



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Proteger de las plagas los recursos vegetales del mundo

PROTOSOLOS DE DIAGNÓSTICO

NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS 27

NIMF 27
ANEXO 12

ESP

PD 12: Fitoplasmas

Producido por la Secretaría de la Convención Internacional
de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

Este protocolo de diagnóstico fue adoptado por el Comité de Normas, en nombre de la Comisión de Medidas Fitosanitarias, en enero de 2016.

Este anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27.

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas

PD 12: Fitoplasmas

Adoptado en 2016; publicado en 2018

ÍNDICE

1.	Información sobre la plaga	2
2.	Información taxonómica	4
3.	Detección e identificación	4
3.1	PCR convencional anidada.....	7
3.2	PCR en tiempo real	8
3.3	Controles para las pruebas moleculares	9
3.4	Interpretación de los resultados de la PCR.....	10
3.4.1	PCR convencional anidada.....	10
3.4.2	PCR en tiempo real	11
3.5	Análisis de las secuencias	11
4.	Registros	11
5.	Puntos de contacto para información adicional	12
6.	Agradecimientos	12
7.	Referencias	13

1. Información sobre la plaga

Los fitoplasmas fueron descubiertos por Doi *et al.* (1967), durante su búsqueda del agente causal del amarillamiento del áster. A estos organismos unicelulares se los llamó inicialmente organismos similares a micoplasmas debido a su similitud morfológica con los micoplasmas animales y a su sensibilidad a los antibióticos de la familia de las tetraciclinas (Ishii *et al.*, 1967). Los fitoplasmas son procariotas fitopatógenos estrictos sin paredes celulares y polimorfos, con un diámetro medio de 200–800 nm. Habitan en las células cribosas del floema de sus plantas hospedantes. El tamaño de sus genomas es del orden de 550 kb a 1 500 kb -relativamente pequeño en comparación con otros procariotas- y carecen de varias funciones biosintéticas (Marcone *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2013).

Los fitoplasmas están relacionados con una gran variedad de síntomas en un rango diverso de plantas hospedantes (Lee *et al.*, 2000). Los síntomas característicos asociados con la infección por fitoplasmas incluyen la virescencia (el desarrollo de flores verdes y la pérdida de los pigmentos normales de las flores); la filodia (la transformación de los órganos florales en estructuras foliares); la escoba de bruja (proliferación de brotes adventicios o axilares) y otras proliferaciones anormales de brotes y raíces; el amarillamiento, el enrojecimiento y otras alteraciones del color de las hojas; el tamaño reducido de hojas y frutos; la necrosis del floema, y el decaimiento general y retraso del crecimiento (Davis y Sinclair, 1998). Algunas especies vegetales son tolerantes o resistentes a las infecciones por fitoplasmas; estas plantas podrán tener infecciones asintomáticas o mostrar síntomas leves (Lee *et al.*, 2000).

Seemüller *et al.* (2002) estimaron que los fitoplasmas afectan a unas 1 000 especies vegetales hospedantes, la mayoría dicotiledóneas. Es menor el número de fitoplasmas detectados en monocotiledóneas y los hospedantes pertenecen principalmente a las familias Palmae y Poaceae (Seemüller *et al.*, 2002).

Los fitoplasmas están presentes en todo el mundo. La distribución geográfica y el impacto de las enfermedades producidas dependen del rango de hospedantes del fitoplasma, así como de la presencia y de los hábitos alimentarios del insecto vector. Algunos fitoplasmas cuentan con un rango amplio de hospedantes vegetales y sus vectores son polívoros, por lo que su distribución es amplia. Otros tienen un rango de hospedantes limitado y sus insectos vectores son oligófagos o monófagos, lo cual limita su distribución geográfica. En Foissac y Wilson (2010) se describe la distribución geográfica de los principales grupos taxonómicos de fitoplasmas.

Los fitoplasmas pueden transmitirse por medio de insectos vectores, cúscutas e injertos, y se pueden dispersar mediante la multiplicación vegetativa de órganos vegetales infectados. Los insectos vectores de los fitoplasmas, responsables de gran parte de su dispersión natural, se reducen a los cicadélidos (chicharritas o saltamontes), fulgoromorfos y psílicos floemófagos (Hemiptera: Auchenorrhyncha),

transmisores persistentes del patógeno. Weintraub y Beanland (2006) enumeran más de 90 especies vectoras conocidas, algunas de ellas capaces de servir de vector a más de un fitoplasma. Otros métodos de transmisión de los fitoplasmas son la transmisión a través de cúscutas y de injertos. Las plantas parásitas trepadoras (*Cuscuta* y *Cassytha* spp.) desarrollan conexiones vasculares con sus hospedantes mediante haustorios. Cuando se establece una conexión entre una planta sana y otra infectada por un fitoplasma, el fitoplasma se transferirá a la planta sana mediante los elementos conectados del floema. Para conservar fitoplasmas con fines de referencia puede usarse tanto la transmisión por injertos como la micropropagación de plantas por medio de cultivos de tejidos con fines de referencia (IPWG, s. f.).

Puede obtenerse más información acerca de los fitoplasmas, con inclusión de fotografías de los síntomas de la enfermedad, una lista de insectos vectores y una base de datos de clasificación de los fitoplasmas en los siguientes sitios web: COST Action FA0807: Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems (Acción COST FA0807: Manejo integrado de epidemias de fitoplasmas en diferentes sistemas de cultivo), disponible en <http://www.costphytoplasma.ipwgnet.org/> y Phytoplasma Resource Center (Centro de recursos sobre fitoplasmas), disponible en <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html>.

2. Información taxonómica

Nombre: fitoplasma

Sinónimos: organismo similar a un micoplasma (OSM), micoplasma

Posición taxonómica: Bacteria, Firmicutes, Mollicutes, Acholeplasmatales, Acholeplasmataceae, “*Candidatus* Phytoplasma”

El Equipo de trabajo en fitoplasmas/espiroplasmas – Grupo de taxonomía de fitoplasmas del Programa internacional de investigación en micoplasmología comparada (IRPCM) ha publicado directrices para la descripción de las especies de “*Candidatus* (*Ca.*) Phytoplasma” (IRPCM, 2004). La delimitación de las especies de “*Ca.* Phytoplasma” se basa en las secuencias del gen 16S del ARNr (ribosómico) así como en características biológicas. En general, entre los fitoplasmas de una misma especie, $\geq 97,5$ % de los ≥ 1200 nucleótidos del gen 16S del ARNr son idénticos. Cuando en una especie de “*Ca.*” se incluyen fitoplasmas con características biológicas diferentes (distintos vectores y plantas hospedantes) se pueden distinguir taxonómicamente aplicando ciertas reglas específicas publicadas por el IRPCM (2004). Las descripciones de especies de “*Ca.* Phytoplasma” se publican en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (a marzo de 2015 se han descrito treinta y siete).

3. Detección e identificación

Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) son el método preferido para la detección de fitoplasmas. Para que la detección molecular de fitoplasmas sea satisfactoria, debe realizarse un muestreo adecuado de tejido vegetal y deben utilizarse métodos fiables de extracción de ácidos nucleicos (Palmano, 2001; Firrao *et al.*, 2007). Los fitoplasmas pueden estar distribuidos irregularmente y en concentraciones desiguales en una planta, sobre todo en los hospedantes leñosos; lo óptimo es utilizar tejido sintomático para su detección (Constable *et al.*, 2003; Garcia-Chapa *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2004; Necas y Krska, 2006). Algunas plantas hospedantes pueden tener una infección asintomática; si se sospecha tal infección, es importante tomar abundantes muestras de distintos tejidos de la planta.

La concentración de un fitoplasma en la planta hospedante afecta la fiabilidad de la prueba de PCR (Marzachi, 2004). Dicha concentración puede estar condicionada por la cepa o especie de fitoplasma, la especie de planta hospedante, el momento de la infección y las condiciones climáticas. El momento en el que se toman las muestras de tejidos vegetales es importante porque los cambios estacionales podrán influir en la ubicación de los fitoplasmas en la planta y en su concentración (Seemüller *et al.*, 1984; Jarauschi *et al.*, 1999; Berges *et al.*, 2000; Constable *et al.*, 2003; Garcia-Chapa *et al.*, 2003; Prezelj *et al.*, 2012).

En la mayoría de las enfermedades producidas por fitoplasmas, las mejores fuentes de muestras para el diagnóstico son las hojas con síntomas. Los fitoplasmas se alojan en los elementos cribosos del floema de las plantas infectadas y, por tanto, para la extracción de ADN suelen utilizarse los peciolo y las nervaduras medias de las hojas, los tallos o la corteza interna. En algunos casos (p. ej., el fitoplasma de la enfermedad X del melocotonero), la mayor concentración de fitoplasmas se da en los pedúnculos de los frutos (Kirkpatrick, 1991). Aunque pueden detectarse fitoplasmas en raíces y raspaduras de la corteza de árboles dormidos, por lo general es mejor realizar las pruebas de detección de fitoplasmas al final del verano. Las muestras vegetales tomadas se pueden almacenar hasta seis meses a -20°C antes de someterlas a prueba. El almacenamiento a más largo plazo se realiza a -80°C , o bien el material vegetal puede liofilizarse o desecarse con cloruro cálcico y almacenarse a 4°C .

Se han publicado diversos métodos de extracción de ácido nucleico para la detección de fitoplasmas mediante PCR. Varios de ellos incluyen una fase de enriquecimiento para concentrar los fitoplasmas antes de la extracción del ácido nucleico (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Ahrens y Seemüller, 1992; Prince *et al.*, 1993). Estas técnicas pueden resultar útiles en hospedantes que contienen concentraciones bajas de fitoplasmas, como las plantas leñosas perennes, o en hospedantes "difíciles" de los que a menudo se extraen, junto con el ácido nucleico, concentraciones altas de compuestos como polisacáridos y polifenoles, que pueden inhibir la PCR. En algunos métodos simplificados, el tejido vegetal se tritura directamente en un tampón de lisis disponible comercialmente o en un tampón a base de bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA, o CTAB por sus siglas en inglés). Normalmente se utiliza un tampón CTAB al 2%; se ha comprobado que para la vid es más fiable una solución al 3% (Daire *et al.*, 1997; Angelini *et al.*, 2001). A continuación, el ADN se extrae directamente del lisado mediante columnas de centrifugación con membrana de gel de sílice disponibles comercialmente (Green *et al.*, 1999; Palmano, 2001) o partículas magnéticas (Mehle *et al.*, 2013), o con disolventes orgánicos (Daire *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). El método en el que se utilizan partículas magnéticas se realiza por lo general en un extractor automático de ácido nucleico (p. ej., el KingFisher de Thermo Scientific¹). La mayoría de los métodos de extracción están plenamente validados para diversas especies de plantas hospedantes. La elección del método depende del hospedante objeto de la prueba y de la disponibilidad de instalaciones y equipo. Podrá ser práctico emplear un método que incorpore una fase de enriquecimiento de fitoplasmas para los hospedantes leñosos perennes y un método simplificado para los hospedantes herbáceos. Para garantizar la fiabilidad de los

¹ En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en la publicación se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

diagnósticos rutinarios es importante validar un método de extracción para un hospedante particular.

Se han diseñado varios cebadores de PCR universales que permiten la amplificación del gen 16S del ARNr de todos los fitoplasmas conocidos. Los cebadores utilizados más habitualmente son los pares de cebadores P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) y R16F2n/R16R2 (Lee *et al.*, 1993; Gundersen y Lee, 1996), que se pueden utilizar en un protocolo de PCR anidada. El par de cebadores P1/P7 amplifica un producto de la PCR que contiene el gen 16S del ARNr completo y también la región espaciadora 16S/23S del ARNr. Se ha informado que la PCR en tiempo real es, para ciertas combinaciones de hospedante y fitoplasma, tan sensible como la PCR anidada o más (Christensen *et al.*, 2004), y es más adecuada para los análisis de alta capacidad porque no es necesario el procesamiento tras la amplificación. La PCR en tiempo real con sondas TaqMan también es más específica y ofrece menos oportunidades de contaminación cruzada que la PCR convencional, especialmente la PCR anidada. Los análisis de PCR recomendados en este protocolo pueden dar falsos positivos con bacterias emparentadas estrechamente, una concesión necesaria para que el análisis sea universal (Fránová, 2011; Pilotti *et al.*, 2014). Pueden realizarse ensayos de PCR más específicos o, si el resultado es crucial (p. ej., muestras analizadas a efectos de la cuarentena posentrada, del registro de un nuevo hospedante o de una distribución nueva), se debería secuenciar el producto de la PCR convencional.

Además de para la amplificación del gen 16S del ARNr, también se han utilizado métodos basados en la PCR para amplificar otras regiones genómicas a efectos de detectar y clasificar fitoplasmas, por ejemplo, genes de las proteínas ribosómicas (Lim y Sears, 1992; Jomantiene *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Martini *et al.*, 2007), el gen *tuf* (Schneider *et al.*, 1997; Makarova *et al.*, 2012), el gen 23S del ARNr (Guo *et al.*, 2003) y el gen *secY* (Lee *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2013; Quaglino *et al.*, 2013). Estos cebadores podrán resultar útiles cuando se requiera una segunda región independiente del genoma del fitoplasma.

Las muestras podrán contener compuestos inhibidores de la PCR, dependiendo de la especie de hospedante y del tipo y la edad del tejido. Por tanto, es importante comprobar la aptitud de los extractos de ADN para la PCR utilizando cebadores de control interno que amplifiquen un gen de la planta hospedante. Los efectos inhibidores del hospedante pueden compensarse con una purificación adicional del ADN a través de una columna de centrifugación de Sephacryl o añadiendo albúmina sérica bovina (ASB, o BSA por sus siglas en inglés) a la mezcla de la PCR en una concentración final de 0,5 mg/ml (Kreader, 1996).

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que con ello se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad

y/o reproducibilidad alcanzado. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

3.1 PCR convencional anidada

En la primera fase de PCR de este ensayo, se utilizan los cebadores P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Schneider *et al.*, 1995):

P1 (directo): 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'

P7 (inverso): 5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'

Los cebadores de la segunda fase de PCR son el R16F2n (Gundersen y Lee, 1996) y el R16R2 (Lee *et al.*, 1993):

R16F2n (directo): 5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 (inverso): 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

La mezcla de reacción (20 µl) consiste en un tampón de polimerasa de ADN Taq 1× que contiene 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada cebador, 200 µM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), 1 U de polimerasa de ADN Taq y 2 µl de ADN molde. La amplificación se realiza mediante una etapa inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C seguida de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 53 °C (cebadores P1/P7) o a 50 °C (cebadores R16F2n/R16R2) y 1 min a 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C. En la segunda fase de la PCR anidada se utiliza como molde 1 µl de los productos de la PCR de la primera fase, ya sea sin diluir o en una dilución de hasta 1:30. Los productos obtenidos tras la PCR se analizan por electroforesis en gel. Los cebadores P1/P7 y R16F2n/R16R2 producen, respectivamente, un amplicón de 1800 pares de bases (pb) y un amplicón de 1250 pb.

La presencia, en los extractos, de ADN apto para la PCR se confirma mediante los cebadores de Werren *et al.* (1995) del gen universal 28S del ARNr de los eucariotas:

28Sf (directo): 5'-CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC-3'

28Sr (inverso): 5'-AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC-3'

La mezcla de reacción para el ensayo del gen 28S del ARNr tiene los mismos componentes y el ciclado se realiza en las mismas condiciones que en el ensayo para los fitoplasmas, de manera que ambos ensayos se pueden hacer simultáneamente en tubos distintos. El par de cebadores 28Sf/28Sr produce un amplicón de 500–600 pb.

También pueden utilizarse otros pares de cebadores para comprobar que el ADN es apto para la PCR.

3.2 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realiza mediante el ensayo de TaqMan diseñado por Christensen *et al.* (2004) para el gen 16S del ARNr:

Cebador directo: 5'-CGT ACG CAA GTA TGA AAC TTA AAG GA-3'

Cebador inverso: 5'-TCT TCG AAT TAA ACA ACA TGA TCC A-3'

Sonda TaqMan: 5'-FAM-TGA CGG GAC TCC GCA CAA GCG-BHQ-3'

También puede aplicarse la PCR en tiempo real de Hodgetts *et al.* (2009) diseñada para el gen 23S del ARNr:

JH-F 1 (cebador directo): 5'-GGT CTC CGA ATG GGA AAA CC-3'

JH-F all (cebador directo): 5'-ATT TCC GAA TGG GGC AAC C-3'

JH-R (cebador inverso): 5'-CTC GTC ACT ACT ACC RGA ATC GTT ATT AC-3'

JH-P uni (sonda TaqMan): 5'-FAM-MGB-AAC TGA AAT ATC TAA GTA AC-BHQ-3'

La mezcla de reacción (25 µl) consiste en una mezcla maestra de PCR en tiempo real TaqMan 1×, 300 nM de cebador directo, 300 nM de cebador inverso, 100 nM de sonda FAM y 2 µl de molde de ADN. Todas las muestras se analizan por duplicado. La amplificación se realiza mediante una etapa inicial de desnaturalización de 3 min a 95 °C seguida de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Estas condiciones de ciclado podrán variar dependiendo del tipo de mezcla maestra que se utilice (p. ej., algunas mezclas requieren una fase de activación de la polimerasa de 10 min a 95 °C y las mezclas que contienen uracil-ADN glucosilasa [UDG] requieren una etapa inicial de 2 min a 50 °C). Los resultados de la PCR en tiempo real se analizan con el programa informático del fabricante facilitado con el instrumento.

En el ensayo de PCR en tiempo real de Christensen *et al.* (2004), se utilizan 900 nM de cebador inverso, pero en una publicación posterior este valor se redujo a 300 nM (Christensen *et al.*, 2013). El ensayo funcionará igual de bien con cualquiera de las dos concentraciones de cebador inverso.

El método de PCR en tiempo real del gen 16S del ARNr se evaluó con fitoplasmas de 18 subgrupos, y se determinó que su sensibilidad era igual que la de la PCR convencional anidada o hasta 10 veces mayor, dependiendo de la combinación de hospedante y fitoplasma (Christensen *et al.*, 2004). En una prueba interlaboratorios para la detección de fitoplasmas de frutales en la que participaron 22 laboratorios se constató que los ensayos de Christensen *et al.* (2004) y de Hodgetts *et al.* (2009) eran similares en términos de sensibilidad y especificidad (EUPHRESO FruitPhytoInterlab Group, 2011).

La presencia de ADN apto para la PCR en los extractos se confirma mediante el ensayo de Weller *et al.* (2000), en el que se amplifica el gen de la citocromo oxidasa (COX):

COX-F (cebador directo): 5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

COX-R (cebador inverso): 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG-3'

COX-P (sonda TaqMan): 5'-FAM-TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT-BHQ-3'

Otra opción que puede utilizarse para confirmar que el ADN es apto para la PCR es el ensayo de Christensen *et al.* (2004), basado en el gen 18S del ARNr. Este se recomienda para las monocotiledóneas, en las que el análisis del gen COX es menos eficiente.

Cebador directo: 5'-GAC TAC GTC CCT GCC CTT TG-3'

Cebador inverso: 5'-AAC ACT TCA CCG GAC CAT TCA-3'

Sonda TaqMan: 5'-FAM-ACA CAC CGC CCG TCG CTC C-BHQ-3'

Las mezclas de reacción para los ensayos basados en el gen COX y el gen 18S del ARNr tienen los mismos componentes y el ciclado se realiza en las mismas condiciones que en el análisis en tiempo real para fitoplasmas, de manera que ambos análisis se pueden realizar simultáneamente en tubos distintos. Alternativamente, el análisis del control interno puede realizarse en una reacción multiplex en el mismo tubo usado para los fitoplasmas, si se marca la sonda con un colorante indicador diferente y las concentraciones de los cebadores y la sonda se ajustan de forma óptima para evitar que el ADN vegetal utilizado como control interno, en una concentración alta, desplace al ADN de los fitoplasmas, cuya concentración es baja.

3.3 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fidedigno el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácido nucleico y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre requerido. 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).

Control positivo de ácido nucleico. Este control se utiliza para hacer un seguimiento de la eficiencia del método de prueba (así como de la extracción) y, específicamente, de la amplificación. Se podrá utilizar el ADN de fitoplasmas extraído de una planta infectada, el ADN genómico completo amplificado o un control sintético (p. ej., un producto de PCR clonado).

Control interno. Debería incorporarse tanto al protocolo de la PCR convencional como al de la PCR en tiempo real un gen de mantenimiento vegetal, por ejemplo el gen universal 28S del ARNr de los

eucariotas (en la Sección 3.1 se describe su uso en la PCR convencional anidada) o el gen COX (en la Sección 3.2 se describe su uso en la PCR en tiempo real), a fin de descartar la posibilidad de obtener 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). Este control es necesario para la PCR convencional y en tiempo real a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. El agua de calidad apta para PCR que se utilizó para preparar la mezcla de reacción se añade en la fase de amplificación.

Control positivo de extracción. Este control se utiliza para asegurar que el ácido nucleico del fitoplasma esté presente en una cantidad y con una calidad suficientes para la PCR y que se detecte el patógeno. El ácido nucleico del fitoplasma se extrae de tejido infectado del hospedante o de tejido vegetal sano al que se ha añadido una concentración del fitoplasma.

Para el control positivo debe utilizarse aproximadamente una décima parte de la cantidad de tejido foliar utilizada por planta para la extracción de ADN. Si se agrupan las muestras, se debería ajustar de manera acorde la cantidad de control positivo (p. ej., diez lotes de muestras de 20 mg agrupadas para la extracción de ADN, 2 mg de hoja infectada + 198 mg de tejido vegetal sano). Si no hay detección del control positivo, debería repetirse el ensayo o reducirse el porcentaje de agrupamiento hasta lograr una detección fiable.

Para la PCR, deben adoptarse precauciones a fin de evitar la contaminación cruzada por aerosoles procedentes del control positivo o de las muestras positivas. El control positivo empleado en el laboratorio debería secuenciarse a fin de que esta secuencia se pueda comparar fácilmente con las obtenidas de los amplicones del tamaño correcto. Otra opción es elaborar controles positivos sintéticos 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 monitorear la contaminación durante la extracción del ácido nucleico o la reacción cruzada con el tejido del hospedante. El control podrá ser el tampón de extracción o podrá incluir ácido nucleico extraído de tejido no infectado del hospedante y posteriormente amplificado. Cuando se prevean muchas muestras positivas, se recomienda incluir controles negativos de extracción entre las muestras para analizar.

3.4 Interpretación de los resultados de la PCR

3.4.1 PCR convencional anidada

La PCR específica del patógeno solo se considerará válida si:

- el control positivo produce un amplicón del tamaño correcto para el patógeno objetivo

- no se producen amplicones del tamaño correcto para el patógeno objetivo en el control negativo de extracción ni en el control negativo de amplificación.

En los controles internos dirigidos al ADN vegetal, el control de tejido sano (si se utiliza), el control positivo y cada una de las muestras de la prueba deben producir un amplicón del tamaño esperado. Si no se logra la amplificación de las muestras con los cebadores de control interno, la causa puede ser, por ejemplo, que no se haya extraído el ADN, que no se haya incluido el ácido nucleico en la mezcla de la reacción, que el extracto de ADN contenga compuestos inhibidores de la PCR o que el ADN se haya degradado.

La prueba realizada en una muestra se considerará positiva si produce un amplicón del tamaño correcto. Para identificar el fitoplasma presente en las muestras positivas se deberá secuenciar el amplicón (véase la Sección 3.5). En algunos casos, se dispone de ensayos de PCR más específicos.

3.4.2 PCR en tiempo real

Con la PCR en tiempo real se determinará si una muestra es positiva o negativa para fitoplasmas. Para identificar el fitoplasma presente en las muestras positivas, se deberá realizar una PCR convencional, con objeto de obtener, para el análisis de secuencias, al menos el segmento de 1250 pb de longitud del gen 16S del ARNr generado por el par de cebadores R16F2n/R16R2 (véase la Sección 3.5). Otra opción, para algunos fitoplasmas, podrá ser utilizar ensayos de PCR en tiempo real específicos; por ejemplo, para el grupo 16SrX (proliferación de la manzana) (Torres *et al.*, 2005) y para la flavescencia dorada (Pelletier *et al.*, 2009).

3.5 Análisis de las secuencias

Los productos de la PCR deberían secuenciarse, ya sea directamente o clonándolos primero en un vector de clonación de productos de PCR. Los datos de las secuencias se pueden analizar con el programa de alineación de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Si la coincidencia de la secuencia del fitoplasma con la de su pariente más cercano es menor que el 97,5 %, el fitoplasma se considera una especie nueva de “*Ca. Phytoplasma*”. En este caso, debería secuenciarse el gen 16S del ARNr completo y realizarse un análisis filogenético. También es deseable secuenciar una región independiente del genoma, por ejemplo, la región espaciadora 16S/23S del ARNr, el gen *secY*, genes de las proteínas ribosómicas o el gen *tuf*.

4. Registros

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

En los casos en que los resultados del diagnóstico puedan afectar a otras partes contratantes, en particular en casos de incumplimiento y cuando el fitoplasma se detecta por primera vez en un área, los siguientes registros, evidencias y material adicional deberían conservarse por lo menos durante un año, de un modo que garantice su rastreabilidad:

- La muestra original, conservada congelada a -80°C , liofilizada, o desecada con cloruro cálcico y conservada a 4°C .
- Cuando proceda, las extracciones de ADN deberían conservarse a -20°C o a -80°C . Los extractos vegetales impregnados en membranas deberían conservarse a temperatura ambiente.
- Cuando proceda, los productos de la amplificación mediante PCR deberían conservarse a -20°C o a -80°C .

5. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

Plant Health and Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, PO Box 2095, Auckland 1140, Nueva Zelandia (Lia W. Liefting; correo electrónico: lia.liefting@mpi.govt.nz; tel.: +64 9 9095726, fax: +64 9 9095739).

Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, Victoria, AgriBio, 5 Ring Road, Bundoora, VIC 3083, Australia (Fiona Constable; correo electrónico: fiona.constable@ecodev.vic.gov.au; tel.: +61 3 9032 7326; Fax: + 61 3 9032 7604).

Departamento de Territorio y Sostenibilidad, Av. Diagonal 525, 08029 Barcelona, España (Ester Torres; correo electrónico: ester.torres@gencat.net).

Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute for Plant Protection and Fruit Crops, Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim, Alemania (Wilhelm Jelkmann; correo electrónico: wilhelm.jelkmann@jki.bund.de).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo 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) a través de la Secretaría de la CIPF (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

6. Agradecimientos

Este protocolo de diagnóstico fue redactado por L.W. Liefting (Plant Health and Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, Nueva Zelandia [véase la sección anterior]), P. Jones (Plant Pathogen Interactions Division, Rothamsted Research, Reino Unido), F. Constable (Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources, Victoria, Australia [véase la sección

anterior]), E. Torres (Departamento de Territorio y Sostenibilidad, Barcelona, España [véase la sección anterior]) W. Jelkmann (Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute for Plant Protection and Fruit Crops, Alemania [véase la sección anterior]) y J. Verhoeven (Plant Protection Service, Department Diagnostics, Wageningen, Países Bajos).

7. Referencias

En el presente anexo se hace referencia a las normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI):

<https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

Ahrens, U. y Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828–832.

Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A. y Boudon-Padieu, E. 2001. Flavescence dorée in France and Italy: Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79–86.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W. y Hogenhout, S. A. 2006. Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.

Berges, R., Rott, M. y Seemüller, E. 2000. Range of phytoplasma concentration in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 1145–1152.

Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M. y Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17: 1175–1184.

Christensen, N. M., Nyskjold, H. y Nicolaisen, M. 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. *En*: M. Dickinson y J. Hodgetts, eds. *Phytoplasma: Methods and protocols*. Serie Methods in molecular biology, vol. 938, págs. 245–252. Nueva York, NY (Estados Unidos), Humana Press. 421 págs.

Constable, F. E., Gibb, K. S. y Symons, R. H. 2003. Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathology*, 52: 267–276.

Daire, X. D., Clair, D., Reinert, W. y Boudon-Padieu, E. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507–514.

- Davis, R. E., Jomantiene, R. y Zhao, Y.** 2005. Lineage-specific decay of folate biosynthesis genes suggests ongoing host adaptation in phytoplasmas. *DNA Cell Biology*, 24: 832–840.
- Davis, R. E. y Sinclair, W. A.** 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88: 1372–1376.
- Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L., Lee, I. M., Jomantiene, R. y Douglas S. M.** 2013. ‘*Candidatus* Phytoplasma pruni’, a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 766–776.
- Deng, S. y Hiruki, C.** 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53–61.
- Doi, Y. M., Teranaka, M., Yora, K. y Asuyama, H.** 1967. Mycoplasma or PLT-group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches’ broom, aster yellows and paulownia witches’ broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 259–266.
- EUPHRESCO FruitPhytoInterlab Group.** 2011. European interlaboratory comparison and validation of detection methods for ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’, ‘*Candidatus* Phytoplasma prunorum’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma pyri’: Resultados preliminares. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S281–S284.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M. y Marzachi, C.** 2007. Phytoplasmas: Genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1353–1375.
- Foissac, X. y Wilson, M. R.** 2010. Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. En P.G. Weintraub y P. Jones, eds. *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts, and vectors*, págs. 309–324. Wallingford (Reino Unido), CABI. 331 págs.
- Fránová, J.** 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S287–S288.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M. A., Lavina, A. y Batlle, A.** 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513–520.
- Green, M. J., Thompson, D. A. y MacKenzie, D. J.** 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83: 482–485.
- Gundersen, D. E. y Lee, I-M.** 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144–151.

- Guo, Y. H., Cheng, Z. M. y Walla, J. A.** 2003. Rapid PCR based detection of phytoplasmas from infected plants. *HortScience*, 38: 1134–1136.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R. y Dickenson, M.** 2009. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2945–2950.
- IPWG** (Grupo de trabajo internacional de fitoplasmas). s.f. Página web de la Phytoplasma collection. Disponible en http://www.ipwgnat.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5 (consultada el 17 de abril de 2015).
- IRPCM** (Programa internacional de investigación sobre micoplasmología comparada/Equipo de trabajo sobre espiroplasmas – Grupo de taxonomía de fitoplasmas). 2004. ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243–1255.
- Ishii, T., Doi, Y., Yora, K. y Asuyama, H.** 1967. Suppressive effects of antibiotics of the tetracycline group on symptom development in mulberry dwarf disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33: 267–275.
- Jarausch, W., Lancas, M. y Dosba, F.** 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology*, 147: 47–54.
- Jomantiene, R., Davis, R. E., Maas, J. y Dally, E.** 1998. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S ribosomal-RNA and ribosomal-protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269–277.
- Kirkpatrick, B. C.** 1991. Mycoplasma-like organisms: Plant and invertebrate pathogens. En A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K.-S. Schleifer, eds. *The prokaryotes*, Vol. III, págs. 4050–4067. Nueva York (Estados Unidos de América), Springer-Verlag.
- Kirkpatrick, B. C., Stenger, D. C., Morris, T. J. y Purcell, A. H.** 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238: 197–199.
- Kreder, C. A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102–1106.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K. D., Zhao, Y., Davis, R. E. y Harrison, N. A.** 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2887–2897.
- Lee, I.-M., Davis, R. E. y Gundersen-Rindal, D. E.** 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221–255.

- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E. y Bartoszyk, I. M.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153–1169.
- Lee, I.-M., Hammond, R. W., Davis, R. E. y Gundersen, D. E.** 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834–842.
- Lim, P.-O. & Sears, B. B.** 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174: 2606–2611.
- Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A. y Nicolaisen, M.** 2012. DNA barcoding for identification of ‘*Candidatus* Phytoplasmas’ using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS ONE*, 7: e52092.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. y Seemüller, E.** 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas comparing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89: 805–810.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K. D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N. A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A. J. y Osler, R.** 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037–2051.
- Marzachi, C.** 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 228–231.
- Mehle, N., Nikolić, P., Rugar, M., Boben, J., Ravnikar, M. y Dermastia, M.** 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. *En: M. Dickinson y J. Hodgetts, eds. Phytoplasma: Methods and protocols. Serie Methods in molecular biology, vol. 938, págs. 139-145. Nueva York, NY (Estados Unidos de América), Humana Press. 421 págs.*
- Necas, T. y Krska, B.** 2006. Selection of woody indicators and the optimum plant material and sampling time for phytoplasma ESFY detection. *Acta Horticulturae*, 717: 101–105.
- Oshima, K., Maejima, K. y Namba, S.** 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, doi: 103389/fmicb.2013.00230.
- Palmano, S.** 2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 99–107.
- Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X. y Malembic-Maher, S.** 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis*, 48: 87–95.

- Pilotti, C. A., Saul, J., Liefiting, L. W., Kembu, A. y Kokoa, P.** 2014. Occurrence of a phytoplasma associated with bogia coconut syndrome in Papua New Guinea. *Agricultural Science*, 26: 32–40.
- Prezelj, N., Nikolić, P., Gruden, K., Ravnihar, M. y Dermastia, M.** 2012. Spatiotemporal distribution of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 62: 760–766.
- Prince, J. P., Davis, R. E., Wolf, T. K., Lee, I.-M., Mogen, B. D., Dally, E. L., Bertaccini, A., Credi, R. y Barba, M.** 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130–1137.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W. y Davis, R. E.** 2013. ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 2879–2894.
- Schneider, B., Gibb, K.S. y Seemüller, E.** 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381–3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D. y Kirkpatrick, B. C.** 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. En S. Razin y J.G. Tully, eds. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, vol. 1, págs. 369–380. San Diego, CA (Estados Unidos de América), Academic Press. 483 págs.
- Seemüller, E., Garnier, M. y Schneider, B.** 2002. Mycoplasmas of plants and insects. En S. Razin y R. Herrmann, eds. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*, págs. 91–115. Nueva York, NY (Estados Unidos de América), Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers. 572 págs.
- Seemüller, E., Schaper, U. y Zimbelmann, F.** 1984. Seasonal variation in the colonization pattern of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371–382 (en inglés con resumen en alemán).
- Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C. y Martín, M. P.** 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 334–340.
- Weintraub, P. y Beanland, L.** 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91–111.
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., y Stead, D. E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.

- Werren, J. H., Windsor, D. y Guo, L.** 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 262: 197–204.
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K. y Kirkpatrick, B. C.** 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45–50.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

- 2004-11: El CN añadió la cuestión: Virus y fitoplasmas (2004-018).
- 2006-004: La CMF-1 añadió el tema.
- 2013-04: Consulta de expertos.
- 2013-06: Proyecto presentado en la reunión del GTPD.
- 2014-05: El CN aprobó presentar el texto para consulta a los miembros (2014_eSC_May_07).
- 2014-07: Consulta a los miembros.
- 2015-03: Aprobado por el GTPD y remitido al CN para que apruebe su adopción (2015_eTPDP_May_01).
- 2015-06: Aprobación por el CN para el período de notificación del PD (2015_eSC_Nov_04).
- 2015-08: Período de notificación del PD.
- 2015-08: Objeción formal recibida.
- 2015-09: Reunión virtual del GTPD.
- 2015-10: Análisis y revisión por el GTPD de la objeción formal (2015_eTPDP_Oct_03).
- 2015-11: Aprobación por el CN para el período de notificación del PD y aprobación de la respuesta a la objeción formal (2015_eSC_Nov_10).
- 2016-01: El CN adoptó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones formales).
- NIMF 27. Anexo 12.** Fitoplasmas (2016). Roma, CIPF, FAO.
- 2018-01: El GRE para el Español y el Servicio de Traducción de la FAO revisaron este PD y la Secretaría de la CIPF incorporó las modificaciones conformemente.
- Última actualización de la historia de publicación: 2018-01.

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

CIPF

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad vegetal que tiene como objetivo proteger las plantas cultivadas y silvestres previniendo la introducción y propagación de plagas. Los viajes y el comercio internacional hoy son más abundantes que nunca antes. En el desplazamiento de personas y mercancías por todo el mundo, los acompañan organismos que representan riesgos para las plantas.

La organización

- ◆ Hay más de 180 partes contratantes de la CIPF
- ◆ Cada parte contratante tiene una organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) y un contacto oficial de la CIPF
- ◆ Nueve organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) obran para facilitar la aplicación de la CIPF en los países
- ◆ La CIPF se enlaza con las organizaciones internacionales pertinentes a fin de contribuir a la creación de capacidad regional y nacional
- ◆ La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proporciona la Secretaría de la CIPF

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia

Tel. +39 06 5705 4812

Correo electrónico: ippc@fao.org | Web: www.ippc.int

