hyun, J., Park, Y., Kim, J., Kang, I., Hahn, J. & Go, S.** 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiological Research*, 161(2): 145–149.
- Pruvost, O., Roumagnac, P., Gauthier, C., Chiron, F. & Gagnevin, L.** 2005. New media for the semiselective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4): 803–815.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. & Vidaver, A. K.** 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel *et al.*, 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov. and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel *et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. campestris* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker *et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and *X. fuscans* of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 494–518.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. & Vidaver, A. K.** 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 690–695.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. & Vidaver, A. K.** (2007). *Xanthomonas alfalfae* sp. nov., *Xanthomonas citri* sp. nov. and *Xanthomonas fuscans* sp. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, Validation List no. 115. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 893–897.
- Sun, X., Stall, R. E., Jones, J. B., Cubero, J., Gottwald, T. R., Graham, J. H., Dixon, W. D., Schubert, T. S., Chaloux, P. H., Stromberg, V. K., Lacy, G. H. & Sutton, B. D.** 2004.

- Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Disease*, 88(11): 1179–1188.
- Taylor, R. K., Tyson, J. L., Fullerton, R. A. & Hale, C. N.** 2002. Molecular detection of exotic phytopathogenic bacteria: A case study involving canker-like symptoms on citrus. *New Zealand Plant Protection*, 55: 53–57.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J.** 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472–489.
- Verdier, E., Zefferino, E. & Méndez, S.** 2008. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on the surface of citrus fruit after postharvest treatment *Fitopatologia*, 43: 24–31.
- Vernière, C., Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Civerolo, E. L., Álvarez, A. M., Moutri, P. & Luisetti, J.** 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 477–487.
- Weisberg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, B. A. & Lane, D. J.** 1991. 16S ribosomal RNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., & Sead, D. B.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 2853–2857.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. & Fargier, E.** 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5): 367–377.

9. Figuras



Figura 1. Síntomas típicos del cáncer de los cítricos en hojas, tallos y fruto de pomelo (*Citrus paradisi*).



Figura 2. Síntomas del cáncer de los cítricos en ramillas: lesiones incipientes en pomelo (*Citrus paradisi*).



Figura 3. Síntomas del cáncer de los cítricos en frutos de mandarina dulce (*Citrus sinensis*) (a la izquierda) y de pomelo (*Citrus paradisi*) (en el centro y a la derecha).



Figura 4. Síntomas del cáncer de los cítricos en hojas de limonero (*Citrus limon*) agravadas por lesiones del minador de las hojas de los cítricos.

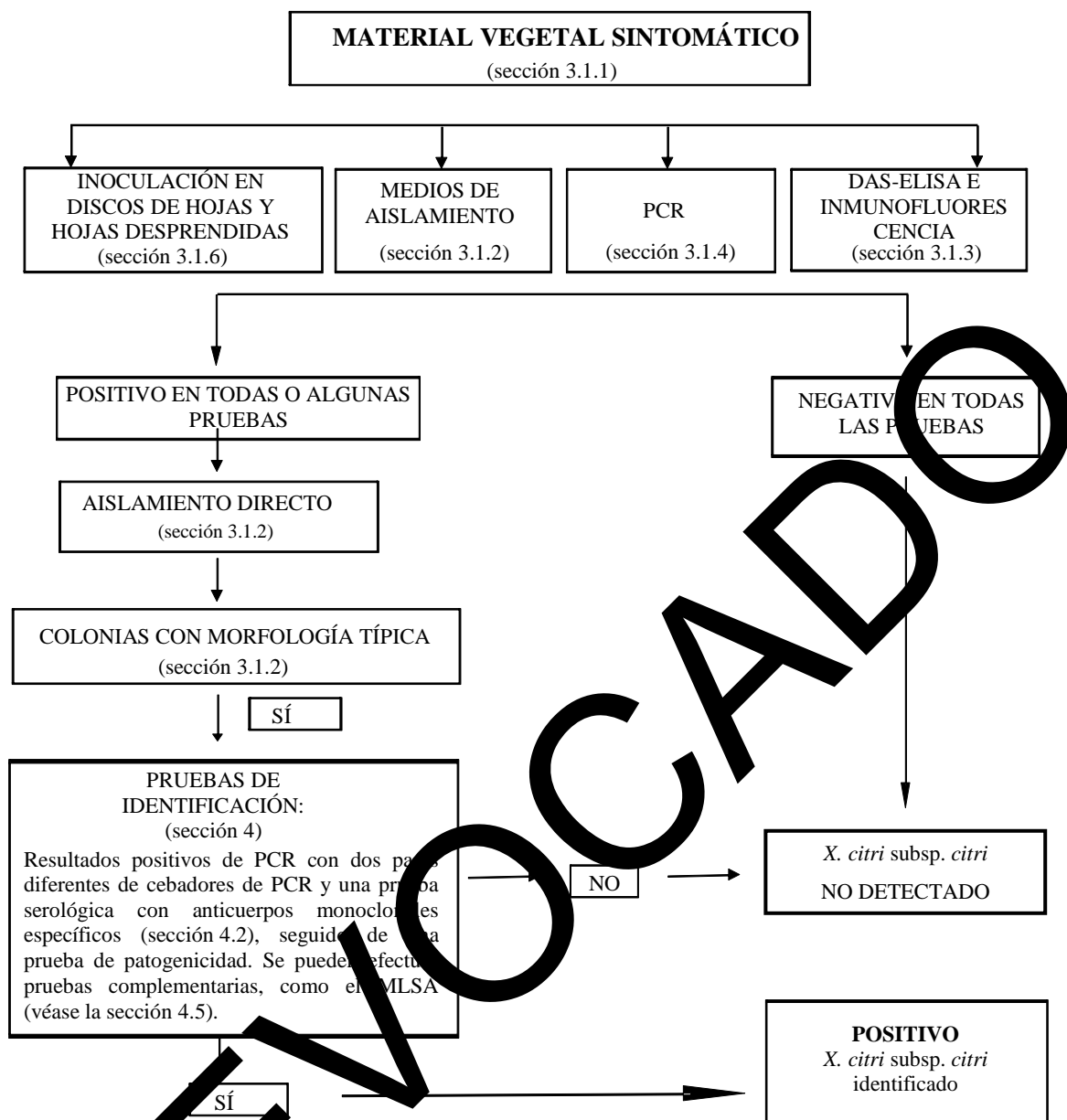


Figura 5. Esquema para la detección e identificación de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en material vegetal sintomático.

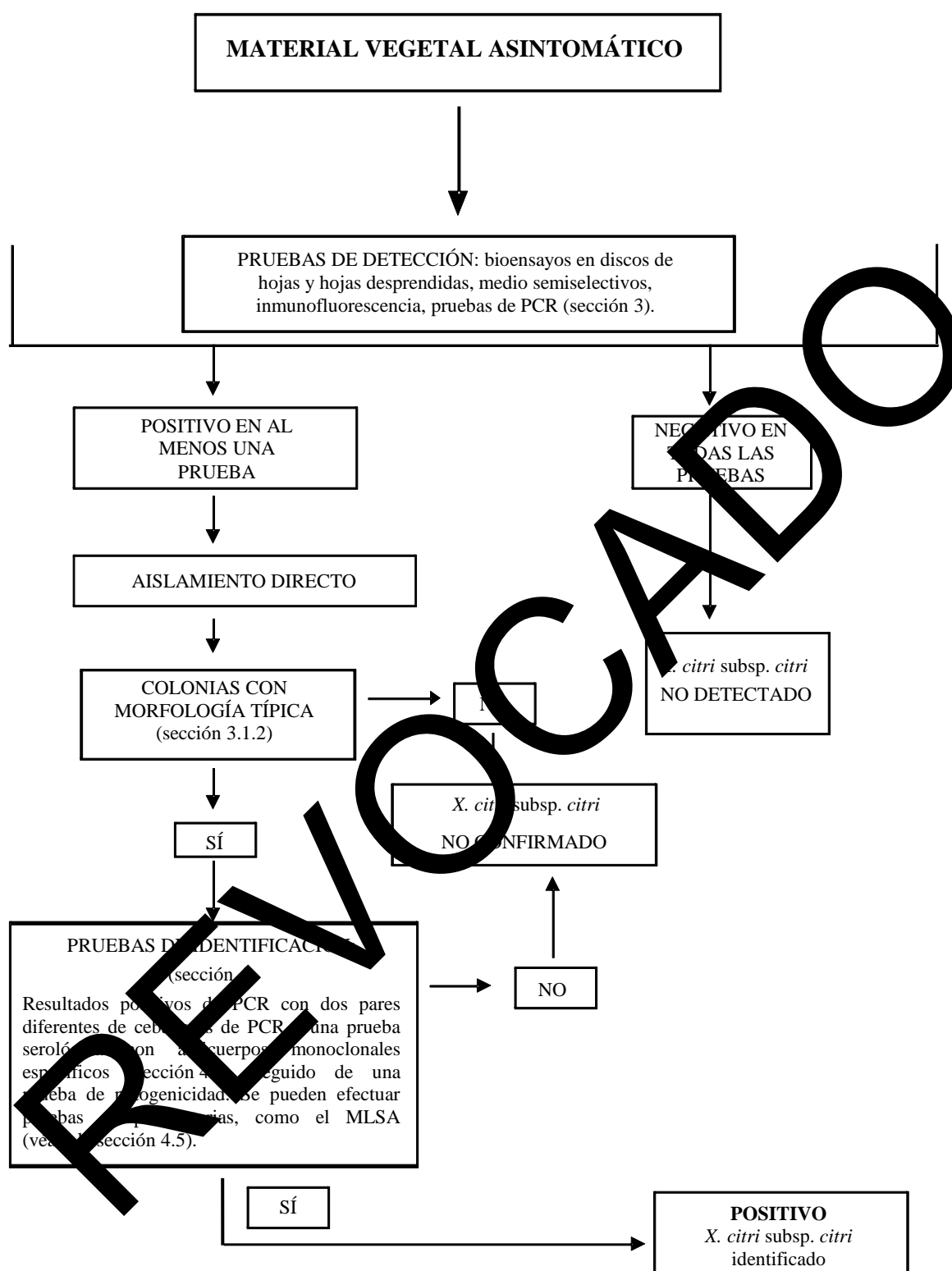


Figura 6. Esquema para la detección e identificación de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en material vegetal asintomático.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

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

2004-11 El CN añadió la cuestión *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (2004-011) al programa de trabajo

La CMF-1 (2006) añadió la cuestión *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (2004-011) al tema: Bacterias (2006-00)

2012-11 El GTPD revisó el proyecto de protocolo

2013-04 El CN aprobó, mediante decisión por vía electrónica, el proyecto de protocolo para consulta a los miembros (2013_eSC_May_12)

2013-07 Consulta a los miembros

2014-02 Revisado y remitido por el GTPD al CN para que apruebe su adopción (2014_ePDP_Feb_02)

2014-04 Remitido al CN para que apruebe su adopción mediante decisión por vía electrónica (2014_eSC_May_16)

2014-06 El CN aprobó el proyecto, mediante decisión por vía electrónica, para el período de notificación de 45 días (2014_eSC_Nov_03)

2014-07 El CN aprobó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones formales)

2014-10 La Secretaría efectuó pequeñas correcciones en la redacción

2014-11 La Secretaría efectuó pequeñas correcciones en la redacción

NIMF 27. Anexo 6 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (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.