



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

PROTOSCOLOS DE DIAGNÓSTICO

NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS 27

NIMF 27
ANEXO 14

ESP

PD 14: *Xanthomonas fragariae*

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 agosto de 2016.

Este anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27.

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas

PD 14: *Xanthomonas fragariae*

Adoptado en 2016; publicado en 2018

ÍNDICE

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Información sobre la plaga..... | 4 |
| 2. | Información taxonómica | 5 |
| 3. | Detección..... | 5 |
| 3.1 | Síntomas | 6 |
| 3.2 | Muestreo | 7 |
| 3.3 | Preparación de las muestras | 8 |
| 3.4 | Pruebas de detección rápida..... | 8 |
| 3.5 | Aislamiento..... | 8 |
| 3.5.1 | Método 1 de aislamiento..... | 9 |
| 3.5.2 | Método 2 de aislamiento..... | 10 |
| 3.5.3 | Interpretación de los resultados del aislamiento | 10 |
| 3.6 | Ensayo con hojas desprendidas y enriquecimiento biológico..... | 11 |
| 3.6.1 | Ensayo con hojas desprendidas..... | 11 |
| 3.6.2 | Interpretación de los resultados del ensayo con hojas desprendidas..... | 11 |
| 3.6.3 | Aislamiento mediante enriquecimiento <i>in planta</i> | 12 |
| 3.6.4 | PCR con enriquecimiento <i>in vitro</i> a partir del ensayo con hojas desprendidas | 12 |
| 3.7 | ELISA..... | 12 |
| 3.7.1 | ELISA indirecto..... | 13 |
| 3.7.2 | DAS-ELISA..... | 13 |
| 3.7.3 | Interpretación de los resultados del ELISA | 14 |
| 3.8 | Inmunofluorescencia..... | 14 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.8.1 | Interpretación de los resultados de la inmunofluorescencia | 15 |
| 3.9 | PCR..... | 16 |
| 3.9.1 | Extracción de ADN..... | 17 |
| 3.9.2 | PCR múltiple..... | 17 |
| 3.9.2.1 | Protocolo de Hartung y Pooler (1997)..... | 17 |
| 3.9.3 | PCR anidada | 18 |
| 3.9.3.1 | Protocolo de Moltmann y Zimmerman (2005)..... | 18 |
| 3.9.3.2 | Protocolo de Roberts <i>et al.</i> (1996)..... | 19 |
| 3.9.4 | PCR en tiempo real..... | 20 |
| 3.9.4.1 | Protocolo de Weller <i>et al.</i> (2007)..... | 20 |
| 3.9.5 | Interpretación de los resultados de la PCR | 21 |
| 3.9.5.1 | PCR convencional..... | 21 |
| 3.9.5.2 | PCR en tiempo real..... | 21 |
| 3.9.6 | Controles para las pruebas moleculares..... | 21 |
| 4. | Identificación..... | 23 |
| 4.1 | Pruebas bioquímicas y fisiológicas..... | 23 |
| 4.1.1 | Caracterización de los ésteres metílicos de ácidos grasos | 27 |
| 4.1.1.1 | Interpretación de los resultados del perfil de los EMAG..... | 28 |
| 4.2 | Pruebas serológicas..... | 28 |
| 4.2.1 | Inmunofluorescencia..... | 28 |
| 4.2.2 | ELISA..... | 28 |
| 4.3 | Pruebas moleculares | 28 |
| 4.3.1 | PCR..... | 28 |
| 4.3.2 | REP-PCR | 28 |
| 4.3.2.1 | Interpretación de los resultados de la REP-PCR..... | 29 |
| 4.3.3 | Análisis de secuencias multilocus..... | 29 |
| 4.4 | Pruebas de patogenicidad..... | 30 |
| 4.4.1 | Procedimiento general de inoculación | 30 |
| 4.4.1.1 | Interpretación de los resultados de las pruebas de patogenicidad..... | 31 |
| 4.4.2 | Reacción de hipersensibilidad | 31 |

| | |
|---|----|
| 4.4.2.1 Interpretación de los resultados de la prueba de reacción de hipersensibilidad..... | 31 |
| 5. Registros..... | 31 |
| 6. Puntos de contacto para obtener información adicional..... | 32 |
| 7. Agradecimientos | 32 |
| 8. Referencias | 33 |
| 9 Figuras..... | 39 |

1. Información sobre la plaga

Xanthomonas fragariae Kennedy y King, 1962 es el agente causal de la enfermedad bacteriana de la mancha angular de la hoja de la fresa. Se trata de una enfermedad prevalente principalmente en América del Norte que se observó por primera vez en los Estados Unidos de América en 1962 (Kennedy y King, 1962; Hildebrand *et al.*, 1967; Maas *et al.*, 1995); sin embargo, posteriormente se ha registrado en numerosas áreas de cultivo de fresa en todo el mundo, con inclusión de América del Sur y Europa (CAB International). *Fragaria* × *ananassa*, la fresa cultivada más difundida, es el hospedante primario de *X. fragariae*. Los cultivares comerciales varían en susceptibilidad y otras especies de *Fragaria*, como *F. chiloensis*, *F. virginiana* y *F. vesca*, así como *Potentilla fruticosa* y *P. glandulosa*, también son susceptibles. De las especies de *Fragaria*, solo *F. moschata* es inmune (Kennedy y King, 1962; Kennedy, 1965; Maas, 1998).

X. fragariae se transmite fácilmente a través de material de plantación asintomático con infección latente. Las fuentes de inóculo para la infección primaria son plantas hijas -infectadas pero asintomáticas- que se desarrollan en estolones de plantas de vivero infectadas y que se emplean para plantar en campos de producción frutícola. Si bien *X. fragariae* no vive libre en el suelo, puede invernar en él en asociación con material vegetal infectado anteriormente y persistir por largos períodos de tiempo (Maas, 1998). Los residuos de hojas infectadas y las infecciones de la corona en los estolones utilizados para la plantación también son fuentes de inóculo de la infección primaria.

Los análisis de las cepas de *X. fragariae* aisladas en diversos momentos y lugares en todo el mundo indican que existe un cierto grado de diversidad genética y fenotípica entre ellas (Opgenorth *et al.*, 1996; Pooler *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1996). Asimismo, se han observado algunas diferencias de patogenicidad (Maas *et al.*, 2000). No obstante, hay un alto grado de similitud entre las cepas patógenas, y no se ha encontrado ninguna correlación entre los genotipos o los fenotipos y el origen geográfico de las cepas. En consecuencia, es probable que las cepas de *X. fragariae* que se conocen actualmente en todo el mundo constituyan una población clonal. Para evitar la diseminación del patógeno y el desarrollo de la enfermedad, es fundamental detectar de forma temprana la presencia de *X. fragariae* en el material de plantación de fresa infectado pero asintomático.

2. Información taxonómica

Nombre: *Xanthomonas fragariae* Kennedy y King, 1962

Sinónimos: ninguno

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

Nombre común: mancha angular de la fresa / mancha angular de la frutilla

Nota: *Xanthomonas fragariae* Kennedy y King, 1962 es un miembro de la subdivisión gamma de las proteobacterias (Stackebrandt *et al.*, 1988), fenón 3 de Van den Mooter y Swings (1990), grupo 1 según la homología ADN-ADN de Rademaker *et al.* (2000) y grupo 1 de ADN de Rademaker *et al.* (2005).

3. Detección

El diagnóstico de la mancha angular de la fresa, causada por *X. fragariae*, se basa en la inspección para detectar síntomas diagnósticos, el aislamiento directo o indirecto del patógeno, las pruebas serológicas (como la inmunofluorescencia indirecta o el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas [ELISA]) y los métodos moleculares. Se han elaborado varias pruebas de detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cada una de las cuales detecta diferentes *loci* del genoma de *X. fragariae* (Roberts *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2007; Vandroemme *et al.*, 2008; Turechek *et al.*, 2008; Vermunt y van Beuningen, 2008). Estas pruebas pueden emplearse para confirmar la presencia de *X. fragariae* en material vegetal sintomático y varias de ellas también se han utilizado para detectar infecciones latentes de *X. fragariae* (Mahuku y Goodwin, 1997; Zimmerman *et al.*, 2004; Moltman y Zimmerman, 2005). El análisis de hojas desprendidas (Civerolo *et al.*, 1997a) es útil para hacer un diagnóstico de presunción de *X. fragariae* en los casos en que el aislamiento directo es muy lento o hay impedimentos para realizarlo. Los métodos descritos en el presente protocolo de diagnóstico, a excepción de la PCR anidada, han sido validados en un estudio de desempeño de las pruebas financiado por la Unión Europea (SMT-4-CT98-2252) (López *et al.*, 2005).

El aislamiento directo de *X. fragariae* es difícil, incluso en presencia de síntomas característicos y exudados bacterianos, porque la bacteria crece muy lentamente en medios nutritivos artificiales y se ve invadida con rapidez por bacterias saprófitas (Hazel y Civerolo 1980; López, *et al.*, 1985; Schaad *et al.*, 2001; Saddler y Bradbury, 2005). En López *et al.* (2005) se proporcionan procedimientos específicos para el aislamiento directo de *X. fragariae*. El enriquecimiento selectivo del patógeno *in planta* mediante la

inoculación de hojas desprendidas de fresa con extractos acuosos de tejido enfermo o que se sospecha infectado puede facilitar el aislamiento *in vitro* de *X. fragariae* (Civerolo *et al.*, 1997a).

A continuación se presentan los procedimientos de detección de *X. fragariae* en plantas sintomáticas y asintomáticas.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se han publicado, ya que en la publicación se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad o reproducibilidad logrado. 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 Síntomas

Inicialmente aparecen manchas (lesiones) angulares de aspecto húmedo (1-4 mm de diámetro) delimitadas por las nervaduras de menor calibre en el envés de las hojas. En las fases iniciales de la infección, estas manchas son apenas visibles en el campo y presentan un color amarillo translúcido cuando se observan al trasluz. Las lesiones se agrandan y se fusionan y al final aparecen en el haz de las hojas en forma de manchas angulares de aspecto húmedo que se tornan de color marrón rojizo (Figura 1). En condiciones de humedad o cuando la humedad relativa es elevada (Figura 2), las lesiones segregan exudados bacterianos viscosos que son de color blanco, lechoso, crema o amarillo. Los exudados se secan formando masas de aspecto escamoso, opacas y blanquecinas o plateadas en un primer momento, que posteriormente adquieren un color marrón (Janse, 2005). A medida que avanza la enfermedad, las lesiones de color marrón rojizo se fusionan y necrosan. La lesión necrótica podrá rasgarse o desprenderse de la hoja, de forma que las hojas enfermas podrán parecer deterioradas o desgarradas. Las infecciones foliares a menudo se extienden y forman lesiones alargadas que siguen las nervaduras principales. En fases avanzadas del curso de la enfermedad, el tejido foliar que rodea antiguas lesiones fusionadas de color marrón rojizo suele ser clorótico (Kennedy y King, 1962; EPPO, 1997; Rat, 1993; Maas, 1998).

A diferencia de lo que ocurre con la enfermedad de la mancha angular de la fresa, la enfermedad bacteriana de las hojas de la fresa causada por *X. arboricola* pv. *fragariae* se caracteriza por presentar pequeñas lesiones de color marrón rojizo en el envés que no tienen aspecto húmedo ni son translúcidas; manchas rojizas en el haz; lesiones que se fusionan para formar grandes manchas marrones y de aspecto seco rodeadas por un halo clorótico; y grandes lesiones marrones en forma de V a lo largo del margen foliar, la nervadura principal central y las nervaduras secundarias (Janse *et al.*, 2001). Asimismo, las lesiones de la enfermedad bacteriana de las hojas no están asociadas con exudados bacterianos (Janse *et*

al., 2001). En fases avanzadas, la enfermedad bacteriana de la mancha angular de la hoja es difícil de distinguir de las enfermedades fúngicas que producen manchas foliares, como la mancha púrpura de la fresa (*Mycosphaerella fragariae*) y la antracnosis de la fresa (*Diplocarpon earliana*) (Janse *et al.*, 2001).

Las infecciones severas causadas por *X. fragariae* podrán dispersarse desde las hojas hasta la corona, donde se forman zonas diferenciadas de aspecto húmedo (Hildebrand *et al.*, 1967). Las infecciones severas de la corona pueden reducir el vigor de las plantas, que podrán doblarse y en último término morir. Las hojas que crecen a partir de coronas infectadas presentan a menudo infección sistémica con lesiones que aparecen a lo largo de las nervaduras en la base de las hojas. Cuando se corta la corona transversalmente, los haces vasculares podrán emitir un exudado bacteriano.

En casos graves, *X. fragariae* podrá atacar a las flores y provocar necrosis en las mismas, pero no infecta directamente a los frutos (Gubler *et al.*, 1999). Las lesiones de aspecto húmedo que afectan al tejido del cáliz infectado tienen un aspecto parecido al de las lesiones foliares (Figura 3). El tejido del fruto que se encuentra cerca de tejido infectado del cáliz también podrá adquirir un aspecto húmedo.

X. fragariae puede desplazarse sistémicamente a las raíces, coronas y estolones sin que estos muestren síntomas evidentes (Stefani *et al.*, 1989; Milholland *et al.*, 1996; Mahuku y Goodwin, 1997). Esta infección podrá conducir a la aparición de áreas de aspecto húmedo en la base de las hojas recién emergidas y a que, poco después, la planta se doble y muera de forma repentina. Este tipo de infección no se observa con frecuencia.

3.2 Muestreo

Para diagnosticar la enfermedad bacteriana de la mancha angular de la hoja en plantas sintomáticas, se prefiere utilizar como muestras hojas con manchas en fase inicial de aspecto húmedo, puesto que facilitan el aislamiento de *X. fragariae*. Otra posibilidad es utilizar hojas con manchas secas y con o sin exudado. También debería examinarse el tejido de la corona.

X. fragariae es una bacteria de crecimiento muy lento y ni la siembra en placas ni las pruebas serológicas son adecuadas para detectar pequeñas cantidades de bacterias en plantas asintomáticas. Para estas últimas se recomienda seleccionar varias plantas enteras y extraer pequeñas porciones de tejido de las hojas, peciolo y coronas (EPPO, 2006). Estos tejidos pueden emplearse directamente para realizar los análisis basados en la PCR que se describen en la Sección 3.9.

Una vez tomadas, las muestras no deberían dejarse en condiciones de humedad. Preferiblemente, se deberían secar parcialmente, envolver en papel, introducir en bolsas de polietileno y mantener en un lugar

fresco. Asimismo, deberían transportarse en un recipiente bien aislado, almacenarse a 4 °C una vez hayan llegado a su destino y procesarse a la mayor brevedad posible.

3.3 Preparación de las muestras

Para las plantas sintomáticas, la superficie del tejido de las hojas y de los tallos puede desinfectarse limpiándola con etanol al 70 %. Si las plantas muestran síntomas vasculares, se recomienda eliminar las raíces y las hojas, y mantener la corona y los pecíolos. Se enjuaga la muestra en agua de grifo para eliminar el exceso de tierra y a continuación se desinfecta sumergiendo la muestra en etanol al 70 % durante 1 minuto. A continuación, se enjuaga tres veces en agua destilada estéril. Se añaden aproximadamente 0,1 g de tejido foliar o de la corona y de los pecíolos por muestra a 9 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 2,9 g de Na₂HPO₄·12H₂O; 0,2 g de KH₂PO₄; agua destilada hasta 1 litro; pH 7,2). Se homogeneiza el tejido vegetal y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Para las plantas asintomáticas, se toma de forma aleatoria una muestra de 30 g, se introduce en 150 ml de PBS y se agita la mezcla durante 30 minutos. Se puede utilizar el líquido de lavado directamente para la detección o centrifugarlo a 10 000 g durante 10 minutos y, a continuación, volver a suspender el sedimento en agua destilada estéril para obtener un volumen final de 5 ml. Se deja reposar durante 15 minutos y, a continuación, se recolecta la fracción acuosa superior y se preparan las diluciones (1:10 y 1:100) en agua destilada estéril (EPPO, 2006). Posteriormente, estos macerados de muestras de tejido se utilizan en el ELISA, la inmunofluorescencia y la PCR.

3.4 Pruebas de detección rápida

Las pruebas de detección rápida facilitan la detección de *X. fragariae*. Como la bacteria es muy difícil de aislar, para confirmar la detección de *X. fragariae* se deberían obtener resultados positivos en tres pruebas (ELISA, inmunofluorescencia y PCR). El ensayo con hojas desprendidas es una prueba complementaria que permite confirmar la presencia de *X. fragariae* viable. La correlación entre el ELISA, la PCR y el ensayo con hojas desprendidas suele ser elevada (Civerolo *et al.*, 1997b).

3.5 Aislamiento

El aislamiento directo de *X. fragariae* es difícil, incluso en presencia de síntomas y exudados, porque crece muy lentamente en medios nutritivos artificiales y es superada con facilidad por organismos saprófitos. Para el aislamiento se recomiendan dos medios de cultivo. Los mejores resultados se obtienen con el medio de Wilbrink con nitrato (Wilbrink-N) (10 g de sacarosa; 5 g de proteosa peptona (L85; Oxoid¹); 0,5 g de K₂HPO₄; 0,25 g de MgSO₄·7H₂O; 0,25 g de NaNO₃; 15 g de agar purificado; agua

destilada hasta 1 litro; pH 7,0-7,2) (Koike, 1965). También se recomienda, a pesar de ser menos eficaz, el aislamiento en medio de cultivo YPGA (5 g de extracto de levadura; 5 g de peptona Bacto¹; 10 g de glucosa; 15 g de agar purificado; agua destilada hasta 1 litro; ajustar el pH a 7,0-7,2 y añadir 5 ml de cicloheximida esterilizada mediante filtros [solución de reserva: 5 g de cicloheximida por 100 ml de etanol puro] tras la esterilización en autoclave). Para las bacterias fastidiosas, podrá utilizarse un tercer medio de cultivo, el SPA (20 g de sacarosa; 5 g de peptona Bacto¹; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄·7H₂O; 15 g de agar purificado; agua destilada hasta 1 litro; pH 7,2-7,4) (Hayward, 1960). Se recomienda utilizar agar purificado (Oxoid¹ o Difco¹) para todos los medios de cultivo, ya que las impurezas de otros tipos de agar comerciales pueden inhibir el crecimiento de *X. fragariae*.

3.5.1 Método 1 de aislamiento

Para plantas sintomáticas, se seleccionan hojas con lesiones en fase inicial y se desinfecta la superficie de las mismas con etanol al 70 %. El aislamiento se debería realizar a partir de lesiones en fase inicial de aspecto húmedo o a partir de los márgenes de lesiones más viejas mediante la escisión de una pequeña porción de tejido (0,5-1,0 cm²) con un bisturí estéril y afilado.

Se homogeneiza el tejido en unos pocos mililitros de agua destilada estéril o PBS y se incuba a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 10-15 minutos. Se siembran alícuotas (50-100 µl) de los macerados de tejido lesionado, así como de las diluciones (1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000) en la superficie de los medios de cultivo Wilbrink-N, YPGA y/o SPA. Con vistas a comprobar la calidad de los medios y comparar las características de cultivo de las colonias bacterianas que crezcan en ellos, también se deberían sembrar alícuotas similares de las suspensiones de células de *X. fragariae* (10⁴, 10⁵ y 10⁶ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml). Se incuban las placas a 25-27 °C durante siete días y se marcan las colonias que aparezcan a los dos o tres días, ya que no serán de *X. fragariae*. Se realizan las lecturas definitivas tras siete a diez días de incubación a 25-27 °C.

Inicialmente, las colonias de *X. fragariae* en el medio de Wilbrink-N son blanquecinas y, al cabo de cuatro a seis días, se tornan de color amarillo claro y adoptan un aspecto circular, ligeramente convexo, liso y mucoide. En los medios de cultivo YPGA y SPA, la morfología de las colonias es similar a la de las que crecen en el medio Wilbrink-N, salvo que son de un color amarillo más intenso.

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 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 distintos laboratorios, siempre que estén adecuadamente validadas.

3.5.2 Método 2 de aislamiento

Se cortan fragmentos de tejido foliar que presenten lesiones angulares de aspecto húmedo características y se lavan en 50 ml de agua de grifo y unas gotas de Tween 20. Los fragmentos de hojas se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se enjuagan en agua destilada y se secan con papel absorbente. La superficie de los fragmentos de hojas puede desinfectarse en etanol al 70 % durante 5 s y secarse con papel absorbente. Los fragmentos se cortan en trozos más pequeños (1-4 mm²) y se introducen en 5 ml de PBS 0,1 M. Se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos para que *X. fragariae* se transfiera al sobrenadante. Se prepara una dilución 1:100 del sobrenadante en PBS 0,1 M y se añaden alícuotas de 20 µl de la muestra sin diluir y de la dilución 1:100 a distintos pocillos de un portaobjetos excavado. Se fijan las células bacterianas al portaobjetos mediante flameado para proceder posteriormente al análisis por inmunofluorescencia (Sección 3.8). Se colocan 200 µl de sobrenadante sin diluir en un microtubo para el posterior análisis mediante PCR (Sección 3.9) y 1 ml de sobrenadante sin diluir en un segundo microtubo, se añade glicerol para obtener una concentración final de al menos 20 % y se almacenan las soluciones entre -20 y -80 °C con fines de referencia. El resto del sobrenadante puede utilizarse para el aislamiento mediante la siembra de la dilución descrita anteriormente y para la inoculación de hojas de fresa desprendidas (Sección 3.6).

Además de los métodos de aislamiento 1 y 2 descritos anteriormente, el aislamiento de *X. fragariae* a partir de tejido se podrá realizar sembrando directamente alícuotas de exudado fresco procedente de lesiones en los medios de cultivo Wilbrink-N, YPGA, SPA u otros medios de uso común.

3.5.3 Interpretación de los resultados del aislamiento

El aislamiento es negativo si transcurridos siete días no se observan colonias bacterianas con la morfología característica de las colonias de *X. fragariae* en ninguno de los tres medios de cultivo (siempre que el crecimiento no se haya visto inhibido debido a competencia o antagonismo), mientras que en los controles positivos sí se encuentran colonias típicas de *X. fragariae*.

El aislamiento es positivo si se han aislado presuntas colonias de *X. fragariae* en al menos uno de los medios de cultivo empleados.

Teniendo en cuenta que el aislamiento de esta bacteria falla con frecuencia, si las pruebas de ELISA, de inmunofluorescencia y de PCR son positivas, la muestra debería considerarse presuntamente positiva para *X. fragariae*, en espera de la identificación definitiva (Sección 4). Cabe esperar que los mejores resultados de aislamiento se obtengan utilizando extractos de lesiones jóvenes preparados al momento. El

aislamiento en medios de cultivo también puede llevarse a cabo mediante enriquecimiento *in planta*, como se describe en la Sección 3.6.

3.6 Ensayo con hojas desprendidas y enriquecimiento biológico

3.6.1 Ensayo con hojas desprendidas

Las preparaciones de las muestras de tejido (Sección 3.3) pueden emplearse para inocular hojas desprendidas de fresa tan pronto como estén preparadas en tampón de extracción o agua destilada (Civerolo *et al.*, 1997a). Se utilizan hojas jóvenes (de entre 7 y 14 días) de plantas de un cultivar susceptible a *X. fragariae* (p. ej., Camarosa, Pájaro, Seascape, Selva o Korona) que se hayan cultivado en invernadero y que estén libres de *X. fragariae*. La calidad de las hojas y su edad son consideraciones esenciales para que la prueba dé buenos resultados.

Se cortan asépticamente tres hojas (cada una con tres folíolos) de plantas cultivadas en invernadero y se elimina la porción basal de los pecíolos, los cuales se introducirán inmediatamente en tubos de cristal con agua estéril.

Como control positivo se prepara una suspensión de células de una cepa de referencia de *X. fragariae* (Cuadro 3) con una concentración de 10^5 - 10^6 ufc/ml en PBS o agua destilada. Como control negativo se utiliza PBS o agua destilada. Se hacen infiltraciones en cuatro puntos de la superficie abaxial de cada folíolo (dos a cada lado de la nervadura principal) utilizando una jeringuilla sin aguja (3 cc, de plástico desechable, BD¹, orificio de 2 mm).

Se enjuaga el exceso de inóculo con agua estéril 1 hora después de la inoculación. Se colocan las hojas con sus pecíolos en los tubos en una cámara húmeda (humedad relativa 95-100 %) y se incuban a 18-20 °C con un fotoperíodo de 12 horas durante 21 días. La temperatura e iluminación especificadas durante la incubación son esenciales para evitar resultados que sean falsos negativos. Las hojas inoculadas no deberían presentar lesiones visibles y el aspecto húmedo provocado por la infiltración del inóculo debería desaparecer al cabo de 24 horas.

Unos pocos días después de la inoculación, comienzan a aparecer síntomas específicos (lesiones angulares oscuras y de aspecto húmedo) similares a los observados en las hojas infectadas de forma natural. Los síntomas se registran cada dos días durante 14-21 días.

3.6.2 Interpretación de los resultados del ensayo con hojas desprendidas

El análisis con hojas desprendidas es negativo si transcurridos 21 días no aparecen en las hojas las manchas angulares típicas de *X. fragariae* (de aspecto oscuro y húmedo si se observan con luz reflejada; de color amarillo translúcido si se observan con luz transmitida) ni se observan halos cloróticos en

ninguno de los puntos inoculados. En los puntos en los que se hayan infiltrado los controles negativos no deberían aparecer manchas de aspecto húmedo que presenten color amarillo translúcido si se observan con luz transmitida (Civerolo *et al.*, 1997a).

El ensayo con hojas desprendidas es positivo si, transcurridos entre 10 y 21 días, aparecen en ellas las manchas angulares típicas de *X. fragariae* (de aspecto oscuro y húmedo si se observan con luz reflejada; de color amarillo translúcido si se observan con luz transmitida) en los puntos de inoculación. Estas manchas deberían tener un aspecto similar al de las que aparezcan en los puntos en los que se hayan infiltrado las suspensiones de control positivo. En los puntos en los que se hayan infiltrado los controles negativos no deberían aparecer manchas de aspecto húmedo que presenten color amarillo translúcido si se observan con luz transmitida (Civerolo *et al.*, 1997a).

3.6.3 Aislamiento mediante enriquecimiento *in planta*

Para el aislamiento en medios nutritivos se selecciona una hoja por muestra de las que se hayan inoculado en el ensayo con hojas desprendidas una vez transcurridas 48 horas desde la inoculación. Por cada hoja desprendida inoculada, se cortan 10-12 pequeños discos de 0,5 cm de diámetro de cada punto inoculado y se muelen en 4,5 ml de PBS. Se preparan diluciones como si se tratara de un aislamiento directo (Sección 3.5) en PBS y se siembran 50 µl de cada dilución en la superficie del medio de Wilbrink-N por triplicado. Se incuban las placas a 25-27 °C y se comprueba la presencia de colonias parecidas a las de *X. fragariae* al cabo de entre cinco y siete días.

3.6.4 PCR con enriquecimiento *in vitro* a partir del ensayo con hojas desprendidas

Se utilizan las placas con medio de cultivo Wilbrink-N sembradas con extractos preparados para el aislamiento posterior al enriquecimiento *in planta* descrito en la Sección 3.6.3 después de haberlas incubado a 25-27 °C durante cuatro días. Se lava la superficie del medio con 3-5 ml de PBS para arrastrar las colonias bacterianas, que se utilizarán en el análisis de la PCR (Sección 3.9). Esta es una modificación de la PCR con bioenriquecimiento descrita por Schaad *et al.* (1995).

3.7 ELISA

Se ha validado la especificidad del ELISA con dos sueros con anticuerpos policlonales contra *X. fragariae* disponibles comercialmente (López *et al.*, 2005). Rowhani *et al.* (1994) mostraron que el ELISA que utiliza anticuerpos policlonales podía detectar de forma específica 34 cepas de *X. fragariae* y que los anticuerpos no presentaban reacciones cruzadas con otros patovares estrechamente relacionados ni con otras bacterias aisladas a partir de plantas de fresa. Se ha informado que la sensibilidad de la prueba del ELISA para detectar *X. fragariae* es de 10⁵ ufc/ml (Rowhani *et al.*, 1994; Civerolo *et al.*, 1997b).

En cada placa de micropocillos, se utilizan suspensiones de células preparadas a partir de cultivos puros de *X. fragariae* y de una cepa que no sea de *X. fragariae*, respectivamente, como controles positivos y negativos. Se recomienda determinar la dilución de trabajo apropiada de cada antisuero policlonal.

3.7.1 ELISA indirecto

Se mezclan 210 µl de cada muestra de la prueba, de la suspensión positiva de *X. fragariae* (aproximadamente 10⁹ ufc/ml), de la suspensión negativa de una cepa que no sea de *X. fragariae* (aproximadamente 10⁹ ufc/ml) y del control negativo (suspensión de material sano de fresas, véase a continuación) con 210 µl de tampón de recubrimiento (1,59 g de Na₂CO₃; 2,93 g de NaHCO₃; agua destilada hasta 1 litro). Se añaden 200 µl de cada mezcla a dos pocillos de una placa de micropocillos (PolySorp [Nunc¹] o equivalente). Para el control negativo de material vegetal, se muele aproximadamente 0,1 g de hojas, peciolo o coronas de fresa sanos en 0,9 ml de PBS y se añaden 0,9 ml de tampón de recubrimiento.

Se incuba la placa a 4 °C durante una noche. Se lava la placa tres veces con PBS que contenga 0,05 % de Tween 20 (PBS-T) (8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 0,2 g de Na₂HPO₄·12H₂O; 2,9 g de KH₂PO₄; 500 µl de Tween 20, agua destilada hasta 1 litro). Tras el lavado, se añaden 200 µl de tampón de bloqueo (PBS con un 1 % de seroalbúmina bovina [BSA] o leche desnatada en polvo) a cada uno de los pocillos de la prueba y se incuban a 37 °C durante 1 hora. Se lava la placa tres veces con PBS-T.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepara la dilución de trabajo apropiada del suero con anticuerpos contra *X. fragariae* en PBS y se añaden 200 µl a cada pocillo de la prueba. Se incuba la placa a 37 °C durante 2 horas y posteriormente se lava tres veces con PBS-T. Se añaden a cada pocillo 200 µl del conjugado enzima-anticuerpo a la dilución apropiada en PBS que contenga 0,2 % de BSA. Se incuba la placa a 37 °C durante 1 hora y posteriormente se lava cuatro veces con PBS-T. Se añaden a cada pocillo de la prueba 200 µl de sustrato recién preparado (1 mg de p-nitrofenilfosfato/ml de tampón sustrato, pH 9,8). Se incuban a temperatura ambiente y a oscuras durante 15, 30 y 60 minutos, y se lee la absorbancia a 405 nm.

3.7.2 DAS-ELISA

Para realizar un ELISA en fase doble de anticuerpos (DAS-ELISA), se añaden 200 µl de una dilución apropiada de suero con anticuerpos de *X. fragariae* en el tampón de recubrimiento a cada pocillo de dos placas de micropocillos (PolySorp [Nunc¹] o equivalente). Se incuban a 37 °C durante 4 horas y se lavan los pocillos tres veces con PBS-T. Se añaden 200 µl de cada muestra de tejido macerado y de un control positivo y uno negativo, según se describe respecto del ELISA indirecto (Sección 3.7.1), a dos pocillos de

cada placa y se incuban a 4 °C durante una noche. Tras lavar las placas tres veces con PBS-T, se añaden 200 µl de una dilución apropiada del conjugado enzima-anticuerpo en PBS que contenga un 0,2 % de BSA en cada pocillo. Se incuba a 37 °C durante 3 horas. Tras lavar las placas cuatro veces con PBS-T, se añaden 200 µl de sustrato recién preparado (1 mg de p-nitrofenilfosfato/ml de tampón de sustrato, pH 9,8) a cada pocillo de la prueba. Se incuban a temperatura ambiente y a oscuras durante 15, 30 y 60 minutos, y se lee la absorbancia a 405 nm.

3.7.3 Interpretación de los resultados del ELISA

El ELISA es negativo si el promedio de las lecturas de absorbancia de los pocillos duplicados que contienen el macerado de tejido es $< 2 \times$ el promedio de las lecturas de absorbancia de los pocillos de control negativo que contienen macerado de tejido de fresa sano.

El ELISA es positivo si 1) el promedio de las lecturas de absorbancia de los pocillos duplicados que contienen la muestra es $> 2 \times$ el promedio de las lecturas de absorbancia de los pocillos de control negativo que contienen macerado de tejido de fresa sano; y 2) el promedio de las lecturas de absorbancia de los pocillos de control positivo es $> 2 \times$ el promedio de las lecturas de absorbancia de los pocillos de control negativo.

Si los pocillos de control positivo dan negativo para ELISA, quiere decir que la prueba no se ha realizado correctamente o que los reactivos se han degradado o han caducado.

Si los pocillos de control negativo dan resultados positivos, significa que se ha producido una contaminación cruzada o una unión inespecífica de los anticuerpos. La prueba debería repetirse con tejido fresco o debería realizarse otra prueba basada en un principio diferente.

3.8 Inmunofluorescencia

Los procedimientos de inmunofluorescencia para identificar bacterias fitopatógenas se encuentran en De Boer (1990) y EPPO (2009). Se han validado tres sueros con anticuerpos policlonales contra *X. fragariae* disponibles comercialmente (Cuadro 1) utilizando inmunoglobulinas anti-conejo conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (López *et al.*, 2005). La inmunofluorescencia con estos anticuerpos permite detectar 10^3 - 10^4 ufc/ml de *X. fragariae* en tejido de fresa (Calzolari y Mazzucchi, 1989).

Las muestras de la prueba son diluciones de macerados de tejidos (1:10, 1:100 y 1:1000) y suspensiones (10^6 ufc/ml) de células de una cepa positiva de *X. fragariae* y una cepa negativa que no sea de *X. fragariae* en PBS o agua destilada. Los controles negativos deberían ser extractos de tejido vegetal sano.

Se añaden alícuotas (20 µl) de las muestras de la prueba y las suspensiones de control positivo y negativo a distintos pocillos de un portaobjetos excavado. Se secan las preparaciones al aire y se fijan mediante flameado, o remojando los portaobjetos en acetona durante 10 minutos y secándolos después al aire. Los portaobjetos se pueden almacenar a -20 °C por el tiempo necesario. Se diluye el anticuerpo primario de *X. fragariae* en PBS que contenga un 10 % de leche desnatada en polvo. Se selecciona la menor concentración de anticuerpos que proporcione una buena tinción cuando haya como máximo 100 células positivas por campo del microscopio. Es aconsejable utilizar dos diluciones del anticuerpo para detectar reacciones cruzadas con otras bacterias. Se introducen 20 µl del anticuerpo primario en cada pocillo y se incuban los portaobjetos en una cámara húmeda a temperatura ambiente o a 37 °C durante 30-60 minutos. Se enjuagan los portaobjetos con PBS y se lavan sumergiéndolos en el mismo tampón durante 10 minutos. Se diluye el anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína en PBS (las diluciones óptimas suelen situarse entre 1:20 y 1:200). Se cubren los pocillos de los portaobjetos con el anticuerpo secundario y se incuban en una cámara húmeda a temperatura ambiente o a 37 °C durante 30-60 minutos. Se repite el paso de lavado y posterior secado al aire de los portaobjetos. Se montan los cubreobjetos sobre los portaobjetos con fluido de montaje (90 ml de glicerol y 10 ml de PBS) que contenga 1 mg de ρ-fenilendiamina/ml y se observan los portaobjetos con una gota de aceite de inmersión a 500-1 000 aumentos. Se cuentan las células que presenten fluorescencia y tengan un tamaño parecido al de las células de la cepa de referencia de *X. fragariae* (López *et al.*, 2005).

3.8.1 Interpretación de los resultados de la inmunofluorescencia

La prueba de inmunofluorescencia es negativa si se observan células de color verde fluorescente con la morfología característica de *X. fragariae* en los pocillos de control positivo, pero no en los de la muestra de la prueba ni en los de control negativo.

La prueba de inmunofluorescencia es positiva si se observan células de color verde fluorescente con la morfología característica de *X. fragariae* en los pocillos de control positivo y en los de la muestra de la prueba, pero no en los de control negativo.

Como se considera que el límite, para que una detección mediante inmunofluorescencia sea fiable, es de 10^3 células/ml, se entenderá que las muestras con una concentración superior a esta cifra son positivas (De Boer, 1990). La prueba de inmunofluorescencia podrá considerarse no concluyente para muestras con $< 10^3$ células/ml. En este caso, deberían realizarse más pruebas o bien tomarse nuevas muestras. Las muestras con una gran cantidad de células que no sean fluorescentes o lo sean de forma débil en comparación con el control positivo deberán volver a someterse a la prueba con diferentes diluciones de anticuerpos u otra fuente de anticuerpos.

Cuadro 1. Anticuerpos policlonales de *Xanthomonas fragariae* que actualmente se recomienda utilizar en pruebas serológicas.

| Fuente | Usos recomendados† |
|---|--|
| Neogen Europe ¹ | Detección mediante inmunofluorescencia o ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos |
| Plant Research International, Wageningen UR | Detección mediante inmunofluorescencia |
| Bioreba AG ¹ | Detección mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos |

† Validado en un estudio de desempeño de las pruebas en un proyecto financiado por la Unión Europea (SMT-4-CT98-2252) (López *et al.*, 2005).

3.9 PCR

Los métodos de PCR descritos en el presente protocolo de diagnóstico, a excepción de la PCR anidada elaborada por Zimmerman *et al.* (2004), han sido validados en un estudio de desempeño de las pruebas financiado por la Unión Europea (SMT-4-CT98-2252) (López *et al.*, 2005). Se ha observado que los protocolos de la PCR anidada aumentan la sensibilidad hasta 100 veces en comparación con los protocolos de PCR convencional (Roberts *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 2004).

Se han validado los protocolos de PCR y de extracción de ADN de muestras vegetales descritos en Pooler *et al.* (1996) y en Hartung y Pooler (1997) (López *et al.*, 2005). Un protocolo modificado que utiliza el kit de PCR para tejidos vegetales REExtract-N-Amp (Sigma¹) también ha resultado apropiado para la extracción de ADN antes de la amplificación al analizar una gran cantidad de muestras extraídas de hojas asintomáticas (Stöger y Ruppitsch, 2004). Existen otros kits comerciales para extraer ADN y para realizar la PCR anidada y la PCR con otros cebadores (Roberts *et al.*, 1996); no obstante, aún no han sido validados (López *et al.*, 2005).

Se han descrito dos pruebas de PCR en tiempo real sensibles para la detección de *X. fragariae* en tejido de fresa (Weller *et al.*, 2007; Vandroemme *et al.*, 2008). La creada por Weller *et al.* (2007) también diferenciará entre *X. fragariae* y *X. arboricola* pv. *fragariae*. Esta prueba utiliza cebadores diseñados dentro de las regiones del gen *gyrB*, que es exclusivo de *X. fragariae*, y del gen *pep*, que lo es de *X. arboricola* pv. *fragariae*. La PCR en tiempo real creada por Vandroemme *et al.* (2008), que da lugar a un amplicón de 41 pares de bases (pb), utiliza cebadores diseñados a partir del amplicón de 550 pb generado con la PCR descrita por Pooler *et al.* (1996). Estos métodos son potencialmente útiles para detectar bajos niveles de *X. fragariae* en infecciones asintomáticas o latentes.

3.9.1 Extracción de ADN

El kit DNeasy Plant Mini (Qiagen¹), modificado para la extracción de ADN de organismos micoplásmicos (López *et al.*, 2005), proporcionó los mejores resultados en la prueba interlaboratorios financiada por la Unión Europea (SMT-4-CT98-2252).

Para la extracción de ADN se utilizan 250 µl de macerado de muestra de tejido, material sano de fresa preparado de forma parecida y PBS estéril o agua ultrapura como controles negativos, y una suspensión de un cultivo puro de *X. fragariae* como control positivo. Se añaden 250 µl de tampón de extracción de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (50 ml de Tris-HCl 1 M; 50 ml de ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 5 M; 40,9 g de NaCl; 5 g de polivinilpirrolidona [PVP]-40; 12,5 g de bromuro de cetiltrimetilamonio; agua destilada hasta 500 ml) y 4 µl de ARNasa (100 mg/ml). Se mezcla mediante inversión suave cinco veces y se incuba 10 minutos a 65 °C con mezclado ocasional mediante inversión. A continuación, se siguen las instrucciones del fabricante hasta el paso de elución del ADN.

Para eluir el ADN, se añaden 100 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 9 (precalentado a 65 °C) a la columna y se centrifuga a $\geq 6\ 000$ g durante 1 minuto. Se añaden otros 100 µl de Tris-HCl y se repite la centrifugación. Se ajusta la solución de ADN a un volumen total de 300 µl con tampón Tris-EDTA (TE) y se añaden 200 µl de acetato de amonio 5 M y 1 ml de etanol puro. Se mezcla bien y se incuba a -20 °C entre 1 h y toda una noche. Tras la incubación, se centrifuga a 17 000 g durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante, se lava el sedimento de ADN en 1 ml de etanol puro y se centrifuga a 16 000 g durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante, se lava el sedimento de ADN en 500 µl de etanol al 80 % y se centrifuga a 16 000 g durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante. Una vez secado el sedimento, se vuelve a suspender en 50 µl de agua destilada estéril.

3.9.2 PCR múltiple

3.9.2.1 Protocolo de Hartung y Pooler (1997)

La especificidad de este protocolo se confirmó en un estudio con 30 aislamientos de *X. fragariae*, 36 de *X. campestris* (que representan 19 patovares) y 62 de bacterias epífitas que se aíslan con frecuencia a partir de la fresa. Solo se detectó *X. fragariae* (en todas los aislamientos). Esta PCR múltiple permitió detectar 10^3 ufc/ml en tejido vegetal (Pooler *et al.*, 1996; Hartung y Pooler 1997).

Los tres conjuntos de cebadores descritos por Pooler *et al.* (1996) son:

- 241A: 5'-GCCCCGACGCGAGTTGAATC-3'
- 241B: 5'-GCCCCGACGCGCTACAGACTC-3'

- 245A: 5'-CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3'
- 245B: 5'-CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3'
- 295A: 5'-CGTTCCTGGCCGATTAATAG-3'
- 295B: 5'-CGCGTTCCTGCGTTTTTTT CG-3'

La PCR se efectúa en 25 µl de mezclas de reacción que contienen 2,5 µl de tampón (PerkinElmer¹) (que contiene 15 nM de MgCl₂); 5,0 µl de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) 1 mM; 2,0 µl de cada uno de los seis cebadores (0,4 µM); 0,5 µl de ADN polimerasa Taq; y 5,0 µl de muestra de ADN. Los parámetros de los ciclos consisten en una fase inicial de activación de 95 °C durante 15 minutos; 35 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 57 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto; y un paso final de extensión de 72 °C durante 7 minutos. Los productos de la PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en 0,5× de tampón de Tris-acetato-EDTA (TAE) (EPPO, 2006).

Los amplicones específicos de *X. fragariae* resultantes de la PCR están constituidos por 300, 550 y 615 pb, según lo descrito anteriormente (Pooler *et al.*, 1996; Hartung y Pooler, 1997). Generalmente, la banda de 300 pb está presente cuando los extractos proceden de plantas infectadas con *X. fragariae*, pero ocasionalmente podrán aparecer las otras bandas (550 y 650 pb).

Los cebadores 245A y 245B pueden emplearse en una PCR convencional, utilizando el procedimiento descrito anteriormente, y producirán un amplicón de 300 pb.

3.9.3 PCR anidada

La PCR anidada descrita por Moltmann y Zimmerman (2005) que utiliza los cebadores diseñados por Pooler *et al.* (1996) y Zimmerman *et al.* (2004) se recomienda para diagnosticar la presencia de *X. fragariae* en plantas de fresa sintomáticas, así como para analizar plantas de fresa asintomáticas (plantas frigo y frescas). La PCR anidada descrita por Roberts *et al.* (1996) ofrece un método alternativo de confirmación.

3.9.3.1 Protocolo de Moltmann y Zimmerman (2005)

La especificidad de este protocolo se confirmó en un estudio con 14 aislamientos de *X. fragariae*, 30 de *X. campestris* (que representan 14 patovares) y 17 de bacterias sin identificar asociadas con las hojas de fresa. Asimismo, la especificidad del conjunto de cebadores externos fue comprobada por Hartung y Pooler (1997) (Sección 3.9.2.1). No se observaron reacciones cruzadas con los aislamientos analizadas. Esta PCR se ha utilizado con buenos resultados para analizar muestras tomadas durante un estudio de plantas de fresa y plantas importadas (Moltmann y Zimmerman, 2005). Ello permitió detectar 200 fg de ADN por reacción y fue 100 veces más sensible que la PCR convencional (Zimmerman *et al.*, 2004).

Se incuba tejido de las hojas, los pecíolos y la corona (30-70 g) en 10-20 ml de tampón de fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,2) por gramo de tejido a temperatura ambiente durante una noche. Se extrae el ADN y se analiza mediante la PCR simple y la anidada descrita por Zimmerman *et al.* (2004).

Los cebadores son:

- 245A: 5'-CGCGTGCCAGTGGAGATCC-3'
- 245B: 5'-CGCGTGCCAGAACTAGCAG-3'
- 245.5: 5'-GGTCCAGTGGAGATCCTGTG-3'
- 245.267: 5'-GTTTTTCGTTACGCTGAGTACTG-3'

La PCR se efectúa en 25 µl de mezclas de reacción que contienen tampón de PCR (10 mM de Tris-HCl; 50 mM de KCl; Nonidet P-40 al 0,08 %; 2,5 mM de MgCl₂); 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada cebador; y 0,5 µl de ADN polimerasa Taq. Los parámetros de los ciclos consisten en una fase inicial de desnaturalización a 94 °C durante 4 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 68 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto; y una fase final de extensión de 72 °C durante 7 minutos. Para la PCR anidada, tras la amplificación del ADN con los cebadores de la primera ronda (245A y 245B), se utiliza 1 µl del producto de la primera PCR como molde en una segunda PCR con los cebadores internos 245.5 y 245.267. Se utilizan los mismos parámetros de los ciclos, con la salvedad de que la temperatura de hibridación es de 62 °C para los cebadores internos 245.5 y 245.267. Los productos de la PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % en 0,5× de tampón TAE.

Los amplicones específicos de *X. fragariae* resultantes de la PCR están constituidos por 300 pb en la primera ronda de PCR utilizando los cebadores 245A y 245B, y por 286 pb en la PCR anidada utilizando los cebadores internos 245.5 y 245.267. Con elevadas concentraciones del molde, a veces es posible amplificar un segundo fragmento de aproximadamente 650 pb.

3.9.3.2 Protocolo de Roberts *et al.* (1996)

La especificidad de este protocolo se confirmó en un estudio con 30 aislamientos de *X. fragariae*, 17 de *X. campestris* (que representan 16 patovares) y nueve de *Xanthomonas* spp. no patógenas aisladas a partir de la fresa. No se observaron reacciones cruzadas con los aislamientos analizados. Esta PCR anidada permitió detectar aproximadamente 18 células de *X. fragariae* en el tejido vegetal (Roberts *et al.*, 1996).

Los cebadores utilizados en la PCR semianidada descritos por Roberts *et al.* (1996) son:

- XF9: 5'-TGGGCCATGCCGGTGGAACTGTGTGG-3'
- XF11: 5'-TACCCAGCCGTCGCAGACGACCGG-3'

- XF12: 5'-TCCCAGCAACCCAGATCCG-3'

La PCR se efectúa en 25 µl de mezclas de reacción que contienen tampón de PCR (10 mM de Tris-HCl; 50 mM de KCl; 1,5 mM de MgCl₂); 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada cebador; y 0,5 µl de polimerasa de ADN Taq. Los parámetros de los ciclos consisten en una fase inicial de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos; 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 45 segundos; y una fase final de extensión de 72 °C durante 5 minutos. Para la PCR semianidada, tras la amplificación del ADN con los cebadores de la primera ronda (XF9 y XF11), se utilizan 3 µl del producto de la primera PCR como molde en una segunda PCR con los cebadores XF9 y XF12. Los ciclos se realizan siguiendo los mismos parámetros que se han descrito para la primera ronda, salvo que la temperatura de hibridación es de 58 °C. Los productos de la PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en 0,5× de tampón TAE.

Los amplicones específicos de *X. fragariae* resultantes de la PCR están constituidos por 537 pb en la primera ronda de PCR con los cebadores XF9 y XF11, y por 458 pb en la PCR semianidada con los cebadores XF9 y XF12.

3.9.4 PCR en tiempo real

3.9.4.1 Protocolo de Weller *et al.* (2007)

La especificidad de este protocolo se confirmó en un estudio con 10 aislamientos de *X. fragariae* y 24 de *Xanthomonas* (que representan 12 especies y 17 patovares). Solo se detectó *X. fragariae* (en todos los aislamientos). Esta PCR en tiempo real permitió detectar 10³ ufc por disco foliar (Weller *et al.*, 2007). Este protocolo ha sido validado de nuevo por un laboratorio en los Países Bajos; los datos de la validación se pueden consultar en la base de datos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP, EPPO por sus siglas en inglés) sobre conocimientos diagnósticos (<http://dc.eppo.int/validationlist.php>).

Los cebadores, basados en secuencias del gen *gyrB*, y la sonda TaqMan, marcada con enlaces covalentes en el extremo 5' con el colorante indicador JOE y en el extremo 3' con el colorante inhibidor TAMRA, son:

- Xf gyrB-F: 5'-CCG CAG CGA CGC TGA TC-3'
- Xf gyrB-R: 5'-ACG CCC ATT GGC AAC ACT TGA-3'
- Xf gyrB-P: 5'-TCC GCA GGC ACA TGG GCG AAG AAT TC-3'

La PCR se efectúa añadiendo 4 µl de ADN molde a la mezcla de reacción que contiene 1× tampón TaqMan A (Applied Biosystems¹); 5,5 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP (Promega¹); 300 nM de cada

cebador; 100 nM de sonda; y 0,63 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems¹). Los parámetros de los ciclos consisten en una fase inicial de activación de 2 minutos a 50 °C y posteriormente 15 minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

3.9.5 Interpretación de los resultados de la PCR

3.9.5.1 PCR convencional

La prueba de la PCR es negativa si no se detecta ninguno de los amplicones específicos de *X. fragariae* del tamaño esperado en las muestras ni en los controles negativos, pero sí en todos los controles positivos.

La prueba de la PCR es positiva si se detecta al menos uno de los amplicones específicos de *X. fragariae* del tamaño esperado, siempre que no se haya amplificado a partir de ninguno de los controles negativos.

Podrá sospecharse una inhibición de la PCR si se obtiene el amplicón esperado a partir del control positivo que contiene *X. fragariae* en agua, pero son negativos los resultados obtenidos en los controles positivos con *X. fragariae* en extracto vegetal. Se recomienda repetir la PCR con diluciones 1:10, 1:100 y 1:1 000 del extracto o repetir la extracción de ADN.

3.9.5.2 PCR en tiempo real

La prueba de la PCR en tiempo real solo se considerará válida si:

- el control positivo produce una curva de amplificación con los cebadores específicos del patógeno;
- 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 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. El hecho de que las muestras no produzcan una curva de amplificación con los cebadores de control interno sugiere, por ejemplo, que la extracción del ADN ha fallado, que no se ha incluido el ADN en la mezcla de la reacción, que había presencia de compuestos inhibidores de la PCR en el extracto de ADN o que el ácido nucleico se ha degradado.

Una muestra se considerará positiva si produce una curva de amplificación típica. Debe verificarse el umbral de ciclo (Ct) en cada laboratorio cuando la prueba se realice por primera vez.

3.9.6 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fiable el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácido nucleico y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo o el ácido nucleico objetivo se deberían tener en

cuenta los 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).

Los controles positivos deberían prepararse en un área diferente de la que se emplee para analizar las muestras.

Control positivo de ácido nucleico. Este control se utiliza para hacer un seguimiento de la eficiencia de la amplificación mediante PCR. Se podrán utilizar el ácido nucleico previamente preparado (almacenado), el ADN del genoma completo o un control sintético (p. ej., un producto de PCR clonado). Para este protocolo, se recomienda utilizar un cultivo puro de células de *X. fragariae* (10^4 - 10^6 ufc/ml) como control positivo de ácido nucleico.

Control interno. Para la PCR convencional y en tiempo real, debería incorporarse al protocolo un gen de mantenimiento vegetal, por ejemplo el COX (Weller *et al.*, 2000), ADN ribosómico (ADNr) 16S (Weisberg *et al.*, 1991) o GADPH (Mafra *et al.*, 2012), a fin de descartar la posibilidad de falsos negativos de la PCR 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. En la fase de amplificación, se añade el agua de calidad apta para PCR que se utilizó para preparar la mezcla de reacción o bien PBS estéril..

Control positivo de extracción. Este control se utiliza para asegurar que el ácido nucleico diana 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 de la diana cercana a la considerada como límite de detección del protocolo.

El control positivo debería ser aproximadamente una décima parte de la cantidad de tejido foliar utilizada por planta para la extracción de ADN. Para este protocolo, se recomienda utilizar macerados de tejido infectado por *X. fragariae* enriquecidos con 10^6 ufc/ml de una cepa de referencia de *X. fragariae* como controles positivos de extracción.

Para la PCR, deben adoptarse precauciones a fin de evitar la contaminación cruzada por aerosoles procedentes del control positivo o de las muestras positivas (especialmente en el caso de la PCR anidada). De ser necesario, 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 de la PCR 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 controlar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico o la reacción cruzada con el tejido hospedante. El control está constituido por ácido nucleico que se extrae de tejido no infectado del hospedante y que posteriormente se amplifica, o por un extracto de muestra de tejido macerado que previamente había resultado negativo para la presencia de *X. fragariae*. Cuando se analicen muchas muestras positivas se recomienda utilizar varios controles.

4. Identificación

Los requisitos mínimos para la identificación son el aislamiento de la bacteria y la obtención de un resultado positivo con cada una de las tres técnicas de detección siguientes: 1) ELISA indirecto, DAS-ELISA (Sección 3.7) o inmunofluorescencia (Sección 3.8) utilizando anticuerpos policlonales; 2) PCR (Sección 3.9); y 3) pruebas de patogenicidad mediante la inoculación de plantas de fresa hospedantes para cumplir los requisitos de los postulados de Koch (Secciones 4.4 y 3.6). Se podrán efectuar pruebas adicionales (Sección 4) para caracterizar más detalladamente la cepa presente. Todas las pruebas deben incluir controles negativos y positivos.

En el caso de infecciones latentes o plantas asintomáticas, tras una prueba inicial de detección se debería aislar al patógeno y confirmar su identidad, incluso mediante pruebas de patogenicidad con el cultivo puro y el cumplimiento de los postulados de Koch.

4.1 Pruebas bioquímicas y fisiológicas

X. fragariae tiene las características de cultivo comunes a todas las *Xanthomonas* spp. Las células son bacilos gramnegativos aeróbicos y con un solo flagelo polar. No reducen los nitratos, dan positivo para la prueba de la catalasa y no utilizan la asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno (Bradbury, 1977; Bradbury, 1984; Schaad *et al.*, 2001). La producción de ácidos a partir de carbohidratos es débil. Las colonias tienen un aspecto mucoso, convexo y brillante en los medios YPGA y Wilbrink-N (Dye, 1962; van den Mooter y Swings 1990; Swings *et al.*, 1993; Schaad *et al.*, 2001). Las especies de *Xanthomonas* se diferencian fácilmente de las de otros géneros de bacterias baciliformes, gramnegativas y aeróbicas y otras bacterias pigmentadas de amarillo por las características que se muestran en el Cuadro 2, descritas por Schaad *et al.* (2001).

Cuadro 2. Características fenotípicas para diferenciar *Xanthomonas* de *Pseudomonas* y de las bacterias pigmentadas de amarillo *Flavobacterium* y *Pantoea* (Schaad *et al.*, 2001).

| Característica | <i>Xanthomonas</i> | <i>Pseudomonas</i> | <i>Flavobacterium</i> | <i>Pantoea</i> |
|---|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------|
| Flagelación | 1, polar | > 1, polar | Sin flagelos | Peritrica |
| Xantomonadina | Sí | No | No | No |
| Fluorescencia | No | Variable | No | No |
| Levano a partir de sacarosa | Sí | Variable | No | No |
| H ₂ S a partir de cisteína | Sí | No | No | No |
| Oxidasa | Negativo o débil | Variable | Positivo | Negativo |
| Fermentación | No | No | No | Sí |
| Crecimiento en cloruro de trifeniltetrazolio al 0,1 % | No | Sí | Sí | Sí |

Se recomienda el uso de las cepas de referencia de *X. fragariae* disponibles de diferentes colecciones que se presentan en el Cuadro 3 para su uso como controles positivos en pruebas bioquímicas y fisiológicas.

Cuadro 3. Cepas de referencia de *Xanthomonas fragariae*.

| Cepa | Fuente |
|--------------|--|
| ATCC 33239 | American Type Culture Collection, Manassas, Virginia (Estados Unidos). |
| CFBP 2510 | Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA Station Phytobactériologie, Angers (Francia) |
| ICMP 5715 | International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland (Nueva Zelandia) |
| BCCM/LMG 708 | Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms/Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Gante (Bélgica) |
| NCPPB 1469 | National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory, York, United Kingdom; Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen (Países Bajos) |
| NCPPB 1822 | National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory, York, United Kingdom; Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen (Países Bajos) |

En el Cuadro 4 se muestran las características más relevantes o útiles para distinguir *X. fragariae* de otras especies de *Xanthomonas* (Schaad *et al.*, 2001; Janse *et al.*, 2001; EPPO, 2006).

Cuadro 4. Pruebas de diagnóstico para distinguir *Xanthomonas fragariae* del “grupo de *Xanthomonas campestris*” y *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*.

| Prueba | <i>X. fragariae</i> | <i>X. campestris</i> | <i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i> |
|-----------------------------|---------------------|----------------------|--|
| Crecimiento a 35 °C | – | + | SD |
| Crecimiento en NaCl al 2 % | – | + | + |
| Hidrólisis de la esculina | – | + | + |
| Licuefacción de la gelatina | + | V | + |
| Digestión de proteínas | – | + | SD |
| Hidrólisis de almidón | + | V | + |
| Producción de ureasa | – | – | – |
| Ácido de: | | | |
| arabinosa | – | + | SD |
| galactosa | – | + | + |
| trehalosa | – | + | SD |
| celobiosa | – | + | + |

SD, sin determinar; V, reacción variable.

Fuente: Janse *et al.* (2001) y EPPO (2006).

La caracterización bioquímica de cepas aisladas puede realizarse utilizando sistemas comerciales, y la identificación de *X. fragariae* puede obtenerse mediante la determinación del perfil específico utilizando las tiras API 20 NE y API 50 CH (BioMérieux¹) (EPPO, 2006).

Para las tiras API 20 NE¹, se siguen las instrucciones del fabricante y se preparan suspensiones a partir de cultivos de cepas de pruebas y cepas de referencia mantenidas 48 horas en medio Wilbrink-N, con las cuales se inoculan las tiras. Se incuban a 25-26 °C y se leen los resultados a las 48 h y 96 horas. Las lecturas de la actividad enzimática transcurridas 48 horas y de la utilización del sustrato transcurridas 96 horas se comparan con las respectivas lecturas características de *X. fragariae* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Reacciones de *Xanthomonas fragariae* en tiras API 20 NE.

| Prueba | Reacción (tras 48 o 96 h) [†] |
|---|--|
| Fermentación de la glucosa | – |
| Arginina | – |
| Ureasa | – |
| Esculina | + |
| Gelatina | + (débil) |
| P-nitrofenil-β-d-galactopiranosidasa (PNPG) | + |
| Asimilación de: | |
| glucosa | + |
| arabinosa | – |
| manosa | + |
| manitol | – |
| N-acetilglucosamina | + |
| maltosa | – |
| gluconato | – |
| caprato | – |
| adipato | – |
| malato | + |
| citrato | – |
| fenilacetato | – |

[†] Reacciones comunes al 90 % de las cepas analizadas de *X. fragariae* (López *et al.*, 2005).

Para utilizar las tiras API 50 CH¹, se preparan suspensiones de células bacterianas de DO_{600nm} = 1,0 en PBS. Se añade 1 ml de suspensión a 20 ml de medio modificado C (0,5 g de NH₄H₂PO₄; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄; 5 g de NaCl; 1 g de extracto de levadura; 70 ml de azul de bromotimol (0,2 %); agua destilada hasta 1 litro; pH 6,8) (Dye, 1962). Se siguen las instrucciones del fabricante para la inoculación de las tiras, que se incuban a 25 °C en condiciones aerobias. Las lecturas se realizan a los dos, tres y seis días. La utilización de los diferentes carbohidratos es indicada por la presencia de un color amarillo en los pocillos tras el período de incubación (Cuadro 6).

Cuadro 6. Reacciones de *Xanthomonas fragariae* en tiras API 50 CH.

| Prueba† | Reacción (tras seis días) |
|---------------------|------------------------------|
| D-arabinosa | Variable |
| Galactosa | + |
| D-glucosa | + |
| D-fructosa | + |
| D-manosa | + |
| N-acetilglucosamina | + |
| Esculina | + |
| Sacarosa | + |
| Trehalosa | + |
| D-lixosa | + |
| L-fucosa | + |

† El resto de los azúcares de las tiras de prueba API 50 CH no son utilizados por *X. fragariae* (López *et al.*, 2005).

4.1.1 Caracterización de los ésteres metílicos de ácidos grasos

Los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) asociados a las membranas citoplasmática y externa de las bacterias gramnegativas son útiles para la identificación bacteriana (Sasser, 1990). Los ácidos grasos específicos que podrán utilizarse para predecir el género de bacterias grampositivas y gramnegativas se indican en Dickstein *et al.* (2001). La identificación se basa en la comparación de los tipos y las cantidades relativas de ácidos grasos en el perfil de una cepa desconocida con los perfiles de una amplia variedad de cepas contenidas en una base de datos, como la biblioteca TSBA40. A fin de obtener resultados reproducibles, es fundamental que las bacterias crezcan en condiciones uniformes de tiempo, temperatura y medio nutritivo. Las cepas de *X. fragariae* contienen tres ácidos grasos principales: 16:1 ω -7 cis, 15:0 anteiso y 15:0 iso. Si bien algunas cepas de las pruebas muestran una buena correspondencia con el perfil de la biblioteca, otras tienen perfiles de ácidos grasos divergentes que no corresponden bien. En algunos estudios se ha puesto de manifiesto que las cepas de *X. fragariae* presentan una diversidad considerable y que se clasifican en al menos cuatro grupos en función de los ácidos grasos (Roberts *et al.*, 1998). Para determinar los perfiles de los EMAG de *X. fragariae* se recomienda utilizar el método descrito por Roberts *et al.* (1998). Las cepas de la prueba se cultivan en agar de soja Trypticase™ a 24 °C durante 48 horas, se emplea un procedimiento de extracción de ácidos grasos y el extracto se analiza

utilizando el sistema de identificación microbiana Sherlock (MIDI) (Newark, DE, Estados Unidos de América).

4.1.1.1 Interpretación de los resultados del perfil de los EMAG

La prueba de perfiles EMAG es positiva si el perfil de la cepa de la prueba es idéntico al del control positivo o al de las cepas de referencia de *X. fragariae*. El análisis de ácidos grasos puede obtenerse de la empresa MIDI y de la Colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria -NCPBP-) (Fera, York [Reino Unido]). La composición y las cantidades de los EMAG determinantes en *X. fragariae* y *X. arboricola* pv. *fragariae* se encuentran en Janse *et al.* (2001).

4.2 Pruebas serológicas

4.2.1 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia puede emplearse para la identificación de cepas sospechosas de pertenecer a *X. fragariae*. Se prepara una suspensión de aproximadamente 10^6 células/ml en PBS y se aplica el procedimiento de la inmunofluorescencia descrito en la Sección 3.8. En caso de que solo se realicen dos pruebas de identificación para obtener un diagnóstico rápido, no se utilizará ninguna otra prueba serológica además de esta.

4.2.2 ELISA

Se pueden emplear el ELISA indirecto o el DAS-ELISA (descritos en las Secciones 3.7.1 y 3.7.2, respectivamente) para identificar cepas que se sospecha que pertenecen a *X. fragariae*, aisladas a partir de material vegetal sospechoso de estar afectado por la mancha angular de la fresa. En caso de que solo se realicen dos pruebas de identificación para obtener un diagnóstico rápido, no se utilizará ninguna otra prueba serológica además de esta.

4.3 Pruebas moleculares

4.3.1 PCR

Los cultivos que se sospeche que pertenecen a *X. fragariae* pueden identificarse utilizando los protocolos de PCR descritos en la Sección 3.9.

4.3.2 REP-PCR

En Opgenorth *et al.* (1996) y Pooler *et al.* (1996) se describen protocolos de PCR basada en secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas para identificar cepas de *X. fragariae*. Cualquiera de estos protocolos puede emplearse para una identificación fiable de las cepas de la prueba como *X. fragariae*.

El protocolo de PCR que se describe a continuación se basa en la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación descritas por Opgenorth *et al.* (1996).

Las cepas bacterianas que han de analizarse se toman de cultivos o colonias individuales en medio modificado para la enfermedad de Pierce (5,0 g de sacarosa; 2,5 g de Phytone (BD BBL¹); 10 g de Phytigel (BD BBL¹); agua destilada hasta 1 litro; se ajusta el pH a 7,5 con 2 N de HCl antes de introducir en el autoclave) (Opgenorth *et al.*, 1996). Pueden utilizarse diferentes medios de crecimiento; no obstante, deberían estandarizarse antes de su uso.

Los dos conjuntos de cebadores son:

- REP1R-I: 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'
- REP2-I: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'
- ERIC1R: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'
- ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

El tampón de reacción contiene 16,6 mM de (NH₄)₂SO₄; 67 mM de Tris-HCl (pH 8,8); 6,7 μM de EDTA; 30 mM de 2-mercaptoetanol; 0,17 mg de BSA/ml; 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido; 1,2 mM de cada dNTP; 62 pmol de cada cebador; y 2 U de ADN polimerasa Taq. Con una punta de pipeta estéril de 10 μl (u otro utensilio adecuado) se transfieren las bacterias de una colonia representativa de la cepa de la prueba a un tubo de PCR que contenga 25 μl de mezcla de reacción. Los parámetros de los ciclos son los siguientes: 6 min a 95 °C seguidos de 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, 44 °C (cebadores REP) o 52 °C (cebadores ERIC) durante 1 min y 65 °C durante 8 min. Los ciclos de amplificación van seguidos de una fase final de extensión a 68 °C durante 16 min. Los productos de la amplificación (5-10 μl) se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % (p/v). Los fragmentos de ADN amplificados se visualizan antes de teñirlos con bromuro de etidio mediante transiluminación ultravioleta.

4.3.2.1 Interpretación de los resultados de la REP-PCR

Las cepas bacterianas se identifican como *X. fragariae* si tienen las mismas huellas genómicas que las de los genotipos REC y ERIC de las cepas de referencia (Pooler *et al.*, 1996) amplificadas en la misma PCR y utilizando el mismo gel. Debido al bajo nivel de variabilidad genómica, podrán obtenerse unas pocas bandas polimórficas a partir de diferentes cepas de *X. fragariae*.

4.3.3 Análisis de secuencias multilocus

El análisis de secuencias multilocus para la identificación específica de *Xanthomonas* (Parkinson *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2010; Hamza *et al.*, 2012) ha sido ampliamente utilizado y podría emplearse para la

identificación de *X. fragariae*, especialmente ahora que se dispone de un proyecto de secuencia genómica (Vandroemme *et al.*, 2013). Sin embargo, debería señalarse que esta metodología aún no ha sido validada para la identificación de *X. fragariae*. Los genes de mantenimiento (como *gyrB*, *rpoD*) se amplifican utilizando los cebadores y las condiciones descritas por Almeida *et al.* (2010) y Hamza *et al.* (2012). El análisis de secuencias multilocus consiste en la secuenciación de varios *loci* (por lo general, entre cuatro y ocho genes de mantenimiento) y la comparación de estas secuencias con las de referencia de especies de *Xanthomonas* depositadas en bases de datos de nucleótidos, como la base de datos de fitomicroorganismos Plant Associated and Environmental Microbes Database, PAMDB (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) (Almeida *et al.*, 2010), el banco de datos de genotipos microbianos MLVAbank (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>) y la base de datos sobre bacterias Q-bank (<http://www.q-bank.eu/Bacteria/>).

4.4 Pruebas de patogenicidad

La identidad de las cepas bacterianas que se sospecha que pertenecen a *X. fragariae* debería confirmarse mediante una prueba de patogenicidad cuando sea necesario. Las cepas seleccionadas a partir de placas de aislamiento o enriquecimiento deberían inocularse en hojas de plantas de fresa susceptibles (o en hojas desprendidas según se describe en la Sección 3.6). Se dispone de varios procedimientos: Hazel y Civerolo (1980), Civerolo *et al.* (1997a) y Hildebrand *et al.* (2005).

4.4.1 Procedimiento general de inoculación

Un procedimiento recomendado de inoculación consiste en utilizar plantas de fresa libres de *X. fragariae* de un cultivar susceptible (p. ej., Camarosa, Seascape, Selva, Korona, Pájaro). De ser posible, las plantas deberían mantenerse una noche en una cámara ambiental a 20-25 °C con una humedad relativa elevada (> 90 %) y exponerse a la luz durante 4 horas antes de la inoculación para inducir la apertura de los estomas.

Se preparan las suspensiones bacterianas (10^6 ufc/ml) en agua destilada estéril o 10 mM de PBS. Se aplica el inóculo de cada cepa a la superficie abaxial de tres hojas trifoliadas de dos o tres plantas con una pistola pulverizadora de baja presión, un aerógrafo o un dispositivo parecido (p. ej., los de DeVilbiss¹) para no producir empapamiento. La infección podrá facilitarse haciendo heridas en las hojas (p. ej., punzando la superficie abaxial con una aguja) antes de aplicar el inóculo, si bien no es indispensable hacerlo. Tras la inoculación, las plantas se incuban en una cámara mantenida a 20-25 °C con una humedad elevada (> 90 %) y un fotoperíodo de 12-14 horas. Las suspensiones de células de una cepa de referencia de *X. fragariae* (preparadas de la misma forma que la cepa de la prueba) y agua destilada estéril o 10 mM de PBS sirven como controles positivos y negativos, respectivamente, y deberían inocularse en bandejas

distintas. Se evalúa la evolución de las lesiones una vez por semana durante las tres semanas (21 días) posteriores a la inoculación. Se vuelve a aislar el patógeno a partir de estas lesiones, según se describe en la Sección 3.5, y se identifica mediante ELISA, prueba de inmunofluorescencia o PCR.

4.4.1.1 Interpretación de los resultados de las pruebas de patogenicidad

Si la suspensión bacteriana contiene *X. fragariae*, los síntomas iniciales consistirán en lesiones oscuras y de aspecto húmedo (si se observan con luz reflejada) en el envés de las hojas que, si se observan al trasluz, muestran un aspecto amarillo translúcido. Posteriormente, estas lesiones se transforman en manchas necróticas rodeadas por un halo amarillo o en necrosis marginal. Los mismos síntomas deberían aparecer en las hojas inoculadas con una cepa de referencia de *X. fragariae* (control positivo).

En cambio, no deberían aparecer en las hojas inoculadas con agua destilada estéril o 10 mM de PBS (control negativo).

4.4.2 Reacción de hipersensibilidad

Una reacción de hipersensibilidad en las hojas de tabaco puede ser una indicación de la presencia de genes *hrp*, y son muchas las bacterias patógenas que inducen una reacción positiva. Puede utilizarse un control positivo, por ejemplo una cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Se utilizan plantas de los cultivares de tabaco Samsun o Xanthi que tengan más de cinco hojas. Se preparan suspensiones bacterianas de 10^9 ufc/ml ($DO_{600nm} = 1,0$) en agua destilada estéril o 10 mM de PBS y se infiltran en los espacios intercelulares a través de la superficie abaxial de hojas adultas con una jeringuilla dotada de una aguja de calibre G25.

4.4.2.1 Interpretación de los resultados de la prueba de reacción de hipersensibilidad

Si el tejido infiltrado se dobla y necrosa totalmente transcurridas 24-48 horas desde la inoculación, se registra como un resultado positivo. La mayoría de las cepas de *X. fragariae* son positivas para la prueba de la reacción de hipersensibilidad. No obstante, algunas podrán ser negativas, en especial después de haber estado almacenadas algún tiempo. No deberían aparecer reacciones parecidas en las hojas inoculadas con agua destilada estéril o 10 mM de PBS como control negativo.

5. Registros

Los registros y las evidencias deberían conservarse según lo descrito en la Sección 2.5 de la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En el supuesto de que otras partes contratantes pudieran verse afectadas por los resultados del diagnóstico, en particular en los casos de incumplimiento (NIMF 13: *Directrices para la notificación del incumplimiento y acción de emergencia*) y cuando la plaga se detecte en un área por primera vez, se deberían mantener los registros, las evidencias y otro tipo de material que se indican a continuación como mínimo durante un año, de tal forma que se garantice la trazabilidad: la muestra original, el cultivo o cultivos de la plaga, especímenes conservados o en preparaciones, o materiales de las pruebas (como fotografías de los geles, impresiones de los resultados de los ELISA o amplicones de la PCR).

6. Puntos de contacto para obtener información adicional

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

Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (anteriormente), (Edwin L. Civerolo; correo electrónico: emciv@comcast.net).

Plant and Environmental Bacteriology, Fera, Sand Hutton, York YO41 1LZ, Reino Unido (John Elphinstone; correo electrónico: john.elphinstone@fera.gsi.gov.uk).

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).

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) por conducto de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El primer proyecto de este protocolo fue redactado por E. L. Civerolo (Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [anteriormente], Estados Unidos [véase la sección anterior]) y revisado por J. Elphinstone (Fera, Reino Unido [véase la sección anterior]) y M. M. López (IVIA, España [véase la sección anterior]).

8. 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/es/core-activities/standards-setting/ispms>.

Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C. y Vinatzer, B. A. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208-215.

Bradbury, J. F. 1977. *Xanthomonas fragariae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 558. Wallingford (Reino Unido), CAB International.

Bradbury, J. F. 1984. *Xanthomonas*. En N.R. Krieg y J.G. Holt, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, MD, Williams y Wilkins.

CAB International. Sin fecha. *Crop protection compendium*. Wallingford (Reino Unido), CAB International (disponible en <http://www.cabi.org/cpc/>, consultado el 16 de abril de 2016).

Calzolari, A. y Mazzucchi, U. 1989. Attempts to detect *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Acta Horticulturae*, 265: 601-604.

Civerolo, E. L., Feliciano, A. J., Melvin, J. A. y Gubler, W. D. 1997a. A detached leaf bioassay for *Xanthomonas fragariae*. En A. Mahadevin, ed. *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, págs. 89-94. Universidad de Madras, Madras, India.

Civerolo, E. L., Roberts, P., Feliciano, A. J., Melvin, J. A., Buchner, R. P., Jones, J. B. y Gubler, W. D. 1997b. Comparative detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants by detached leaf inoculation, ELISA and PCR. En A. Mahadevin, ed. *Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria*, págs. 95-99. Universidad de Madras, Madras, India.

De Boer, S. H. 1990. Immunofluorescence for bacteria. En R. Hampton, E. Ball y S. De Boer, eds. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual*, págs. 295-298. St Paul, MN, APS Press.

Dickstein, E. R., Jones, J. B. y Stead, D. E. 2001. Automated techniques. En N.W. Schaad, J.B. Jones y W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, págs. 343-358. St Paul, MN, APS Press.

Dye, D. W. 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *New Zealand Journal of Science*, 5(4): 393-416.

- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria). 1997. Data sheet on *Xanthomonas fragariae*. En EPPO/CAB International (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, y M. Holderness, eds), ed. *Quarantine pests for Europe*, 2ª ed., págs. 1124-1128. Wallingford (Reino Unido), CAB International.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2006. Protocolo de diagnóstico para *Xanthomonas fragariae*. Normas OEPP PM 7/27(65). *EPPO Bulletin*, 36: 135-144.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2009. Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. Normas OEPP PM 7/97(1). *EPPO Bulletin*, 39: 413-416.
- Gubler, W. D., Feliciano, A. J., Bordas, A., Civerolo, E. L., Melvin, J. y Welch, N.** 1999. *X. fragariae* and *C. cladosporioides* cause strawberry blossom blight. *California Agriculture*, 53: 26-28.
- Hamza, A. A., Robene-Soustrade, I., Jouen, E., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Fisher-Le Saux, M., Gagnevin, L. y Pruvost, O.** 2012. Multilocus sequence analysis- and amplified fragment length polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3): 183-190.
- Hartung, J. S. y Pooler, M. R.** 1997. Immunocapture and multiplexed-PCR assay for *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease. *Acta Horticulturae*, 439: 821-828.
- Hayward, C.** 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature*, 186: 405-406.
- Hazel, W. J. y Civerolo, E. L.** 1980. Procedures for growth and inoculation of *Xanthomonas fragariae*, causal organism of angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease*, 64: 178-181.
- Hildebrand, P. D., Braun, P. G., Renderos, W. E., Jamieson, A. R., McRae, K. B. y Binns, M. R.** 2005. A quantitative method for inoculating strawberry leaves with *Xanthomonas fragariae*, factors affecting infection, and cultivar reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27: 16-24.
- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N. y Wilhelm, S.** 1967. Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. *Phytopathology*, 57: 1260-1261.
- Janse, J. D.** 2005. Examples of bacterial diseases of cultivated and wild plants – *Xanthomonas fragariae*. En: *Phylobacteriology: principles and practice*. Capítulo 7. Wallingford (Reino Unido), CABI Publishing. págs. 224-225.
- Janse, J. D., Ross, M. P., Gorkink, R. F. J., Derks, J. H. J., Swings, J. Janssens, D. y Scortichini, M.** 2001. Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria* (×) *ananassa*) caused by a pathovar of

- Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology*, 50: 653-665.
- Kennedy, B. W.** 1965. Infection of *Potentilla* by *Xanthomonas fragariae*. *Plant Disease Reporter*, 49: 491-492.
- Kennedy, B. W. y King, T. H.** 1962. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology*, 52: 873-875.
- Koike, H.** 1965. The aluminum-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology*, 55: 317-319.
- López, M. M., Aramburu, J. M., Cambra, M. y Borrás, V.** 1985. [Detection and identification of *Xanthomonas fragariae* in Spain.] *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agrícola*, 28: 245-259 (en español).
- López, M. M., Dominguez, F., Morente, C., Salcedo, C.I., Olmos, A. y Civerolo, E.** 2005. *Diagnostic protocols for organisms harmful to plants: Diagnosis Xanthomonas fragariae*. SMT-4-CT98-2252.
- Maas, J. L., ed.** 1998. *Compendium of strawberry diseases*, 2.^a ed. St Paul, MN, APS Press.
- Maas, J. L., Gouin-Behe, C., Hartung J. S. y Hokanson, S.C.** 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *Horticultural Science*, 35: 128-131.
- Maas, J. L., Pooler, M. y Galletta, G. J.** 1995. Bacterial angular leafspot disease of strawberry: Present status and prospects for control. *Advances in Strawberry Research*, 14: 18-24.
- Mafra, V., Kubo, K. S., Alves-Ferreira, M., Ribeiro-Alves, M., Stuart, R. M., Boava, L. P., Rodrigues, C. M. y Machado, M. A.** 2012. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PloS One*, 7(2), e31263.
- Mahuku, G. S. y Goodwin, P. H.** 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 366-370.
- Milholland, R. D., Ritchie, D. F., Dayking, M. E. y Gutierrez, W. A.** 1996. Multiplication and translocation of *Xanthomonas fragariae* in strawberry. *Advances in Strawberry Research*, 15: 13-17.
- Moltmann, E. y Zimmermann, C.** 2005. Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested PCR. *EPPO Bulletin*, 35: 53-54.

- Opgenorth, D. C., Smart, C. D., Louws, F. J., de Bruijn, F. J. y Kirkpatrick, B. C.** 1996. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Disease*, 80: 868-873.
- Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J. y Stead, D.** 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12): 2881-2887.
- Pooler, M. R., Ritchie, D. F. y Hartung, J. S.** 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3121-3127.
- Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. y De Bruijn, F. J.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 665-677.
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. y de Bruijn, F. J.** 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95: 1098-1111.
- Rat, B.** 1993. *Xanthomonas fragariae*: Causal agent of angular leaf spot of strawberry. En J.G. Swings y E.L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*, págs. 69-70. Londres, Chapman and Hall.
- Roberts, P. D., Hodge, N. C., Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Berger, R. D. y Chase, A. R.** 1998. Relatedness of strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation, and fatty acid analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3961-3965.
- Roberts, P. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., Stall, R. E. y Berger, R. D.** 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested PCR. *Plant Disease*, 80: 1283-1288.
- Rowhani, A., Feliciano, A. J., Lips, T. y Gubler, W. D.** 1994. Rapid identification of *Xanthomonas fragariae* in infected strawberry leaves by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease*, 78: 248-250.
- Saddler, G. S. y Bradbury, J. F.** 2005. *Xanthomonas*. En G.M. Garrity, editor jefe; D.J. Brenner, N.R. Krieg y J.T. Stanley, eds Vol. 2. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2.^a ed., Vol. 2, Parte B, págs. 63-90. Nueva York, Springer.

- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. *En* Z. Klement, K. Rudolph & D.C. Sands, eds. *Methods in phytopathology*, págs. 200-204. Budapest, Akademiai Kiado.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. y Lacy, G. H.** 2001. *Xanthomonas*. *En* N.W. Schaad, J.B. Jones y W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3.^a ed., págs. 175-200. St Paul, MN, APS Press.
- Schaad, N. W., Tamaki, S., Hatziloukas, E. y Panapoulos, N. J.** 1995. A combined biological enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*, 85: 243-248.
- Stackebrandt, E., Murray, R. G. E. y Truper, H. G.** 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38: 321-325.
- Stefani, E., Mazzucchi, U. y Calzolari, A.** 1989. Evidence of endophytic movement of *Xanthomonas fragariae* Kenn. and King in strawberry. *Phytopathologia Mediterranea*, 28: 147-149.
- Stöger, A. y Ruppitsch, W.** 2004. A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 281-284.
- Swings, J., Vauterin, L. y Kersters, K.** 1993. The bacterium *Xanthomonas*. *En* J. Swings y E. L. Civerolo, eds. *Xanthomonas*, págs. 138-144. Londres, Chapman and Hall.
- Turechek, W. W., Hartung, J. S. y McCallister, J.** 2008. Development and optimization of a real-time detection assay for *Xanthomonas fragariae* in strawberry crown tissue with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, 98(3): 359-368.
- Van den Mooter, M. y Swings, J.** 1990. Numerical analyses of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 348-369.
- Vandroemme, J., Baeyen, S., Van Vaerenbergh, J., De Vos, P. y Maes, M.** 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology*, 57(3): 438-444.
- Vandroemme, J., Cottyn, B., Baeyen, S., De Vos, P. y Maes, M.** 2013. Draft genome sequence of *Xanthomonas fragariae* reveals reductive evolution and distinct virulence-related gene content. *BMC Genomics*, 14(1), 829.
- Weisberg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, B. A. y Lane, D. J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.

- Weller, S. A., Beresford-Jones, N. J., Hall, J., Thwaites, R., Parkinson, N. y Elphinstone, J. G.** 2007. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 379-383.
- 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(7): 2853-2858.
- Zimmermann, C., Hinrichs-Gerger, J., Moltmann, E. y Buchenauer, H.** 2004. Nested PCR for detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 39-51.

9 Figuras



Figura 1. Síntomas de *Xanthomonas fragariae* en el haz de la hoja (A, izquierda) y en el envés de la hoja (B, derecha).

Fotografía por gentileza de A.M.C. Schilder, Universidad Estatal de Michigan, East Lansing, MI (Estados Unidos de América).



Figura 2. Exudado bacteriano de *Xanthomonas fragariae* en el envés de una hoja.

Fotografía por gentileza de W. W. Turechek, Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Washington, DC (Estados Unidos de América).



Figura 3. Síntomas de *Xanthomonas fragariae* en el cáliz de un fruto.

Fotografía por gentileza de A. M. C. Schilder, Universidad Estatal de Michigan, East Lansing, MI (Estados Unidos de América).

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

2004-11: El CN añadió el tema al programa de trabajo.

2006-04: La CMF-1 añadió el tema *Xanthomonas fragariae* (2004-012) al programa de trabajo.

2014-01: Consulta de expertos.

2015-06: El CN aprobó, mediante decisión por medios electrónicos, remitir el protocolo a consulta a los miembros (2015_eSC_Nov_03).

2016-03: El GTPD aprobó, mediante decisión por medios electrónicos, que se presentara el protocolo al CN para su adopción (2016_eTPDP_Mar_05).

2016-06: El CN aprobó, mediante decisión por medios electrónicos, que el texto se remitiera al período de notificación de 45 días de los protocolos de diagnóstico (2016_eSC_Nov_01).

2016-08: El CN adoptó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones).

NIMF 27. Anexo 14. *Xanthomonas fragariae* (2016). Roma, CIPF, FAO.

2017-01: La Secretaría de la CIPF corrigió un error editorial de menor importancia en la Sección 8.

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 la publicación: 2018-01.

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

