

Dirección General de Sanidad Vegetal

Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario

Departamento de Fitopatología

Laboratorio de Bacteriología

Generalidades

Xanthomonas fragariae es la bacteria responsable de la enfermedad conocida como “mancha angular de la fresa” (*Fragaria ananassa* Duch). Fue reportada por primera vez en Minnesota en 1962 (Kennedy y King, 1962) y posteriormente en áreas de cultivo de fresa de América del Norte y del Sur, Europa, África, Australia y Nueva Zelanda (EPPO, 2006). Se transmite a través de plantas asintomáticas con infección latente en material propagativo, de ahí su importancia y estatus cuarentenario (NIMF 27, 2016).

Información taxonómica

Posición taxonómica: Reino: Bacteria, Phylum: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Xanthomonadales, Familia: Xanthomonadaceae, Género: *Xanthomonas*, Especie: *Xanthomonas fragariae* (CABI, 2020).

Nombre común: Mancha angular de la fresa, mancha foliar angular de fresa. Angular leaf spot (inglés). Taches angulaires (francés).

Síntomas

X. fragariae ocasiona lesiones pequeñas húmedas en el envés de la hoja (**Figura 1**), estas lesiones se alargan o agrandan para formar manchas angulares delimitadas por las venas.



Figura 1. Síntomas de manchas húmedas angulares en las hojas, ocasionadas por *Xanthomonas fragariae*

Las lesiones acuosas que se forman son translúcidas vistas con luz transmitida (**Figura 2a**), lo cual es una importante característica distintiva de esta enfermedad. En condiciones de humedad relativa alta, pueden aparecer exudados lechosos de color blanco, crema o amarillo (**Figura 2b**).

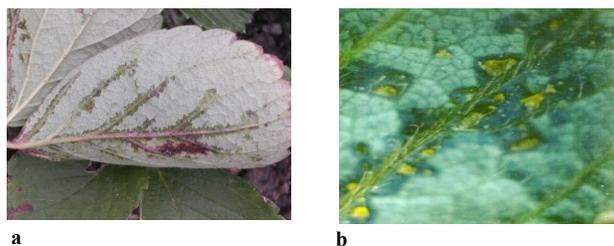


Figura 2. Síntomas y signos provocados por *Xanthomonas fragariae*. a) Manchas acuosas en las nervaduras. b) Exudados color amarillo. Tomado de a) Villanueva (2010). b) López

Morfología

Morfología colonial. *X. fragariae* es una bacteria de crecimiento lento, Gram negativa y mide 0.4 μm de diámetro y 1.3 μm de largo, cuenta con un solo flagelo polar. Las colonias son circulares, convexas, con bordes suaves y lisos (**Figura 3a**), en medios de cultivo que contienen sacarosa o glucosa, producen un polisacárido que le da consistencia mucóide así como un pigmento amarillo (**Figura 3b**).

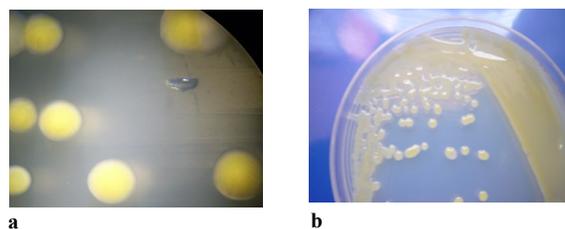


Figura 3. Colonias de *Xanthomonas fragariae* en medio B de King. a) Forma circular y convexa. b) Consistencia mucóide y amarilla

Técnicas de diagnóstico

La detección de esta enfermedad implica el reconocimiento de los síntomas característicos, el aislamiento, la caracterización morfológica y bioquímica de las cepas bacterianas, y el uso de PCR punto final.

Aislamiento y pruebas de patogenicidad. Se recomienda realizarlo a partir de hojas con los síntomas descritos. Sembrar en medio B de King y YDC. Consultar la Ficha de Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad e inocular en tabaco y papa (Senasica, 2020a).

Pruebas bioquímicas. Para determinar las características bioquímicas y fisiológicas de *X. fragariae* la cepa pura se debe hacer crecer en presencia de determinadas sustancias nutritivas (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la caracterización de *Xanthomonas fragariae*

| Prueba | Resultado |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Tinción de Gram y/o reacción de KOH | Gram negativa / KOH (+) |
| Hipersensibilidad en tabaco | + |
| Pudrición en papa | + |
| Reacción de O/F | +/- |
| Crecimiento mucóide en YDC | + |
| Crecimiento en medio tween | + |
| Hidrólisis de esculina | - |
| Producción de ácido a partir de: | |
| Glucosa | + |
| Manosa | + |
| Celobiosa | - |
| Fructuosa | + |
| Tolerancia al NaCl 2 % | - |

(+): reacción positiva, (-): reacción negativa
Rodríguez (2006) y Schaad *et al* (2001)

Técnicas moleculares

Realizar la extracción de DNA total con CTAB 2 % . Consultar la Ficha Metodologías para la extracción de DNA total (Senasica, 2020b). **Nota:** Se puede emplear algún otro protocolo o *kit* comercial de extracción de DNA, siempre y cuando este cumpla con los parámetros de calidad e integridad (relaciones de absorbancia: $A_{260/280}=1.8-2.0$ y $A_{260/230}=2.0-2.2$).

PCR punto final

Se pueden emplear dos pares de *primers* Hartung y Pooler , 1997 (Cuadro 2).

Preparar la mezcla de reacción empleando lo indicado en el Cuadro 3 y utilizar las condiciones de amplificación del Cuadro 4.

Cuadro 2. Secuencias de los *primers* empleados para la amplificación de *Xanthomonas fragariae*

| Tipo | Nombre del primer | Secuencia (5'-3') | Tamaño (pb) |
|-------------|-------------------|----------------------|-------------|
| Sentido | 241A | GCCCGACGCGAGTTGAATC | 550 |
| Antisentido | 241B | GCCCGACGCGCTACAGACTC | |
| Sentido | 245A | CGCGTGCCAGTGGAGATCC | 300 |
| Antisentido | 245B | CGCGTGCCAGAAGTAGCAG | |

Cuadro 3. Mezcla de reacción para la PCR punto final

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen (µL) |
|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| Buffer PCR | 10 X | 1X | 2.5 |
| MgCl ₂ | 50 mM | 1.5 mM | 0.75 |
| dNTP | 10 mM | 0.2 mM | 0.4 |
| Primer 241A o 245B | 10 µM | 0.4 µM | 1 |
| Primer 241B o 245B | 10 µM | 0.4 µM | 1 |
| Taq DNA pol | 5 U/µL | 0.06 U/µL | 0.3 |
| DNA | 20 - 50 ng/µL | 4 - 10 ng/µL | 5 |
| Agua grado biología | - | - | 14.05 |
| molecular | | | |
| | | Volumen final | 25 |

Nota: Los dos pares de *primers* utilizan el mismo programa de temperaturas.

Cuadro 4. Programa de amplificación para *X. fragariae*

| Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------|--------|--------|
| 95 °C | 15 min | 1 |
| 95 °C | 1 min | |
| 57 °C | 1 min | 35 |
| 72 °C | 1 min | |
| 72 °C | 7 min | 1 |

Al concluir el programa, correr los productos de PCR por electroforesis durante 60 minutos a 95 V en un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TAE 1X.

Controles para las pruebas moleculares

Se deben incluir controles que permitan disminuir la incertidumbre de los resultados.

Control positivo: asegura la funcionalidad de los reactivos de PCR. Contiene DNA o clona de la plaga de interés y debe estar confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de matriz: este control corresponde a un extracto de planta/semilla sin la plaga. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin DNA molde o clona. Descarta falsos positivos.

Interpretación de resultados de PCR punto final

Primers 241A y 241B. Las muestras serán consideradas positivas cuando estas generen una banda de 550 pb (Figura 4a).

Primers 245A y 245B. Las muestras serán consideradas positivas cuando estas generen una banda de 300 pb (Figura 4b).

Los controles negativos de matriz y reactivos no deben generar ninguna banda con los *primers* específicos.

Nota: la figura se muestra de manera ilustrativa.

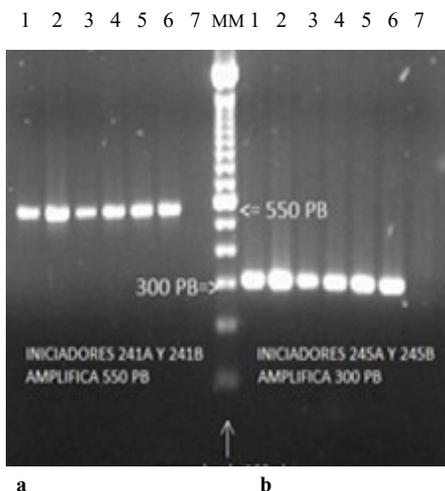


Figura 4. Amplificación de los productos de PCR 1) Control positivo. 2), 3), 4), 5) y 6) muestras. 7) Control negativo de reactivos. Marcador molecular (MM) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). a) *Primers* 241A y 241B, amplicón esperado 550 pb. b) *Primers* 245A y 245B, amplicón esperado 300 pb

Identificación del patógeno

Para identificar a *X. fragariae* se requieren obtener resultados positivos de dos técnicas con sus controles correspondientes. Como prueba de corroboración, se sugiere secuenciar el fragmento de DNA obtenido en la PCR punto final, de al menos uno de los pares de *primers* mencionados.

Forma recomendada de citar:

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Ficha Técnica de Diagnóstico: *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King (1962). [Versión 1.0]. Autor.

Referencias

CABI. Crop Protection Compendium. (2020). CAB International. United Kingdom.

EPPO European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2006). PM 7/27(65). *Xanthomonas fragariae*. EPPO Bulletin, 36: 135-144

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.

Kennedy B.W., King T.H. (1962). Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology* 52, 873-875.

López, M. M y Civerolo, E. (2005). Protocol for diagnosis of Quarantine Organism. Diagnosis of *Xanthomonas fragariae*. SMT PROJECT SMT-4-CT98-2252

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

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.

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020a). Ficha Técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad. [Versión 1.0]. Autor.

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020b). Ficha Técnica: Metodologías para la extracción de DNA total. [Versión 1.0]. Autor.

Rodríguez M. M .L. (2006). Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.

Villanueva Arce, R. (2010). IPN, Edo. de México. Cortesía fotografía.

Contacto para información adicional

Correo: lab.bacteriologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 55590 51000, Ext. 51314 y 51333