

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Bacteriología

Protocolo de Diagnóstico:
Xylella fastidiosa y sus subespecies

Tecámac, Estado de México, agosto 2021

SENASICA, AGRICULTURA SANA PARA EL BIENESTAR.

"ESTE PROGRAMA ES PÚBLICO, AJENO A CUALQUIER PARTIDO POLÍTICO. QUEDA PROHIBIDO EL USO PARA FINES DISTINTOS A LOS ESTABLECIDOS EN EL PROGRAMA"



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA

SISTEMA NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), [2021]

Impreso por SENASICA

Todos los derechos reservados.

Handwritten blue ink marks, possibly initials or a signature, located in the bottom left corner.

Handwritten blue ink marks, possibly initials or a signature, located in the bottom right corner.

I. ÍNDICE

Pág.

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1 INFORMACIÓN SOBRE LA PLAGA.....	1
2.2 INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	4
3.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	4
3.1.1 Extracción de DNA total.....	4
3.1.2 Calidad y cuantificación del DNA total por espectrofotometría.....	5
3.1.3 Verificación de la calidad del DNA total en gel de agarosa.....	5
3.1.4 PCR punto final.....	6
3.1.4.1 Preparación de la muestra.....	6
3.5.1 PCR cuantitativa (qPCR).....	8
3.2 CONTROLES PARA LAS PRUEBAS MOLECULARES.....	10
3.3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	10
3.3.1 Interpretación de resultados de PCR punto final.....	10
3.3.2 Interpretación de resultados de PCR tiempo real.....	12
3.4 IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO.....	13
3.5 MLST (MULTILOCUS SEQUENCE TYPING) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA SUBESPECIE DE X. FASTIDIOSA.....	13
3.5.1 Preparación de la muestra.....	14
3.6 DETECCIÓN DE SUBESPECIES DE XYLELLA FASTIDIOSA POR qPCR.....	25
3.6.1 Preparación de la muestra.....	25
4. REGISTROS.....	27
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	28
6. RECONOCIMIENTO.....	28
7. REFERENCIAS.....	29
8. ANEXO.....	32
8.1 SÍNTOMAS.....	32
8.2 CONSIDERACIONES PARA EL ENVÍO DE MUESTRA.....	32
8.3 EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL CON CTAB 2 %.....	32
8.4 SOLUCIONES.....	34
9. HISTORIAL DE CAMBIOS.....	35

h
h

h
h

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores FXYgyr499 y RXYgyr907.....	11
Figura 2. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores RST31 y RST33.....	11
Figura 3. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores HL5 y HL6.....	12
Figura 4. Amplificación de las muestras mediante qPCR con los iniciadores XF-F y XF-R y sonda la XF-P.....	13
Figura 5. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores <i>leuA</i> -for y <i>leuA</i> -rev.....	16
Figura 6. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores <i>petC</i> -for y <i>petC</i> -rev.....	17
Figura 7. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores <i>malF</i> -for y <i>malF</i> -rev.....	17
Figura 8. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores <i>cysG</i> -for y <i>cysG</i> -rev.....	18
Figura 9. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores <i>holC</i> -for y <i>holC</i> -rev.....	18
Figura 10. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores <i>nuoL</i> -for y <i>nuoL</i> -rev.....	19
Figura 11. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores <i>gltT</i> -for y <i>gltT</i> -rev.....	19
Figura 12. Filogenia de subespecies de <i>X. fastidiosa</i>	24
Figura 13. Síntomas de <i>Xylella fastidiosa</i>	32

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores empleados para la PCR punto final.....	6
Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final.....	7
Cuadro 3. Programa de termociclaje para los iniciadores FXYgyr499 y RXYgyr907.....	7
Cuadro 4. Programa de termociclaje para los iniciadores RST31 y RST33.....	7
Cuadro 5. Programa de termociclaje para los iniciadores HL5 y HL6.....	7
Cuadro 6. Secuencias de iniciadores y sondas empleados para la qPCR (PCR tiempo real).....	8
Cuadro 7. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tiempo real.....	9
Cuadro 8. Programa de termociclaje para los iniciadores XF-F y XF-R y la sonda XF-P.....	9
Cuadro 9. Programa de termociclaje para los iniciadores HL5 y HL6 y la sonda HL-P.....	10
Cuadro 10. Programa de termociclaje para los iniciadores XF16Sf y XF16Sr y la sonda XF16Sp.....	10
Cuadro 11. Secuencias de iniciadores empleados en el MLST.....	14
Cuadro 12. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final del MLST.....	15
Cuadro 13. Programa de termociclaje para los iniciadores del MLST.....	15
Cuadro 14. Relación entre Secuencias Tipo y subespecies de <i>Xylella fastidiosa</i> (OEPP/EPPO, 2019).....	20
Cuadro 15. Secuencias de iniciadores empleados para detectar subespecies de <i>Xylella fastidiosa</i> por qPCR.....	25
Cuadro 16. Preparación de la mezcla de reacción para detectar subespecies de <i>X. fastidiosa</i> por qPCR.....	26
Cuadro 17. Programa de termociclaje para detectar subespecies de <i>Xylella fastidiosa</i> por qPCR.....	26

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

El objetivo del presente protocolo es describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la detección e identificación de *Xylella fastidiosa* y sus subespecies mediante las técnicas moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en sus variantes punto final, PCR tiempo real y tipificación de secuencias multilocus (MLST). Este protocolo aplica para tejidos vegetales, como hojas, brotes, peciolos y ramas, de diferentes cultivos hospedantes de *X. fastidiosa* que presenten síntomas característicos como quemadura o escaldadura en hojas y marchitez, así como tejidos asintomáticos, y deberá ser aplicado a insectos portadores/vectores (miembros de familia Cicadellidae).

La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados que se obtengan al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

El protocolo fue desarrollado en las instalaciones del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica), y está dirigido a los Terceros Especialistas Fitosanitarios de los Laboratorios Aprobados y al personal técnico de los laboratorios oficiales del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

Los síntomas de *X. fastidiosa* se observaron por primera vez en 1892 en cultivos de vid ubicados al sur de California, Estados Unidos de Norte América, y años más tarde, el síndrome fue nombrado "Enfermedad de Pierce".

La bacteria *X. fastidiosa* en las plantas es habitante del xilema y su colonización ocasiona la obstrucción de los haces vasculares. Un síntoma característico en plantas es el secado marginal de las hojas o escaldadura (**Anexo 8.1, Figura 13a y b**). El principal método de dispersión es por material propagativo infectado a otras regiones y países, y por insectos vectores de las familias Cercopidae y Cicadellidae que se alimentan de la savia. Los insectos adquieren a la bacteria al alimentarse de plantas infectadas, esta

se aloja en el cibario y posteriormente la transmiten a plantas sanas durante su alimentación (Lee et al., 1991; He et al., 2000).

Actualmente *X. fastidiosa* está presente en Costa Rica, Estados Unidos de América, y México (Senasica, 2019), en Sudamérica en Argentina, Brasil y Paraguay, mientras que en el continente europeo se encuentra en España, Francia e Italia (CABI, 2019). Se estima que existen más de 563 especies de plantas hospedantes (EFSA, 2018) muchas de ellas asintomáticas. La bacteria causa enfermedades en muchas plantas cultivadas como aguacate, alfalfa, almendro, arándano, café, cítricos, ciruelo, maple, melocotón, mora, nogal pecanero, olivo, olmo, roble y vid (Harris, 2015). Esta bacteria presenta amplia diversidad genómica, lo cual le confiere especificidad en el rango de hospedantes (Nunney, 2014).

La descripción de la bacteria fue realizada en 1987 por Wells y colaboradores. Los diferentes estudios genómicos realizados desde entonces, han propuesto seis subespecies de la bacteria: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (Schaad, 2004), *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (Schaad, 2004), *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Schaad, 2004), *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (Schuenzel, 2005), *X. fastidiosa* subsp. *tashke* (Randall, 2009) y *X. fastidiosa* subsp. *morus* (Nunney, 2014).

En México y con base en la NIMF No. 8, "Determinación de la situación de una plaga en un área", *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* es una plaga Presente, sujeta a control oficial (Senasica, 2019). De esta forma, se tienen establecidos requisitos fitosanitarios para la importación de productos hospedantes de la plaga y se cuenta con el Programa de Vigilancia Fitosanitaria (Senasica, 2020). En 2002, se estableció la Campaña Nacional contra la enfermedad de Pierce con el objetivo de controlar a la bacteria y sus insectos vectores. Actualmente la campaña continúa en operación y los municipios Valle de Guadalupe en Ensenada Baja California, Parras de la Fuente, Coahuila y Ezequiel Montes, Querétaro se encuentran bajo control oficial fitosanitario (Senasica, 2018).

2.2 Información taxonómica

Nombre:

Xylella fastidiosa Wells et al., 1987
X. fastidiosa subsp. *fastidiosa* (Schaad, 2004)
X. fastidiosa subsp. *multiplex* (Schaad, 2004)
X. fastidiosa subsp. *pauca* (Schaad, 2004)
X. fastidiosa subsp. *sandyi* (Schuenzel, 2005)
X. fastidiosa subsp. *tashke* (Randall, 2009)
X. fastidiosa subsp. *morus* (Nunney, 2014)

Nombres comunes:

Quemadura de la hoja
Enfermedad de Pierce
Leaf scorch disease (inglés)
Maladie de Pierce (francés)
Citrus variegated Chlorosis (inglés)
Clorosis variegada de los cítricos
Phony Peach Disease (inglés)
Desecamiento rápido del olivo
Enanismo de la alfalfa

Posición taxonómica:

Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria,
Xanthomonadales, Xanthomonadaceae, *Xylella*,
Xylella fastidiosa

(Saddler y Bradbury, 2015)

3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

La detección de la bacteria puede realizarse a partir de plantas y barbados sintomáticos o asintomáticos, así como en insectos (Cicadélidos). Debido a la importancia regulatoria del patógeno, el análisis debe realizarse utilizando por lo menos dos técnicas alternas; mediante PCR punto final con al menos dos pares de iniciadores y PCR tiempo real.

En primera instancia el material vegetal (**Anexo 8.2**) debe ser inspeccionado para proceder o no a su análisis. El tejido debe estar fresco, sin fenolización, oxidación o presencia de organismos saprófitos, el cual debe incluir hojas, pecíolos, brotes y ramas con o sin síntomas

3.1 Identificación molecular

Los métodos de diagnóstico molecular basados en la detección de ácidos nucleicos se caracterizan por su elevada sensibilidad, especificidad y rapidez. La detección del material genético se realiza mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus diversas variantes como punto final, qPCR o PCR multiplex. Estas técnicas permiten producir *in vitro* grandes cantidades de una secuencia de DNA específica durante varios ciclos repetidos.

3.1.1 Extracción de DNA total

La extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA) total debe realizarse a partir de nervaduras centrales de las hojas, pecíolos, punto de unión del pecíolo con la rama o material vegetal que presente síntomas característicos (**Anexo 8.1**). En caso de no observar síntomas, tomar la muestra aleatoriamente de las zonas en las que pudiera existir infección latente.

Nota: pesar de 300 a 500 mg de tejido vegetal en una balanza analítica.

Para la extracción de DNA total a partir de insectos, tomar la cabeza, (en el cibario del insecto se concentra la bacteria) y remover los ojos para evitar inhibición en la reacción de PCR.

Se recomienda emplear los siguientes *kits* comerciales y seguir las instrucciones del fabricante.

- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
- PlantDNAzol™ Reagent

La extracción de DNA total también puede realizarse con CTAB 2 % (**Anexo 8.3**)

Puede emplearse algún otro protocolo de extracción de DNA total, siempre y cuando este cumpla con los parámetros de calidad e integridad (**Sección 3.1.2**).

Nota: Antes de comenzar con el proceso de extracción de DNA es necesario descontaminar el área de trabajo y superficies. Se recomienda emplear descontaminantes efectivos contra RNAsa, DNAsa y DNA.

Utilizar guantes y cubrebocas nuevos y desecharlos al final del proceso.

3.1.2 Calidad y cuantificación del DNA total por espectrofotometría

- 1) Cuantificar de 1.0 a 2.0 μL de DNA total extraído mediante espectrofotometría para conocer su concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$. Utilizar un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad.
- 2) La pureza del DNA total extraído, deberá presentar valores de absorbancia (A) entre 1.8 y 2.0 para la relación A_{260}/A_{280} y entre 2.0 y 2.2 para la relación A_{260}/A_{230} . Una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas.

Nota: para las muestras que no cumplan con el rango óptimo de pureza, se recomienda realizar una nueva extracción de DNA o comprobar mediante amplificación de algún gen endógeno, que el DNA es amplificable.

3.1.3 Verificación de la calidad del DNA total en gel de agarosa

- 1) Verificar la calidad del DNA en gel de agarosa al 1.5 % en *buffer* TAE 1X.
- 2) Cargar en el gel 5 μL de DNA mezclado con 3 μL de *buffer* naranja G 6X previamente teñido con el colorante GelRed™ (**Sección 8.4, buffer naranja G 6X**).
- 3) Correr la electroforesis por 30 min a 95 V y observar el gel en luz UV.

Nota: el tiempo y voltaje aplicados en la electroforesis dependerá del tamaño de la cámara utilizada, de acuerdo con ello ajustar estos dos parámetros.

- 4) Deberán observarse los fragmentos de DNA bien definidos, sin impurezas ni degradación, de lo contrario, se recomienda realizar una nueva extracción de DNA o comprobar mediante amplificación de algún gen endógeno, que el DNA es amplificable.

3.1.4 PCR punto final

La PCR punto final es una variante de la PCR, en la cual, el producto final es visualizado en un gel de agarosa, esta proporciona evidencia cualitativa de la presencia de un fragmento de DNA de interés en la muestra analizada.

Se han desarrollado diversos iniciadores para la detección de *X. fastidiosa* (IPPC, 2018; Lee *et al.*, 1991 y EPPO, 2019). Se sugiere emplear tres pares de iniciadores: FXYgyr499 y RXYgyr907 (Rodrigues *et al.*, 2003), RST31 y RST33 (Minsavage *et al.*, 1994) y HL5 y HL6 (Francis *et al.*, 2006) (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores empleados para la PCR punto final

Tipo	Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)
Sentido	FXYgyr499	CAGTTAGGGGTGTCAGCG	429
Antisentido	RXYgyr907	CTCAATGTAATTACCCAAGGT	
Sentido	RST31	GCGTTAATTTTCGAAGTGATTTCGATTGC	733
Antisentido	RST33	CACCATTTCGTATCCCGGTG	
Sentido	HL5	AAGGCAATAAACGCGCACTA	221
Antisentido	HL6	GGTTTTGCTGACTGGCAACA	

3.1.4.1 Preparación de la muestra

- 1) Descontaminar el área de trabajo, superficies y cabinas de PCR con removedores de ARNasa, DNAasa y DNA. En caso de no contar con alguno de los productos mencionados, la limpieza puede realizarse con una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, después de 15 min limpiar con papel humedecido con agua destilada y finalmente con etanol al 70 % para secar rápidamente las superficies. Adicionalmente, las cabinas deberán descontaminarse con luz UV durante 10 min.
- 2) Diluir el DNA para obtener concentraciones de 20 a 30 ng/ μ L.
- 3) Descongelar sobre hielo los reactivos y preparar la mezcla de reacción con las cantidades indicadas en el **Cuadro 2**.

Nota: Utilizar guantes y cubrebocas nuevos.

Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (μL) 1X
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.16 mM	0.4
Iniciador FXYgyr499, RST31 o HL5	10 μM	0.4 μM	1.0
Iniciador RXYgyr907, RST33 o HL6	10 μM	0.4 μM	1.0
Taq DNA Pol	5 U/μL	0.06 U/μL	0.3
DNA	20 – 30 ng/μL	4 - 10 ng/μL	5.0
Agua grado biología molecular	-	-	14.05
		Volumen final	25

- 4) Programar el termociclador de acuerdo con el par de iniciadores empleados en la mezcla de reacción, **Cuadros 3, 4 y 5.**

Cuadro 3. Programa de termociclaje para los iniciadores FXYgyr499 y RXYgyr907

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	35
Hibridación	60 °C	30 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	7 min	1

Cuadro 4. Programa de termociclaje para los iniciadores RST31 y RST33

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	1 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	40
Hibridación	55 °C	30 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	7 min	1

Cuadro 5. Programa de termociclaje para los iniciadores HL5 y HL6

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	35
Hibridación	60 °C	30 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	5 min	1

- 5) Los productos de PCR (10 μ L) mezclados con 3 μ L de *buffer* de corrida (naranja G 6X) previamente teñido con GelRed™ deben correrse por electroforesis durante 60 min a 95 V en un gel de agarosa al 1.5 % en *buffer* TAE 1X, preferentemente. Incluir en ambos extremos del gel un marcador de peso molecular que permita estimar el tamaño del amplicón.

Nota: el tiempo y voltaje aplicados en la electroforesis dependerá del tamaño de la cámara utilizada, de acuerdo con ello ajustar estos dos parámetros.

Nota: sí se utiliza el método de tinción con GelRed se sugiere teñir previamente el *buffer* de corrida con GelRed™, adicionando 10 μ L del colorante a 2 mL de *buffer* de corrida (naranja G 6X). Mezclar perfectamente para su utilización y almacenar a 4 °C.

Nota: Puede utilizarse otro método de tinción como el bromuro de etidio siempre y cuando permita la interpretación de los resultados.

3.5.1 PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR) amplifica y cuantifica simultáneamente los productos mientras están siendo generados, es decir, en tiempo real. Esta técnica cuantifica la fluorescencia de una molécula reportera (sonda), la cual es medida a lo largo del termociclaje.

Para la detección de *X. fastidiosa* mediante qPCR, se sugiere utilizar tres pares de iniciadores y sondas: XF-F y XF-R y la sonda XF-P (Harper *et al.*, 2010; 2013), HL5 y HL6 y la sonda HL-P (Francis *et al.*, 2006) y XF16Sf y XF16Sr y la sonda XF16Sp (Li *et al.*, 2013) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Secuencias de iniciadores y sondas empleados para la qPCR

Tipo	Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')		Tamaño (pb)
Sentido	XF-F	CACGGCTGGTAACGGAAGA		
Antisentido	XF-R	GGTTGCGTGGTGAAATCAAG		
Sonda	XF-P	6FAM-TCCGATCCCGTGGCTCAGTCC-BHQ-1	TaqMan	71
Sentido	HL5	AAGGCAATAAACGCCCACTA		
Antisentido	HL6	GGTTTTGCTGACTGGCAACA		
Sonda	HL-P	FAM-TGGCAGGCAGCAACGATACGGCT-BHQ1	TaqMan	201
Sentido	XF16Sf	CGGCAGCACGTTGGTAGTAA		
Antisentido	XF16Sr	CCGATGTATTCCTCACCCGTC		
Sonda	XF16Sp	FAM-CATGGGTGGCGACTGGC-BHQ1	TaqMan	62

3.1.5.1 Preparación de la muestra

- 1) Descontaminar el área de trabajo, superficies y cabinas de PCR con removedores de ARNasa, DNAasa y DNA. En caso de no contar con alguno de los productos mencionados, la limpieza puede realizarse con una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, después de 15 min limpiar con papel humedecido con agua destilada y finalmente con etanol al 70 % para secar rápidamente las superficies. Adicionalmente, las cabinas deberán descontaminarse con luz UV durante 10 min.
- 2) Diluir el DNA para obtener concentraciones de 20 a 30 ng/ μ L
- 3) Descongelar sobre hielo los reactivos y preparar la mezcla de reacción con las cantidades indicadas en el **Cuadro 7**.

Nota: Utilizar guantes y cubrebocas nuevos.

Cuadro 7. Preparación de la mezcla de reacción para la qPCR

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (μ L) 1X
Buffer de PCR	10X	1X	2.2
MgCl ₂	50 mM	4.0 mM	1.76
dNTP	10 mM	0.3 mM	0.6
Iniciador XF-F, HL5 o XF16Sf	10 μ M	0.3 μ M	0.6
Iniciador XF-R, HL6 o XF16Sr	10 μ M	0.3 μ M	0.6
Sonda XF-P, HL-P o XF16Sp	10 μ M	0.04 μ M	0.1
Taq DNA Pol	5 U/ μ L	0.09 U/ μ L	0.4
DNA	20 – 30 ng/ μ L	3.64 - 9 ng/ μ L	4.0
Agua grado biología molecular	-	-	11.74
		Volumen final	22

Nota: usar tubos o placas ópticas para qPCR de acuerdo al tipo/marca de termociclador utilizado.

- 4) Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en los **Cuadros 8, 9 ó 10**.

Cuadro 8. Programa de termociclaje para los iniciadores XF-F y XF-R y la sonda XF-P

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Estabilización	50 °C	2 min	1
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	94 °C	10 s	39
Hibridación	62 °C	40 s	

Cuadro 9. Programa de termociclaje para los iniciadores HL5 y HL6 y la sonda HL-P

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Estabilización	50 °C	2 min	1
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 s	39
Hibridación	62 °C	60 s	

Cuadro 10. Programa de termociclaje para los iniciadores XF16Sf y XF16Sr y la sonda XF16Sp

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Estabilización	50 °C	2 min	1
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	94 °C	10 s	39
Hibridación	60 °C	40	

3.2 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final y qPCR descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles con una repetición.

Control positivo: provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos de las muestras, en caso de haberlos. El control positivo está conformado por una concentración conocida de DNA genómico o DNA plasmídico.

Control negativo de matriz: corresponde al DNA extraído de tejido vegetal sin *X. fastidiosa*. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos: material que contiene todos los componentes de la reacción, pero sin ácidos nucleicos. Permite descartar falsos positivos y contaminantes en la reacción de PCR.

3.3 Interpretación de resultados

3.3.1 Interpretación de resultados de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- El control positivo con el par de iniciadores FXYgyr499 y RXYgyr907 debe generar un amplicón de 429 pb (**Figura 1**).

- El control positivo con el par de iniciadores RST31 y RST33, debe generar un amplicón de 733 pb (Figura 2).
- El control positivo con el par de iniciadores HL5 y HL6, debe generar un amplicón de 221 pb (Figura 3).
- Los controles negativos de reactivos y de matriz no deberán presentar amplificación en ninguno de los ensayos de PCR.
- Se considerarán con resultado positivo aquellas muestras que amplifiquen el fragmento esperado con los iniciadores correspondientes.
- El resultado es negativo si no hay amplificación del fragmento esperado con el par de iniciadores empleados.

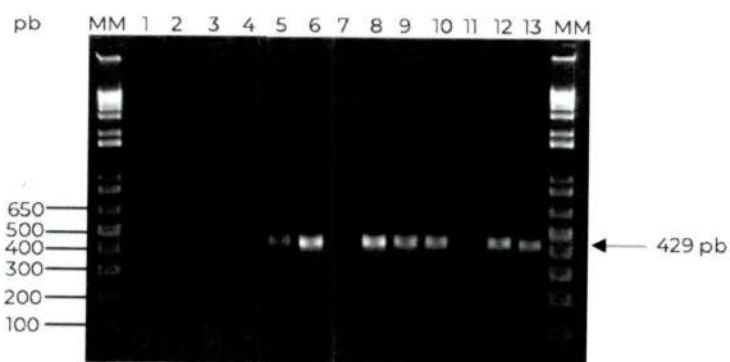


Figura 1. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores FXYgyr499 y RXYgyr907. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7), 8), 9) y 10) Muestras. 11) Sin muestra. 12) y 13) Muestra. Marcador Molecular (MM) 1 Kb. Amplicón esperado de 429 pb

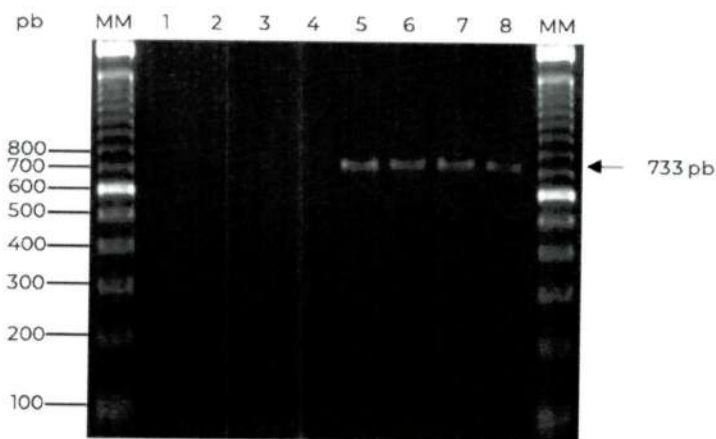


Figura 2. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores RST31 y RST33. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7) y 8) Muestra. Marcador Molecular (MM) 100 pb. Amplicón esperado de 733 pb

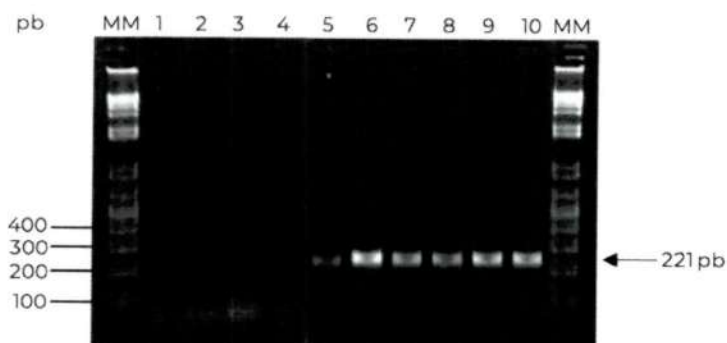


Figura 3. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores HL5 y HL6. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7), 8), 9) y 10) Muestras. Marcador Molecular (MM) 1 Kb. Amplificación esperada de 221 pb

3.3.2 Interpretación de resultados de PCR tiempo real

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- El control positivo con el par de iniciadores y sonda empleados, deberán generar un valor de cuantificación (Cq por sus siglas en inglés de *Cycle of quantification* o Ct de *Cycle threshold*) Cq mayor a 15.00 y menor a 35.00 (Figura 4a).
- El control negativo de reactivos con el par de iniciadores y sonda empleados, deberá permanecer en la línea basal por debajo del umbral establecido "Threshold" (Figura 4d) y no deberá presentar ningún valor de cuantificación (Cq = N/A / Cq = 0.00) (Figura 4c).
- Se considera como resultado positivo a aquellas muestras que generen un valor de Cq ≥ 15.00 y ≤ 35.00 (Figura 4b).
- Se considera como resultado negativo a aquellas muestras que generen un Cq = 0.00 o mayor a 35.00.

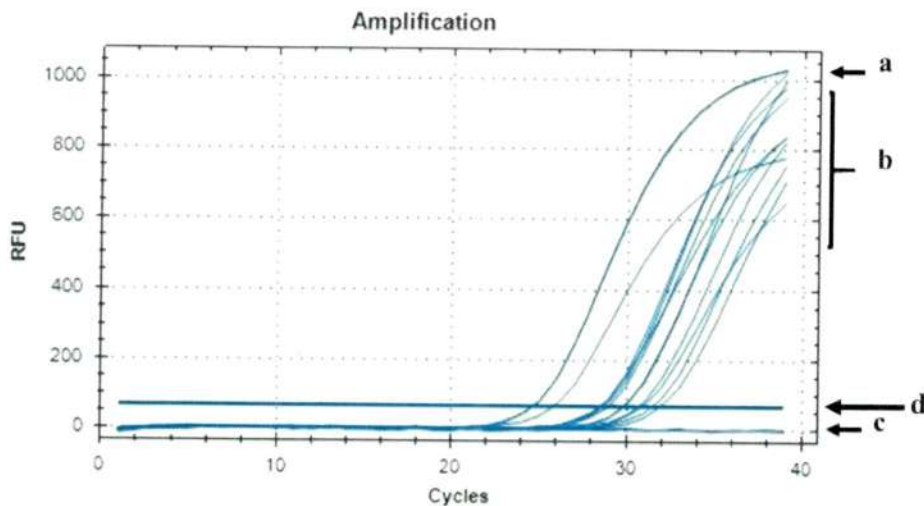


Figura 4. Amplificación de las muestras mediante qPCR con los iniciadores XF-F y XF-R y sonda la XF-P. Unidades de fluorescencia relativa frente a los ciclos de amplificación a) Control positivo. b) Muestras y c) Control negativo de reactivos. d) Umbral (threshold). Fluoróforo FAM. Valor de cuantificación esperado, $Cq \geq 15,00$ y $\leq 35,00$

3.4 Identificación del patógeno

Para reportar la identificación positiva de *X. fastidiosa*, es necesario la detección en conjunto de las siguientes pruebas: amplificación positiva del ensayo de PCR punto final con al menos dos pares de iniciadores (**Cuadro 1**) y amplificación positiva del ensayo de qPCR con al menos un par de iniciadores (**Cuadro 6**).

Como prueba de corroboración, se sugiere secuenciar el amplicón obtenido en el ensayo de PCR punto final de al menos dos de los pares de iniciadores mencionados.

En caso de detectar a *X. fastidiosa* en un cultivo diferente a *vid*, u otra subespecie es necesario que se envíe al CNRF para su corroboración y realizar pruebas de patogenicidad.

3.5 MLST (Multilocus sequence typing) para la identificación de la subespecie de *X. fastidiosa*

Esta técnica permite asignar la Secuencia Tipo (ST por sus siglas en inglés de *Sequence Typing*) a la que corresponde cada aislamiento de *X. fastidiosa* y con cuál de la subespecie se agrupa. Fue propuesto en 2010 por Yuan y colaboradores.

Realizar la amplificación individual de los siete genes de mantenimiento (**Cuadro 11**): 2-isopropylmalate synthase (*leuA*); ubiquinol cytochrome c oxidoreductase C1 subunit (*petC*); ABC transporter sugar permease (*malF*); sirohaem synthase (*cysG*); DNA polymerase III holoenzyme chi subunit (*holC*); NADH- ubiquinone

oxidoreductase NQO12 subunit (*nuoL*); and glutamate symport protein (*gltT*). El flujo de trabajo de esta técnica se puede consultar en la base de datos de MLST de *Xylella fastidiosa* (<http://pubmlst.org/xfastidiosa>).

Cuadro II. Secuencias de iniciadores empleados en el MLST

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)
Sentido	<i>leuA</i> -for	GGTGCACGCCA AATCGAATG	708
Antisentido	<i>leuA</i> -rev	GTATCGTTGTGGCGT ACACTG	
Sentido	<i>petC</i> -for	GCTGCCATTTCG TTGAAGTACCT	533
Antisentido	<i>petC</i> -rev	GCACGTCCTCCCAAT AAGCCT	
Sentido	<i>malF</i> -for	TTGCTGGTCTT GCGGTGTTG	730
Antisentido	<i>malF</i> -rev	GACAGCAGAAGCAC GTCCCAGAT-	
Sentido	<i>cysG</i> -for	GCCGAAGCAGT GCTGGAAG	600
Antisentido	<i>cysG</i> -rev	GCCATTTTCGATCAG TGCAAAAG	
Sentido	<i>holC</i> -for	ATGGCAGCGGC CGACTTCT-	379
Antisentido	<i>holC</i> -rev	ATGTCGTGTTTGTTC ATGTGCAGG-	
Sentido	<i>nuoL</i> -for	TAGCGACTTAC GGTTACTGGCC-	557
Antisentido	<i>nuoL</i> -rev	ACCACCGATCCACA ACGCAT	
Sentido	<i>gltT</i> -for	TCATGATCCAAA TCACTCGCTT-	654
Antisentido	<i>gltT</i> -rev	ACTGGACGCTGCCTC GTAAACC-3	

3.5.1 Preparación de la muestra

- 1) Descontaminar el área de trabajo, superficies y cabinas de PCR con removedores de ARNasa, DNAasa y DNA. En caso de no contar con alguno de los productos mencionados, la limpieza puede realizarse con una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, después de 15 min limpiar con papel humedecido con agua destilada y finalmente con etanol al 70 % para secar rápidamente las superficies. Adicionalmente, las cabinas deberán descontaminarse con luz UV durante 10 min.
- 2) Diluir el DNA para obtener concentraciones de 20 a 30 ng/μL

- 3) Descongelar sobre hielo los reactivos y preparar la mezcla de reacción con las cantidades indicadas en el **Cuadro 12**.

Nota: Utilizar guantes y cubrebocas nuevos.

Cuadro 12. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final del MLST

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (μL) 1X
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.16 mM	0.4
Primer Sentido	10 μM	0.4 μM	1.0
Primer Antisentido	10 μM	0.4 μM	1.0
Taq DNA Pol	5 U/ μL	0.06 U/ μL	0.3
DNA	20 – 30 ng/ μL	4 - 10 ng/ μL	5.0
Agua grado biología molecular			14.05
		Volumen final	25

- 4) Programar el termociclador de acuerdo en lo indicado en el **Cuadro 13**.

Nota: Las condiciones de amplificación son las mismas para todos los pares de iniciadores del MLST.

Cuadro 13. Programa de termociclaje para los iniciadores del MLST

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	35
Hibridación	65 °C	30 s	
Extensión	72 °C	60 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1

- 5) Los productos de PCR (10 μL) mezclados con 3 μL de *buffer* de corrida (naranja G 6X) previamente teñido con GelRed™ deben correrse por electroforesis durante 60 min a 95 V en un gel de agarosa al 1.5 % en *buffer* TAE 1X. Incluir en ambos extremos del gel un marcador de peso molecular que permita estimar el tamaño del amplicón.

Nota: el tiempo y voltaje aplicados en la electroforesis dependerá del tamaño de la cámara utilizada, de acuerdo con ello ajustar estos dos parámetros.

Nota: sí se utiliza el método de tinción con GelRed se sugiere teñir previamente el *buffer* de corrida con GelRed™, adicionando 10 µL del colorante a 2 mL de *buffer* de corrida (naranja G 6X). Mezclar perfectamente para su utilización y almacenar a 4 °C.

Nota: Puede utilizarse otro método de tinción como el bromuro de etidio siempre y cuando permita la interpretación de los resultados.

- 6) Es importante verificar que los productos de PCR amplificados corresponden con el número de pares de bases (bp) reportado para cada gen (**Cuadro 11**). También resulta necesario que exista solo un solo amplicón, es decir, que no se presenten amplificaciones inespecíficas (**Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11**).

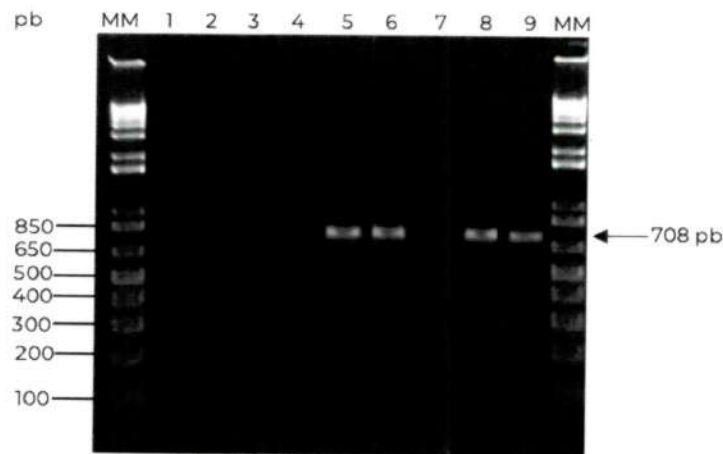


Figura 5. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores *leuA*-for y *leuA*-rev. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7) Sin muestra. 8) y 9) Muestra. Marcador Molecular (MM) 1 Kb. Amplicón esperado de 708 pb

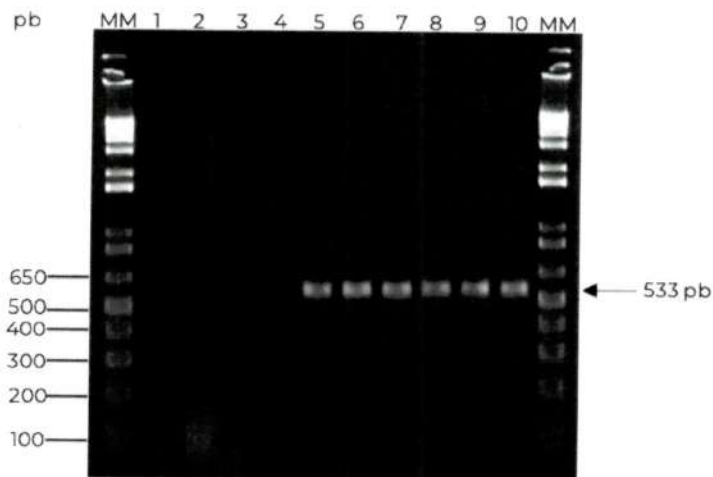


Figura 6. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores *petC*-for y *petC*-rev. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7), 8), 9) y 10) Muestras. Marcador Molecular (MM) 1 Kb. Amplificación esperada de 533 pb

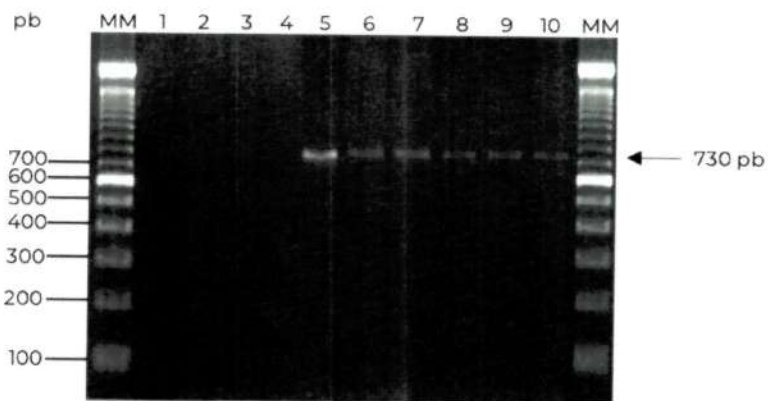


Figura 7. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores *malF*-for y *malF*-rev. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7), 8), 9) y 10) Muestras. Marcador Molecular (MM) 100 pb (Invitrogen). Amplificación esperada de 730 pb

JP
 /
 /

h
 β

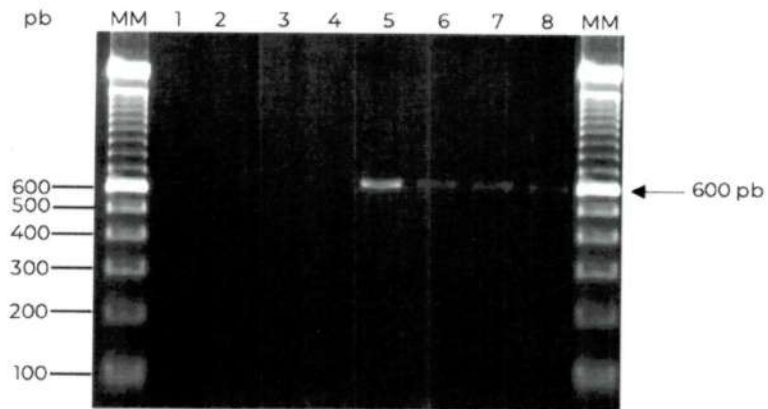


Figura 8. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores *cysG*-for y *cysG*-rev. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7) y 8) Muestra. Marcador Molecular (MM) 100 pb. Amplicón esperado de 600 pb

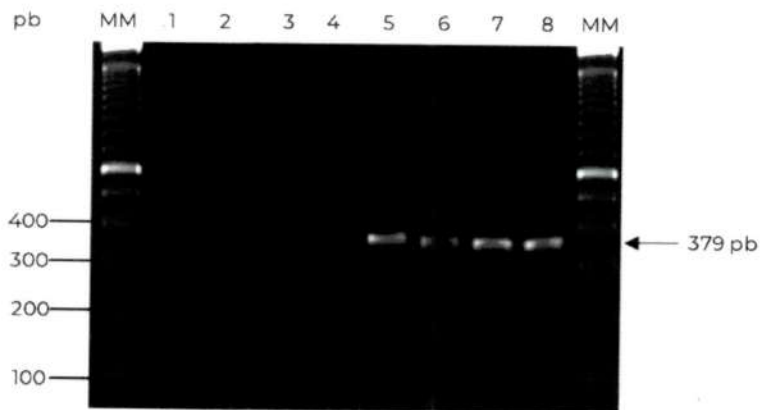


Figura 9. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores *holC*-for y *holC*-rev. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7) y 8) Muestra. Marcador Molecular (MM) 100 pb. Amplicón esperado de 379 pb

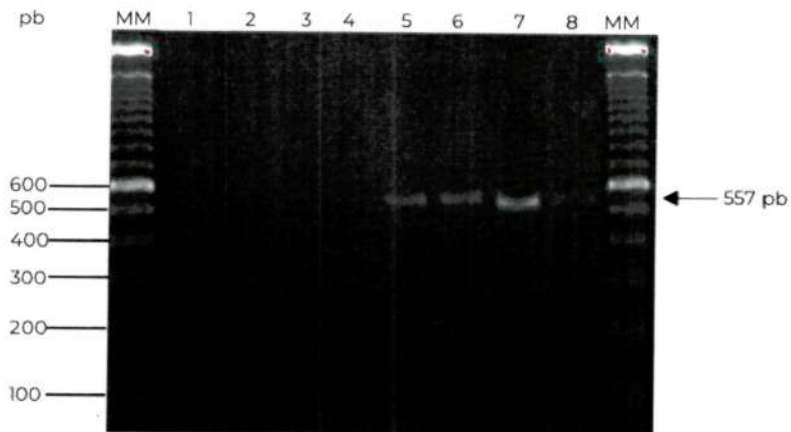


Figura 10. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores *nuoL*-for y *nuoL*-rev. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7) y 8) Muestra. Marcador Molecular (MM) 100 pb. Amplicón esperado de 557 pb

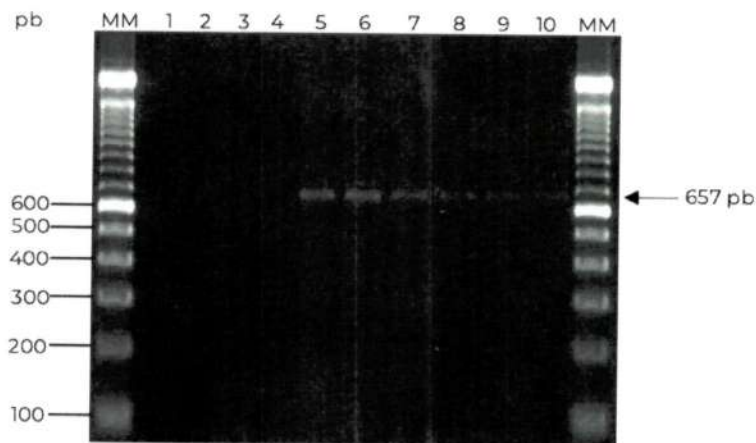


Figura 11. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores *gltT*-for y *gltT*-rev. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo (DNA genómico de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ATCC® 35879™). 7), 8), 9) y 10) Muestras. Marcador Molecular (MM) 100 pb. Amplicón esperado de 657 pb

- 7) Los productos de PCR de los siete genes MLST deben enviarse a secuenciar de forma individual.
- 8) La secuencias de cada gen se deben comparar con los alelos del gen correspondiente reportados en la base de datos de datos de MLST de *Xylella*

fastidiosa (<http://pubmlst.org/xfastidiosa>), con ello se determina con cual alelo tiene identidad. La combinación del número de alelos por cada gen determina la Secuencia tipo (ST) y de igual forma determina la subespecie a la que pertenece.

Cuadro 14. Relación entre Secuencias Tipo y subespecies de *Xylella fastidiosa* (OEPP/EPP0, 2019)

ST	leuA	petC	malF	cysG	hoIC	nuoL	gIT	subsp	Referencia
1	1	1	1	1	1	1	1	<i>fastidiosa</i>	Yuan et al., (2010)
2	1	1	4	1	1	1	1	<i>fastidiosa</i>	Yuan et al., (2010)
3	1	1	1	20	1	1	1	<i>fastidiosa</i>	Yuan et al., (2010)
4	1	1	1	4	1	1	1	<i>fastidiosa</i>	Yuan et al.,(2010)
5	2	2	2	2	2	2	2	<i>sandyi</i>	Yuan et al., (2010)
6	3	3	3	3	3	3	3	<i>multiplex</i>	Yuan et al., (2010)
7	3	3	3	7	3	3	3	<i>multiplex</i>	Yuan et al., (2010)
8	3	3	5	5	4	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
9	3	3	5	5	4	3	4	<i>multiplex</i>	Yuan et al., (2010)
10	5	4	3	3	6	3	5	<i>multiplex</i>	Yuan et al., (2010)
11	7	7	7	9	10	8	8	<i>pauca</i>	Nunney et al., (2013)
12	7	7	7	9	13	8	8	<i>pauca</i>	Nunney et al., (2013)
13	7	6	7	9	10	7	8	<i>pauca</i>	Yuan et al., (2010)
14	8	8	8	11	12	9	9	<i>pauca</i>	Yuan et al., (2010)
15	5	3	3	3	4	3	5	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
16	7	6	8	10	11	8	8	<i>pauca</i>	Nunney et al., (2013)
17	1	1	10	12	18	10	1	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
18	9	1	9	13	14	5	10	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
19	10	1	10	14	15	11	1	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
20	1	1	10	12	17	11	11	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
21	10	1	10	14	15	11	12	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
22	3	3	5	12	4	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
23	3	3	5	3	6	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
24	3	3	5	3	4	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
25	3	3	3	17	3	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
26	5	3	3	3	6	3	5	<i>multiplex</i>	Yuan et al. (2010)
27	6	3	5	6	7	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
28	6	3	5	18	7	4	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)

29	4	3	6	18	5	4	3	<i>morus</i>	Nunney et al., (2013)
30	4	5	6	8	5	4	3	<i>morus</i>	Nunney et al., (2013)
31	4	3	6	18	8	6	3	<i>morus</i>	Nunney et al., (2013)
32	4	3	5	12	4	4	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
33	11	9	14	15	19	13	10	<i>fastidiosa/s andyi</i>	Yuan et al. (2010)
34	3	3	3	3	3	3	6	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
35	3	10	3	3	3	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
36	5	3	5	19	6	3	5	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
37	3	3	5	21	4	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
38	3	3	5	16	4	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
39	3	3	5	19	4	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
40	6	3	5	18	7	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
41	3	3	5	18	9	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
42	6	3	5	12	4	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
43	3	3	5	18	4	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
44	3	3	5	5	6	3	4	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
45	3	3	5	3	4	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
46	5	3	3	3	6	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
47	13	1	10	23	20	5	1	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
48	3	3	12	3	6	3	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
49	3	3	5	3	6	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
50	3	11	13	22	21	14	13	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
51	3	3	5	3	4	15	3	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
52	10	1	10	14	18	10	1	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
53	7	6	16	24	10	16	14	<i>pauca</i>	Nunney et al., (2013)
54	11	9	11	25	19	12	1	<i>fastidiosa/s andyi</i>	Nunney et al., (2013)
55	1	1	10	12	18	10	10	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
56	11	9	11	15	17	12	10	<i>fastidiosa/s andyi</i>	Nunney et al., (2013)
57	1	1	10	12	18	11	11	<i>fastidiosa</i>	Nunney et al., (2013)
58	6	3	5	12	4	3	7	<i>multiplex</i>	Nunney et al., (2013)
59	9	1	9	13	14	5	1	<i>fastidiosa</i>	L. Nunney (pers. comm.)
60	9	1	1	13	14	5	1	<i>fastidiosa</i>	L. Nunney (pers. comm.)
61	11	9	11	15	16	12	10	<i>fastidiosa/s andyi</i>	Nunney et al., (2013)

62	4	3	6	18	5	6	3	<i>morus</i>	Nunney et al., (2013)
63	5	6	3	3	6	3	5	<i>multiplex</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
64	7	7	7	9	10	7	8	<i>pauca</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
65	7	6	7	9	10	8	8	<i>pauca</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
66	7	8	8	10	11	8	8	<i>pauca</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
67	5	3	8	3	12	3	5	<i>multiplex</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
68	14	8	8	11	12	9	8	<i>pauca</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
69	7	6	7	9	23	17	8	<i>pauca</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
70	14	7	8	11	22	9	8	<i>pauca</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
71	5	8	8	11	12	9	9	<i>pauca</i>	Coletta-Filho et al., (2017)
72	12	12	15	26	24	18	1	<i>sandyi</i>	Loconsole et al., (2016)
73	7	6	8	27	10	16	8	<i>pauca</i>	Loconsole et al., (2016)
74	7	6	8	28	25	16	8	<i>pauca</i>	Jacques et al., (2016)
75	9	1	10	29	1	19	1	<i>fastidiosa</i>	Jacques et al., (2016)
76	12	13	15	26	24	18	1	<i>sandyi</i>	Loconsole et al., (2016)
77	1	1	6	30	26	5	1	<i>fastidiosa</i>	Bergsma-Vlami et al., (2017)
78	7	6	7	9	23	8	8	<i>Pauca</i>	Tolocka et al., (2017)
79	3	3	3	26	3	3	3	<i>multiplex</i>	Denanc_e et al., (2017)
80	7	6	17	31	10	16	15	<i>pauca</i>	B. Landa (pers. comm.)
81	3	3	3	32	3	3	3	<i>multiplex</i>	B. Landa (pers. comm.)
82	3	3	5	12	4	3	16	<i>multiplex</i>	Ferguson (2016)
83	6	3	5	33	7	4	7	<i>multiplex</i>	Ferguson (2016)
84	7	6	7	34	10	20	8	<i>pauca</i>	Safady et al., (2019)
85	7	6	8	10	10	8	8	<i>pauca</i>	Safady et al., (2019)
86	7	6	8	10	11	20	8	<i>pauca</i>	Safady et al., (2019)
87	5	3	5	3	3	21	3	<i>multiplex</i>	Marchi et al., (2019), Saponari et al., (2019)

En caso de que se quiera esquematizar las ST en un árbol filogenético, se deben descargar las secuencias de los siete genes de las 87 ST de referencia en la página (<http://pubmlst.org/xfastidiosa>).

Posteriormente se deben concatenar los siete genes del aislamiento de interés y se debe realizar el alineamiento múltiple (**Clustal W, Clustal O, Clustal X, MUSCLE, MAFFT, T-Coffee, etc.**) de los siete genes concatenados, incluyendo las ST de referencia.

La inferencia filogenética puede realizarse en el programa **MEGA** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), en donde se debe seleccionar el método (**Maximum Likelihood, Neighbor-Joining, Minimum Evolution, UPGMA, Maximum Parsimony, etc.**) y el modelo de sustitución nucleotídica (**Jukes-Cantor JC, Kimura 2 parametros KP2, Felsenstein F81, Hasegawa-Kishino-Yano HKY85, Tamura-Nei 1993 TN93, etc.**). También se puede realizar inferencia Bayesiana (**MrBayes**).

La visualización y edición del árbol reconstruido puede realizarse en **Figtree** ó **iTOL** (Interactive Tree of Life) (**Figura 12**).

Handwritten initials or signature in blue ink.

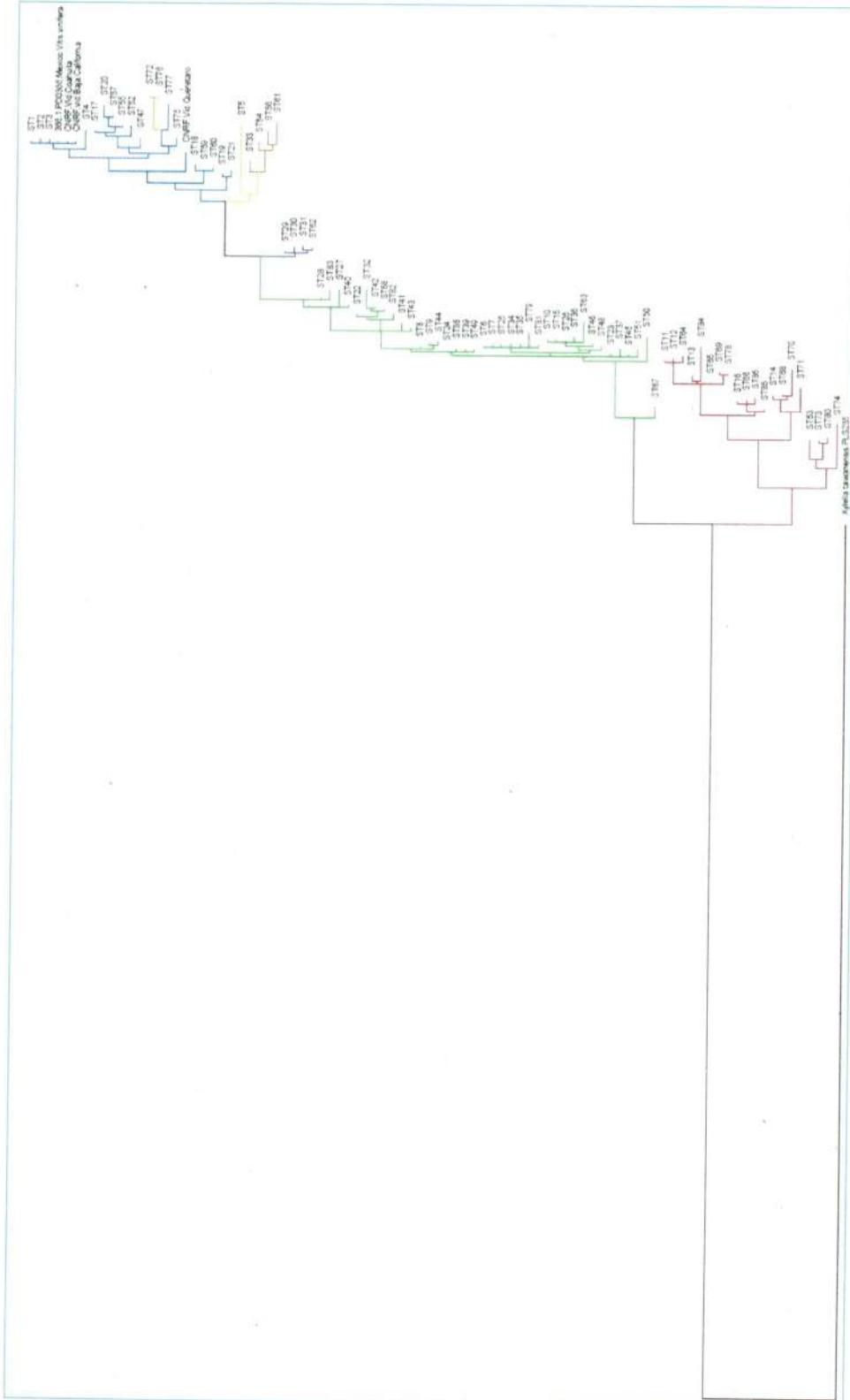


Figura 12. Filogenia de subespecies de *X. fastidiosus*. Árbol inferido mediante método bayesiano empleando siete genes concatenados, incluyendo secuencias de las 87 ST de *X. fastidiosus* más las muestras denominadas: vid Coahuila, vid Baja California y vid Querétaro. Se utilizó a *X. taiwanensis* como nodo raíz externo al grupo

Handwritten initials or signature in blue ink.

3.6 Detección de subespecies de *Xylella fastidiosa* por qPCR

Hasta 2020 se tienen reportados varios pares de iniciadores que permiten la detección de las diferentes subespecies de *X. fastidiosa* (Dupas *et al.*, 2019).

Cuadro 15. Secuencias de iniciadores empleados para detectar subespecies de *Xylella fastidiosa* por qPCR

Tipo	Nombre del iniciador	Secuencia (5'–3')	Tamaño (pb)	subespecie
Sentido	XFF-F	TTACATCGTTTTCGCGCACC	100	<i>fastidiosa</i>
Antisentido	XFF-R	TCCGGTTGATCGCAATACCCA		
Sonda	XFF-P	HEX-CCCAGACTCGGCGCGGTTCCA-BHQ1		
Sentido	XFFSL-F	TAGTATGCGTGCGAGCGAC	75	<i>fastidiosa</i>
Antisentido	XFFSL-R	CGCAATGCACACCTAAGCAA		
Sonda	XFFSL-P	HEX-CGCGTACCCACTCACGCCGC-BHQ1		
Sentido	XFM-F	ACGATGTTTGAGCCGTTTGC	88	<i>multiplex</i>
Antisentido	XFM-R	TGTCACCCACTACGAAACGG		
Sonda	XFM-P	ROX-ACGCAGCCCACCACGATTTAGCCG-BHQ2		
Sentido	XFMO-F	TAACGCTATCGGCAGGTAGC	123	<i>morus</i>
Antisentido	XFMO-R	GCATCAGCTTCACGTCTCCT		
Sonda	XFMO-P	CY5-GGTTCCGCACCTCACATATCCGCC-BHQ2		
Sentido	XFP-F	TGCGTTTTCTAGGTGGCAT	154	<i>pauca</i>
Antisentido	XFP-R	GTTGGAACCTTGAATGCCCA		
Sonda	XFP-P	CY5-CCAAAGGCCGCCACCTCCG-BHQ2		

3.6.1 Preparación de la muestra

- 1) Descontaminar el área de trabajo, superficies y cabinas de PCR con removedores de ARNasa, DNAasa y DNA. En caso de no contar con alguno de los productos mencionados, la limpieza puede realizarse con una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, después de 15 min limpiar con papel humedecido con agua destilada y finalmente con etanol al 70 % para secar rápidamente las superficies. Adicionalmente, las cabinas deberán descontaminarse con luz UV durante 10 min.
- 2) Diluir el DNA para obtener concentraciones de 20 a 30 ng/μL

- 3) Descongelar sobre hielo los reactivos y preparar la mezcla de reacción con las cantidades indicadas en el **Cuadro 16**. Utilizar guantes y cubrebocas nuevos.

Nota: Se puede emplear por separado cada par de iniciadores (con su respectiva sonda), o en mezcla de hasta cuatro pares (multiplex). Es importante indicar que no se deben utilizar los iniciadores y sonda de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (XFF-F/XFF-R/XFF-P) y *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* sensu largo (XFFSL-F/XFFSL-R/XFFSL-P) en la misma mezcla de reacción ya que están marcados con HEX. De igual forma no utilizar los iniciadores y sonda de *X. fastidiosa* subsp. *morus* (XFMO-F/XFMO-R/XFMO-P) y *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (XFP-F/XFP-R/XFP-P) en la misma mezcla de reacción ya que están marcados con CY5.

Cuadro 16. Preparación de la mezcla de reacción para detectar subespecies de *X. fastidiosa* por qPCR

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10X	1X	2.2
MgCl ₂	50 mM	1.72 mM	0.76
dNTP	10 mM	0.27 mM	0.6
Iniciador sentido	10 µM	0.27 µM	0.6
Iniciador antisentido	10 µM	0.27 µM	0.6
Sonda	10 µM	0.2 µM	0.44
Taq DNA Pol	5 U/µL	0.09 U/µL	0.4
DNA	20 – 30 ng/µL	3.64 - 9 ng/µL	4.0
Agua grado biología molecular	-	-	12.4
		Volumen final	22

Nota: usar tubos o placas ópticas para qPCR de acuerdo al tipo/marca de termociclador utilizado.

- 4) Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el **Cuadro 17**.

Cuadro 17. Programa de termociclaje para detectar subespecies de *Xylella fastidiosa* por qPCR

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1

SHR
B

h

Desnaturalización	95 °C	15 s	40
Hibridación	60 °C	30 s	

4. REGISTROS

Conservar los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de *X. fastidiosa* con forme al Sistema de gestión de Calidad de la institución.

- Mantener el material vegetal que no fue utilizado en el diagnóstico con los datos de identificación, en refrigeración a 4 °C (± 2 °C) hasta finalizar el proceso de diagnóstico.
- Mantener los insectos en su empaque original con alcohol etílico al 70 % y con los datos de identificación, a temperaturas de entre 21 y 23 °C, hasta finalizar el proceso de diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal.
- Inactivar y desechar el DNA total extraído.
- Inactivar y desechar los insectos.

Nota: esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 °C y 15 lb/in² de presión manométrica.

En caso de obtener un resultado positivo:

- Resguardar el material vegetal en un ultracongelador a -80 °C (± 2 °C) al menos por un año.
- Resguardar los insectos a temperaturas de entre 21 y 23 °C al menos por un año.
- Mantener el DNA obtenido en congelación a -20 °C (± 2 °C) o en un ultracongelador a -80 °C (± 2 °C) al menos por un año.
- Mantener los registros de los resultados de las pruebas moleculares (incluyendo fotografías de los geles, curvas de qPCR y secuencias, cuando aplique).

EH²
S
mi

h
B

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.bacteriologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 5905 1000, ext. 51314 y 51333.

6. RECONOCIMIENTO

Al Ing. Francisco Javier López Rosas por el ajuste y edición del documento. Al Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario (CONACOFI) por la coordinación de la consulta técnica. A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez, Instituto de Fitosanidad (Colegio de Postgraduados) y a la Dra. Rufina Hernández Martínez, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, B. C. (CICESE) por su revisión técnica.

7. REFERENCIAS

CABI. (2019). *Xylella fastidiosa* (Pierce's disease of grapevines). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/57195>

Dupas, E., Briand, M., Jaques, M-A., Cesbron, S. (2019). Novel tetraplex qPCR assays for simultaneous detection and identification of *Xylella fastidiosa* subspecies in plant tissues. *Frontiers in Plant Science*. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01732>

EFSA. (2018). Update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*: 20 November 2015. *EFSA Journal*, 14(2), 1–40. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4378>

Francis, M., Lin, H., Cabrera-La rosa, J., Doddapaneni, H., and Civerolo, E. L. (2006). Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* 115: 203–213. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9009-4>

Harper, S. J., Ward, L. I., and Clover, G. R. G. (2010). Development of LAMP and Real-Time PCR Methods for the Rapid Detection of *Xylella fastidiosa* for Quarantine and Field Applications. *Phytopathology* 100: 1282–1288. <https://doi.org/10.1094 / PHYTO-06-10-0168>

Harris, J. L., and Balci, L. (2015). Population Structure of the Bacterial Pathogen *Xylella fastidiosa* among Street Trees in Washington D.C. *PLoS ONE*, 10:1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121297>

He, C. X., Li, W. B., Ayres, A. J., Hartung, J. S., Miranda, V. S., and Teixeira, D. C. (2000). Distribution of *Xylella fastidiosa* in Citrus Rootstocks and Transmission of Citrus Variegated Chlorosis Between Sweet Orange Plants Through Natural Root Grafts. *Plant Disease* 84: 622–626.

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO-06-10-0168>

IPPC. (2018). ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 25: *Xylella fastidiosa*. International Plant Protection Convention, pp. 1–32. https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2018/09/DP_25_2018_Xylellafastidiosa_2018-09-21.pdf

Lee, R. F., Derrick, K. S., Beretta, M. J. G., Chagas, C. K., and Rossetti, V. (1991). Citrus variegated chlorosis: A new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry* 72: 10–13.

Li W., Teixeira D. C., Hartung J. S., Huang Q., Duan Y., Zhou L. *et al.* (2013) Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Journal of Microbiological Methods* 92: 79–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.10.008>

Minsavage, V. G., Thompson, M. C., D., H. L., Leite, R. M. V. B. C., and Stall, R. E. (1994). Development of a Polymerase Chain Reaction Protocol for Detection of *Xylella fastidiosa* in Plant Tissue. *Phytopathology* 84: 456–461. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1994Articles/Phyto84n05_456.PDF

Nunney, L., Schuenzel, L. E., Scally, M., Bromley, R. E., and Stouthamer, R. (2014). Large-Scale Intersubspecific Recombination in the Plant-Pathogenic Bacterium *Xylella fastidiosa* Is Associated with the Host Shift to Mulberry. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 3025–3033. <https://doi.org/10.1128/AEM.04112-13>

OEPP/EPPO. (2019). PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. EPPO Bulletin, 48: 175–218. <https://doi.org/10.1111/epp.12469>

Randall, J. J., Goldberg, N. P., Kemp, J. D., Radionenko, M., French, J. M., Olsen, M. W., and Hanson, S. F. (2009). Genetic Analysis of a Novel *Xylella fastidiosa* Subspecies Found in the Southwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 5631–5638. <https://doi.org/10.1128/AEM.00609-09>

Rodrigues, J. L. M., Silva-Stenico, M. E., Gomes, J. E., Lopes, J. R. S., and Tsai, S. M. (2003). Detection and Diversity Assessment of *Xylella fastidiosa* in Field-Collected Plant and Insect Samples by Using 16S rRNA and gyrB Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4249–4255. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4249>

Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M., Barek, and Chung-Jan, C. (2004). *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Systematics and Applied Microbiology*, 27: 290–300. https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41245242/Xylella_fastidiosa_subspecies_X_fastidi20160114-5392-2w31y9.pdf20160115-19908-1cz6lnp.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DXylella_fastidiosa_subspecies_X_fastidi.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20191216%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20191216T205833Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=27947670c677ef0656f76833e390c91ecf35651a485c920d8f208513bae4158c

Schuenzel, E. L., Scally, M., Stouthamer, R., and Nunney, L. (2005). A Multigene Phylogenetic Study of Clonal Diversity and Divergence in North American Strains of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3832–3839. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3832>

Senasica. (2018). Octavo informe mensual. Campaña contra la enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*). Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/396451/8_Informe_Agosto_Pierce_2018.pdf

Senasica. (2019). Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Cd. de México. Ficha Técnica No. 26. 14 p

Varani, A. M., Monteiro-Vitorello, C. B., Nakaya, H. I., and Marie-Anne, V. S. (2013). The Role of Prophage in Plant-Pathogenic Bacteria. Annual Review of Phytopathology, 51: 429–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173010>

Wells, J. M., Raju, B. C., Hsueh-Yun, H., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D. J. (1987). *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: Gram-Negative, Xylem Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas* spp. International Journal of Systematic Bacteriology, 37: 136–143. <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/37/2/ijis-37-2-136.pdf?expires=1576536248&id=id&accname=guest&checksum=324E30D5C490F568E3A9D245211D0B68>

Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R., Nunney, L. (2010). Multilocus Sequence Typing of *Xylella fastidiosa* Causing Pierce's Disease and Oleander Leaf Scorch in the United States. Phytopathology 100:601-6, <https://doi.org/10.1094/phyto-100-6-0601>



Forma recomendada de citar:

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2021). Protocolo de Diagnóstico: *Xylella fastidiosa* y sus subespecies [Versión 2.0]. Autor.



8. ANEXO

8.1 Síntomas

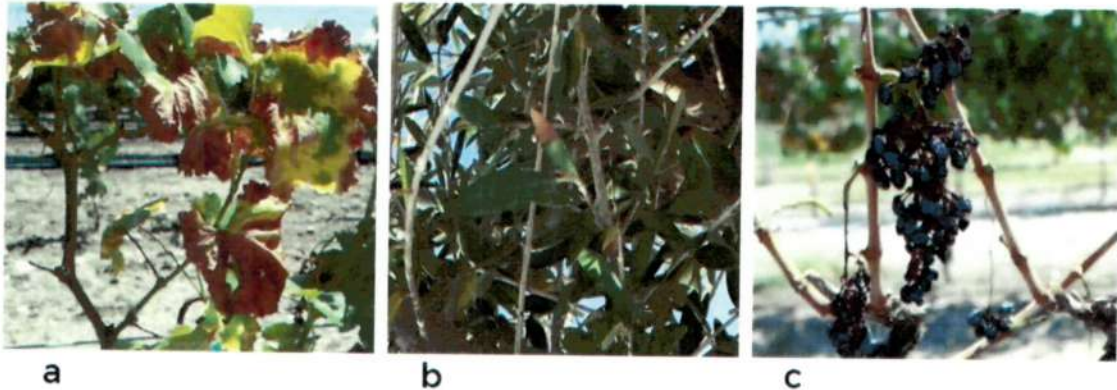


Figura 13. Síntomas de *Xylella fastidiosa*. a) Quemadura de las hojas, desprendimiento de hojas y maduración irregular de la rama/tallo. b) Quemadura marginal de hoja en olivo. c) Momificación de frutos en vid.

8.2 Consideraciones para el envío de muestra

En campo se deben seleccionar, tomar y enviar hojas (20 hojas) y tallos (1 a 2 tallos de 20 cm de longitud) con síntomas de la enfermedad (Figura 13 a y c), colocarlos cuidadosamente en toallas de papel secante e introducirlos en bolsas de plástico con cierre hermético. Identificar correctamente las muestras y enviarlas en hielera con geles refrigerantes a fin de evitar la oxidación de las mismas. El envío debe realizarse el mismo día de la colecta, de no ser posible, las muestras deben resguardarse a 4 °C (± 2 °C) y enviarse al día siguiente.

8.3 Extracción de DNA total con CTAB 2 %

- 1) Colocar la muestra en mortero estéril y macerar con nitrógeno líquido hasta obtener consistencia de polvo. En caso de no contar con nitrógeno líquido, la muestra puede ser congelada a -80 °C y posteriormente macerarse.

La lisis del tejido también puede hacerse con matrices que contengan perlas de cerámica (Lysing Matrix M, MP Biomedicals).

- 2) Depositar el polvo (producto del macerado) en un tubo estéril de 2 mL y agregar 1.5 mL de *buffer* bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés de *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) al 2% (Anexo 8.4, **Buffer CTAB 2 %**) previamente calentado a 80 °C y 100 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.
- 3) Incubar los tubos con las muestras en baño María a 80 °C por 15 min.

- 4) Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente de 3 a 5 min y centrifugar 15 min a 13 000 x g.
- 5) Transferir 1000 μL del sobrenadante a otro tubo estéril de 2 mL y agregar 500 μL de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar por inversión (este paso puede realizarse dos veces).
- 6) Centrifugar a 13 000 x g durante 15 min y transferir de 500 a 700 μL del sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 mL.
- 7) Agregar $\frac{1}{2}$ volumen de una mezcla de etanol: metanol: ácido acético glacial (9:3:1), mezclar por inversión (si es posible, dejar toda la noche a 4°C o bien 60 min a -20 °C) y centrifugar a 13 000 xg por 10 min.
- 8) Decantar el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla y lavarla con 500 μL de una mezcla de etanol: agua: metanol: acetato de sodio 3M (30:9:5:1) (**Sección 8.4 Acetato de sodio 3 M**). Centrifugar a 13 000 x g por 5 minutos.
- 9) Decantar el sobrenadante, sin perder la pastilla y lavarla con 500 μL de etanol al 70 %. Centrifugar a 13 000 x g por 5 min.
- 10) Dejar secar la pastilla y resuspender en 50 o 100 μL de agua grado biología molecular.

CH²
-8
-

h
↑

8.4 Soluciones

Buffer CTAB 2 %

Reactivo	Cantidad
CTAB	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	82.0 g
Tris base	2.42 g
EDTA	1.46 g
Agua destilada	1000 mL

Mezclar los reactivos y agregar lentamente 750 mL de agua. Si permanecen grumos, calentar en microondas o en parrilla hasta ebullición y seguir agitando. Aforar a 1000 mL y esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 °C.

Acetato de sodio 3M

Reactivo	Cantidad
Acetato de sodio	180.55 g
Ácido acético glacial	45.7 mL
Agua destilada	1000 mL

Disolver el acetato de sodio en 500 mL de agua y agregar lentamente el ácido acético glacial. Ajustar el pH a 5.2 y aforar a 1000 mL.

Buffer naranja G 6X

Reactivo	Cantidad
Naranja G	60 mg
Glicerol	18 mL
Agua	40 mL

Aforar la mezcla a 50 mL y almacenar a 4 °C.

9. HISTORIAL DE CAMBIOS

Protocolo de Diagnóstico: *Xylella fastidiosa* y sus subespecies

Revisión	Versión	Fecha	Resumen de la modificación	Páginas afectadas	Responsable
01	01	05.12.2017	Creación del documento	Todo el documento	Laboratorio de Bacteriología
02	1.0	24.05.2018	Se incorporó al Protocolo la técnica de PCR tiempo real	19 y 22	Laboratorio de Bacteriología
03	2.0	25.05.2020	Se actualizó el formato, se cambió la estructura y redacción del protocolo Se anexaron las instrucciones para realizar el análisis MSLT	Todo el documento	Laboratorio de Bacteriología
04	2.0	26.11.2020	Revisión técnica	Todo el documento	Laboratorio de Bacteriología Grupo colegiado
05	2.0	10.02.2021	Revisión técnica	Todo el documento	CONACOFI: Dra. Reyna I. Rojas Martínez y Dra. Rufina Hernández Martínez
06	2.0	30.06.2021	Ajuste y corrección técnica indicadas por el CONACOFI	Todo el documento	Laboratorio de Bacteriología

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL


Protocolo de Diagnóstico: *Xylella fastidiosa* y sus subespecies. Versión 2.0

AUTORIZÓ



Ing. Francisco Ramírez y Ramírez
Director General de Sanidad Vegetal

APROBÓ



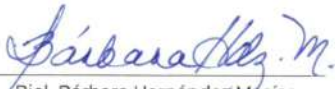
M. en C. Guillermo Santiago Martínez
Director del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

VALIDÓ



Dr. Angel Ramírez Suárez
Subdirector Técnico de Diagnóstico Fitosanitario

REVISARON




Biol. Bárbara Hernández Macías
Coordinadora del Laboratorio de Bacteriología



M. en C. María del Rocío Hernández Hernández
Jefa del Departamento de Fitopatología

ELABORARON



Biol. Bárbara Hernández Macías
Coordinadora del
Laboratorio de Bacteriología



M. en C. Sandra Lourdes Moya
Hernández
Técnico especialista del
Laboratorio de Bacteriología



Dr. Andrés Aguilar Granados
Técnico especialista del
Laboratorio de Bacteriología

Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoonosanitarias
- Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

800 987 9879

Quejas • Denuncias
Órgano Interno de Control
en el Senasica

55 5905.1000

Ext. 51648

gob.mx/agricultura

gob.mx/senasica



"Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa"