

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, abril 2020.



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

Senasica, agricultura sana para el bienestar



Aviso

El presente Protocolo de Diagnóstico Fitosanitario 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), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de las diferentes subespecies de *Xylella fastidiosa*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos 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.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.



I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Información sobre la plaga	1
2.2 Información taxonómica.....	2
2.3 Flujo de trabajo.....	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	4
3.1 Aislamiento bacteriano	4
3.1.1 Interpretación de resultados del aislamiento	5
3.2 ELISA	6
3.2.1 Interpretación de resultados de ELISA	6
3.3. Identificación molecular	7
3.3.1. Extracción de DNA total con el método de CTAB 2%	7
3.3.2 Cuantificación del DNA total por espectrofotometría	8
3.3.3 Verificación de la calidad del DNA total en gel de agarosa	8
3.3.4 PCR punto final	8
3.3.5 PCR cuantitativa (PCR tiempo real)	10
3.3.6 Controles para las pruebas moleculares	12
3.3.7 Interpretación de resultados de PCR punto final.....	12
3.3.8 Interpretación de resultados de qPCR	14
3.4. Identificación del patógeno	15
3.5. MLST (Multilocus sequence typing) para la determinación de la subespecie de <i>X. fastidiosa</i>	16
3.6 Detección de subespecies de <i>Xylella fastidiosa</i> por qPCR	22
4. REGISTROS.....	24
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL	25
6. RECONOCIMIENTO	25
7. REFERENCIAS	25
8. ANEXOS	27
8.1 Síntomas	27
8.2 Consideraciones para el envío de muestra.....	28
8.3. Medios de cultivo	28
8.4 Soluciones	29



II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias de <i>X. fastidiosa</i> en medio BYCE	5
Figura 2. Amplificación de los productos de PCR con los <i>primers</i> FXYgyr499 y RXYgyr907	13
Figura 3. Amplificación de los productos de PCR con los <i>primers</i> RST31 y RST33.....	14
Figura 4. Amplificación de los productos de PCR con los <i>primers</i> HL5 y HL6.....	14
Figura 5. Amplificación de las muestras mediante qPCR con los <i>primers</i> XF-F y XF-R y sonda la XF-P.....	15
Figura 6. Filogenia de subespecies de <i>X. fastidiosa</i>	22
Figura 7. Síntomas de <i>Xylella fastidiosa</i>	27

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencias de <i>primers</i> empleados para la PCR punto final.....	9
Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final	9
Cuadro 3. Programa del termociclador para los <i>primers</i> FXYgyr499 y RXYgyr907	9
Cuadro 4. Programa del termociclador para los <i>primers</i> RST31 y RST33	10
Cuadro 5. Programa del termociclador para los <i>primers</i> HL5 y HL6	10
Cuadro 6. Secuencias de <i>primers</i> y sondas empleados para la qPCR (PCR tiempo real)	11
Cuadro 7. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tiempo real.....	11
Cuadro 8. Programa del termociclador para los <i>primers</i> XF-F y XF-R y la sonda XF-P	11
Cuadro 9. Programa del termociclador para los <i>primers</i> HL5 y HL6 y la sonda HL-P	12
Cuadro 10. Programa del termociclador para los <i>primers</i> XF16Sf y XF16Sr y la sonda XF16Sp	12
Cuadro 11. Secuencias de <i>primers</i> empleados el MLST.....	16
Cuadro 12. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final del MLST	17
Cuadro 13. Programa del termociclador para los <i>primers</i> del MLST	17
Cuadro 14. Relación entre Secuencias Tipo y subespecies de <i>Xylella fastidiosa</i>	18
Cuadro 15. Secuencias de <i>primers</i> empleados para detectar subespecies de <i>Xylella fastidiosa</i> por qPCR.....	22
Cuadro 16. Preparación de la mezcla de reacción para detectar subespecies de <i>X. fastidiosa</i> por qPCR	23
Cuadro 17. Programa del termociclador para detectar subespecies de <i>Xylella fastidiosa</i> por qPCR	24



1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia para la detección e identificación de las diferentes subespecies de *Xylella fastidiosa* mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), técnicas moleculares con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) y PCR cuantitativa (qPCR por sus siglas en inglés de *quantitative Polymerase Chain Reaction*), bajo las condiciones de uso de reactivos que aquí se detallan.

Este método es apropiado para tejido vegetal (hojas, brotes, peciolo y ramas) de diferentes cultivos hospedantes de *X. fastidiosa* que presenten signos y síntomas característicos como quemadura o escaldadura en hojas, marchitez y momificación de frutos. Es importante no descartar material asintomático.

Este método también deberá ser aplicado en posibles insectos portadores/vectores de *X. fastidiosa*.

Es responsabilidad del usuario asegurarse de que trabaja con material vegetal adecuado para la correcta identificación de *X. fastidiosa*.

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”. Actualmente esta bacteria está ampliamente distribuida en el continente Americano y en la región mediterránea (Italia, Francia y España).

X. fastidiosa es una bacteria Gram negativa, aerobia, con forma de bastón, generalmente mide de 0.1 – 0.5 μm por 1 - 5 μm . No presenta flagelos y no forma esporas. Se reproduce asexualmente por fisión binaria y su crecimiento es lento en diferentes medios de cultivo artificiales, en los cuales se desarrolla después de 15 a 28 días a 28 °C con un pH óptimo de 6.5 a 6.9 (CABI, 2019).

X. fastidiosa está presente en muchas plantas cultivadas en América, como aguacate, alfalfa, almendro, arándano, café, cítricos, ciruelo, maple, melocotón, mora, nogal pecanero, olivo, olmo, roble y vid (Harris, 2015). Se estima que existen más de 563 especies de plantas hospedantes (EFSA, 2018). Esta bacteria presenta amplia diversidad genómica, lo cual le confiere especificidad en el rango de hospedantes (Nunney, 2014).



X. fastidiosa es habitante exclusivo del xilema de las plantas y su colonización ocasiona la obstrucción de los haces vasculares. Los síntomas característicos en plantas es el secado marginal de las hojas o escaldadura (**Anexo 8.1, Figura 7a y b**).

La bacteria se dispersa principalmente por material propagativo infectado a otras regiones y países, y por insectos vectores de las familias Cercopidae y Cicadellidae que se alimentan principalmente de los fluidos del xilema. 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).

La descripción de la bacteria fue realizada en 1987 por Wells y colaboradores. Los diferentes estudios 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).

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)

Nombre común: Enfermedad de Pierce, Clorosis variegada de los cítricos,
Quemadura de la hoja

Posición taxonómica:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

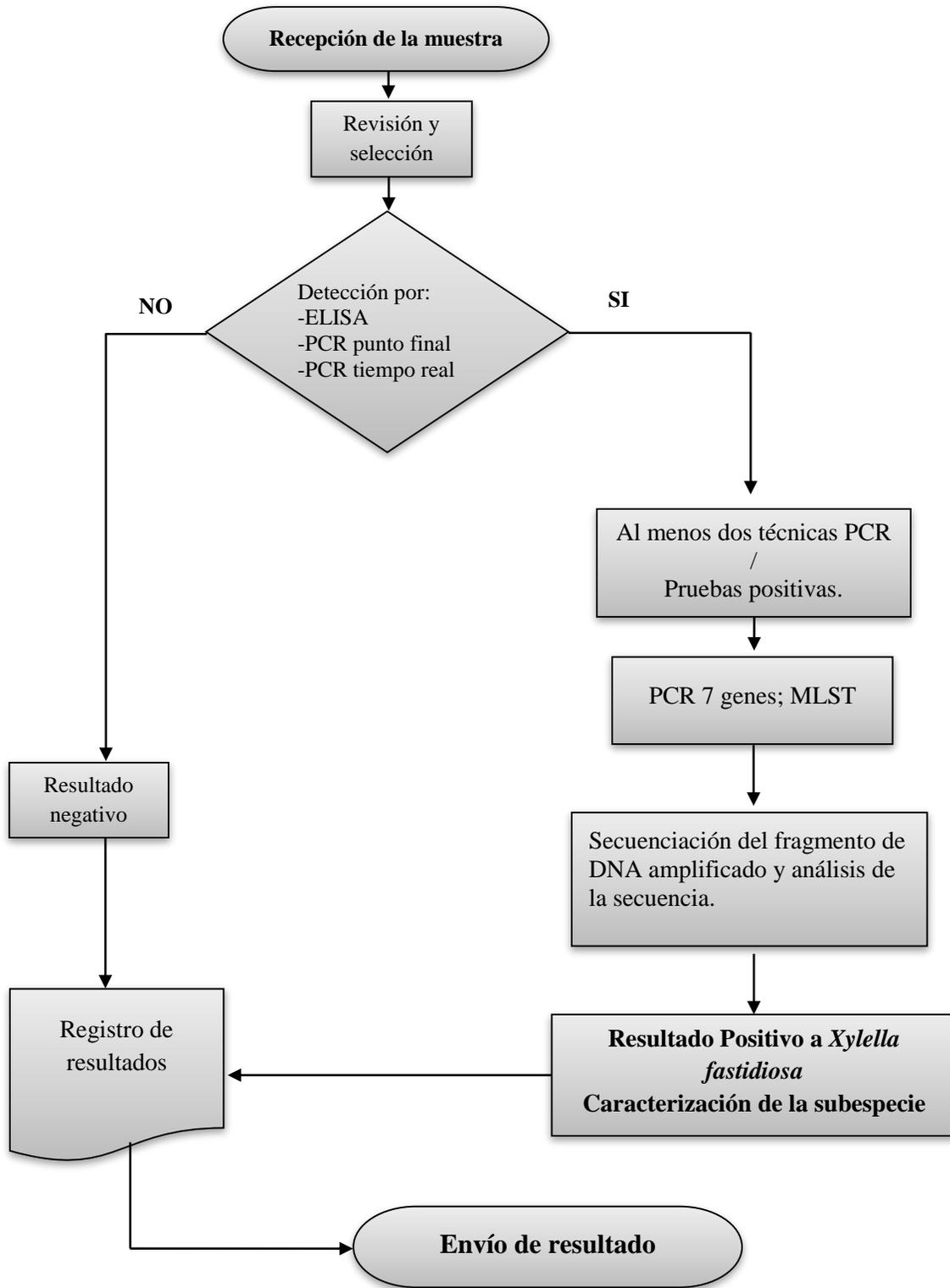
Familia: Xanthomonadaceae

Género: *Xylella*

Especie: *Xylella fastidiosa*

(Saddler y Bradbury, 2015).

2.3 Flujo de trabajo





3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

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

El material vegetal recibido en el laboratorio debe ser inspeccionado para admitir o no su recepción y comenzar con el proceso de diagnóstico. El tejido debe estar en buen estado, es decir, fresco y sin fenolización u oxidación excesiva, tampoco debe tener presencia de organismos saprofitos.

Observar si el material vegetal presenta síntomas característicos. El tejido vegetal óptimo para realizar la detección de la bacteria, son las zonas en donde se confina y concentra, las cuales comprenden los tejidos del xilema, por lo que, la muestra debe incluir hojas con síntomas o asintomáticas, pecíolos, brotes y ramas.

3.1 Aislamiento bacteriano

Debido a que *X. fastidiosa* es de crecimiento lento (de 12 a 30 días), el aislamiento de ésta es con fines de investigación y no se considera una técnica de diagnóstico, sin embargo, se incluye la metodología para fines del interesado.

Un factor importante en el éxito del aislamiento, es la selección del tejido a partir del cual se pretende extraer a la bacteria. Éste debe contener alta población bacteriana ya que tienden a acumularse en partes específicas de la planta como son los tejidos vasculares y pecíolos de las hojas, por lo que éstas se consideran muestras aptas para realizar los aislamientos.

El siguiente método fue proporcionado por el Dr. D. Wenbin Li (USDA, APHIS, PPQ, CPHST, Laboratorio Nacional de germoplasma y Cuarentena de Plantas Bldg 580, BARC- East, Beltsville, MD 20705) y adecuado/estandarizado por el Laboratorio de Bacteriología del CNRF.

- 1) En condiciones de asepsia, cortar el tejido vegetal (pecíolos) con tijeras o bisturí estériles y colocarlo en un vaso de precipitado estéril. Etiquetar con los datos de identificación de la muestra.
- 2) Agregar alcohol (etanol) al 70% hasta cubrir el tejido y dejar reposar por 2 min.
- 3) Decantar el alcohol y transferir el tejido a otro vaso de precipitado estéril. Agregar hipoclorito de sodio al 2 % y dejar reposar por 2 min.
- 4) Decantar el hipoclorito de sodio y enjuagar el tejido con agua destilada estéril tres veces. Reposar por 3 min el último enjuague.
- 5) Repetir los pasos 3 (agregar hipoclorito de sodio al 2 %) y 4 dos veces.
- 6) Decantar el último enjuague y cortar el tejido en trozos más pequeños sobre una caja Petri estéril.

- 7) Colocar el tejido en medio de cultivo líquido PW, PD2 o CS20 (20 mL) (**Anexo 8.3**). Dejar reposar de tres a cuatro horas a temperatura ambiente. Agitar periódicamente.
- 8) Tomar 1 mL del medio PW, PD2 o CS20 inoculado y agregarlo en 10 mL de medio líquido PW, PD2 o CS20 nuevo.
- 9) Sembrar 50 μ L de este último medio líquido (PW, PD2 o CS20) en medio sólido PW, PD2 o CS20 (**Anexo 8.3**), colocar el medio líquido a manera de gota en un extremo de la caja y posteriormente inclinarla para que las gotas resbalen a lo largo de la misma. Incubar las cajas a 28 °C.

Nota: tomar en cuenta que el crecimiento de la bacteria en los diferentes medios de cultivo es lento, aproximadamente entre 12 y 30 días en ambiente aerobio. También presenta diferencias en el tamaño de las colonias.

3.1.1 Interpretación de resultados del aislamiento

Los aislamientos bacterianos pueden presentar dos tipos de colonias:

- Blancas convexas y pulvinadas u opacas, lisas y con bordes enteros.
- Opacas rugosas, convexas y con bordes ondulados.

La superficie de la porción convexa de las colonias es lisa mientras que las porciones menos elevadas son rugosas. Ambos tipos de colonias miden 0.6 mm de diámetro después de 10 días de incubación y más de 1.5 mm de diámetro después de 30 días (**Figura 1**).



Figura 1. Colonias de *X. fastidiosa* en medio BYCE

Los análisis bioquímicos y fisiológicos realizados por (Wells *et al.*, 1987) revelaron que este tipo de bacterias son Gram negativas, oxidasa negativa, catalasa positiva, estrictamente



aerobias, no fermentativas, no halófilas, no pigmentadas y no móviles (carecen de flagelos). La temperatura óptima de su crecimiento oscila entre 26 y 28° C con pH óptimo entre 6.5 y 6.9.

Nota: se recomienda preservar los cultivos puros de las bacterias mediante liofilización o almacenamiento a -70°C con glicerol al 30% o dimetilsulfóxido.

3.2 ELISA

Para la detección de *X. fastidiosa* se utiliza la técnica serológica ELISA que está basada en la relación inmunológica, entre anticuerpos que reconocen y se unen a un antígeno específico. Es una técnica confiable y rápida para la detección de bacterias fitopatógenas. Se considera como prueba complementaria.

Se pueden emplear los siguientes *kits* comerciales para la detección de *X. fastidiosa*:

- Reagent Set for *Xylella fastidiosa* (Xf) (Núm. de catálogo. SRA 34503/1000, Agdia®).
- *Xylella fastidiosa* LOEWE®FAST kit (Núm. de catálogo LF07119/50).

Nota: seguir las instrucciones del fabricante.

Utilizar el control positivo y el control negativo que incluye el *kit*. Cuando aplique.

3.2.1 Interpretación de resultados de ELISA

Para evaluar los resultados, se deberá medir cada uno de los pozos de la placa con un espectrofotómetro a través de un lector de placas de ELISA.

Nota: eliminar las burbujas, si están presentes, antes de realizar la lectura.

Realizar las lecturas cada 15 min, después de adicionar el sustrato

Los resultados serán válidos solo bajo los siguientes criterios:

- La densidad óptica (DO) del control negativo deberá ser menor a 0.03.
- La DO de las muestras positivas y del control positivo deberán ser mayores a 0.10.

La reacción se considerará como positiva si la lectura de DO es mayor o igual a tres veces la media del control negativo. Si el control negativo presenta en promedio valores de DO menores de 0.03, solo se considerarán positivas aquellas muestras con DO mayores a 0.10.

Cuando solo uno de los pozos es positivo y/o si la diferencia con su repetición es mayor o igual al 50 % de su valor, la muestra deberá procesarse nuevamente para determinar la presencia de la bacteria.



3.3. Identificación molecular

3.3.1. Extracción de DNA total con el método de CTAB 2%

La extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA) total debe realizarse a partir de nervaduras centrales de las hojas, peciolo, punto de unión del peciolo 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 de insecto (en el cibario se concentra la bacteria) y remover los ojos para evitar inhibición en la reacción de PCR.

En ambos casos, se sugiere emplear la metodología propuesta en los protocolos de diagnóstico de IPPC y EPPO (IPPC, 2018 y EPPO, 2018), la cual se describe a continuación:

- 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente macerarse.
- 2) Depositar el polvo 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 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 100 μL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.
- 3) Incubar los tubos con las muestras en baño María a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o bien 60 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y centrifugar a 13 000 x g 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 8.4.2 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.

Nota: la extracción de DNA total, también puede realizarse con el *kit* comercial PlantDNAzol™ Reagent (Núm. de catálogo 10978021, Invitrogen®) o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se puede emplear algún otro protocolo de extracción de DNA total, siempre y cuando el DNA extraído cumpla con los parámetros de calidad e integridad.

3.3.2 Cuantificación del DNA total por espectrofotometría

- 1) Cuantificar de 1 a 2 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) Realizar las diluciones correspondientes del DNA para trabajar con concentraciones de 20 a 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$.
- 3) La pureza del DNA total extraído, deberá presentar valores de absorbancia (A) entre 1.7 y 2.0 para la relación A_{260}/A_{280} . Una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas.

Nota: en el caso de 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.

3.3.3 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.
- 4) Deberán observarse bandas bien definidas, 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.

3.3.4 PCR punto final

La PCR es un método de detección altamente sensible, por lo que se han desarrollado diversos *primers* universales que amplifican DNA de las variantes de *X. fastidiosa* (IPPC, 2018; Lee et al., 1991 y EPPO, 2019). Para la detección de *X. fastidiosa*, se sugiere emplear tres pares de *primers*: FXYgyr499 y RXYgyr907 (Rodrigues et al., 2003), RST31 y RST33 (Minsavage et al., 1994) y HL5 y HL6 (Francis et al., 2006) (**Cuadro 1**).



Nota: los *primers* FXYgyr499 y RXYgyr907 detectan el gen *gyrB* de la DNA girasa B, el cual es necesario para la duplicación de la bacteria y cualquier aislamiento de *Xylella* lo emplea para su reproducción (comunicación personal Dr. Jorge L. Mazza Rodrigues, University of California – Davis).

Cuadro 1. Secuencias de *primers* empleados para la PCR punto final

Tipo	Nombre del <i>primer</i>	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)
Sentido	FXYgyr499	CAGTTAGGGGTGTCAGCG	429
Antisentido	RXYgyr907	CTCAATGTAATTACCCAAGGT	
Sentido	RST31	GCGTTAATTTTCGAAGTGATTCGATTGC	733
Antisentido	RST33	CACCATTCGTATCCCGGTG	
Sentido	HL5	AAGGCAATAAACGCGCACTA	221
Antisentido	HL6	GGTTTTGCTGACTGGCAACA	

- 1) Descongelar sobre hielo los reactivos y preparar la mezcla de reacción con las cantidades indicadas en el **Cuadro 2**.

Nota: las concentraciones y volúmenes de la mezcla de reacción deberán aplicarse para los tres pares de *primers*.

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	0.2 mM	0.4
<i>Primer</i> FXYgyr499, RST31 o HL5	10 µM	0.4 µM	1.0
<i>Primer</i> 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 - 50 ng/µL	4 - 10 ng/µL	5.0
Agua grado biología molecular	-	-	14.05
		Volumen final	25

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

Cuadro 3. Programa del termociclador para los *primers* FXYgyr499 y RXYgyr907

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1



Desnaturalización	95 °C	30 s		35
Alineamiento	60 °C	30 s		
Extensión	72 °C	45 s		
Extensión final	72 °C	7 min		1

Cuadro 4. Programa del termociclador para los *primers* RST31 y RST33

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

Cuadro 5. Programa del termociclador para los *primers* HL5 y HL6

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

- 3) 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 ultra pura al 1.5 % en *buffer* TAE 1X, preferentemente.

Nota: el *buffer* de corrida debe ser teñido previamente 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. Puede utilizarse algún otro método de tinción siempre y cuando permita la interpretación de los resultados.

3.3.5 PCR cuantitativa (PCR tiempo real)

La PCR cuantitativa (qPCR) es una variante de la PCR empleada para amplificar y cuantificar 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 *primers* 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 *primers* y sondas empleados para la qPCR (PCR tiempo real)

Tipo	Nombre del <i>primer</i>	Secuencia (5' – 3')	
Sentido	XF-F	CACGGCTGGTAACGGAAGA	
Antisentido	XF-R	GGGTTGCGTGGTGAAATCAAG	
Sonda	XF-P	6FAM-TCGCATCCCCTGGCTCAGTCC-BHQ-1	TaqMan
Sentido	HL5	AAGGCAATAAACGCGCACTA	
Antisentido	HL6	GGTTTTGCTGACTGGCAACA	
Sonda	HL-P	FAM-TGGCAGGCAGCAACGATACGGCT-BHQ1	TaqMan
Sentido	XF16Sf	CGGCAGCACGTTGGTAGTAA	
Antisentido	XF16Sr	CCGATGTATTCTCACCCGTC	
Sonda	XF16Sp	FAM-CATGGGTGGCGAGTGGC-BHQ1	TaqMan

- 1) Descongelar los reactivos y preparar la mezcla de reacción según lo señalado en el **Cuadro 7**.

Cuadro 7. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tiempo real

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (µL) 1X
<i>Buffer</i> de PCR	10X	1X	2.2
MgCl ₂	50 mM	4.0 mM	1.76
dNTP	10 mM	0.3 mM	0.6
<i>Primer</i> XF-F, HL5 o XF16Sf	10 µM	0.3 µM	0.6
<i>Primer</i> XF-R, HL6 o XF16Sr	10 µM	0.3 µM	0.6
Sonda XF-P, HL-P o XF16Sp	10 µM	0.04 µM	0.1
<i>Taq</i> DNA Pol	5 U/µL	0.09 U/µL	0.4
DNA	20 - 50 ng/µL	3.64 - 9 ng/µL	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. Las condiciones de este ensayo se estandarizaron en el termociclador marca Bio-Rad CFX-96 real-time thermocycler (Bio-rad Laboratories1).

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

Cuadro 8. Programa del termociclador para los *primers* XF-F y XF-R y la sonda XF-P

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	50 °C	2 mi	1



Desnaturalización	95 °C	10 min	1
Alineamiento	94 °C	10 s	39
Extensión	62 °C	40 se	

Cuadro 9. Programa del termociclador para los *primers* HL5 y HL6 y la sonda HL-P

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

Cuadro 10. Programa del termociclador para los *primers* XF16Sf y XF16Sr y la sonda XF16Sp

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

3.3.6 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final y PCR tiempo real descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

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, RNA o DNA plasmídico de los siguientes materiales: DNA genómico extraído de la Cepa certificada por la ATTC 35877 de *Xylella fastidiosa*, DNA de tejido de vid infectado por *X. fastidiosa*, clonas de DNA genómico de *X. fastidiosa*.

Control negativo de matriz: corresponde a un extracto de matriz sin el patógeno o plaga. 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 adicionales a los oligonucleótidos. Permite descartar falsos positivos y contaminantes en la reacción de PCR.

3.3.7 Interpretación de resultados de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- El control positivo con el par de *primers* FXYgyr499 y RXYgyr907 debe generar una banda de 429 pb (**Figura 2**).
- El control positivo con el par de *primers* RST31 y RST33, debe generar una banda de 733 pb (**Figura 3**).
- El control positivo con el par de *primers* HL5 y HL6, debe generar una banda de 221 pb (**Figura 4**).
- 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 *primers* correspondientes.
- El resultado es negativo si no hay amplificación del fragmento esperado con el par de *primers* empleados.

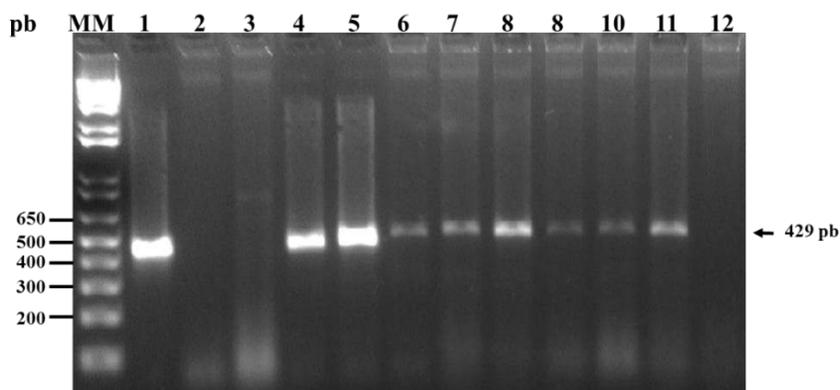


Figura 2. Amplificación de los productos de PCR con los *primers* FXYgyr499 y RXYgyr907. 1) Control positivo. 2), 3), 4), 5), 6), 7), 8), 9), 10) y 11) Muestras. 12) Control negativo de reactivos. Marcador molecular (MM) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Amplicón esperado 429 pb

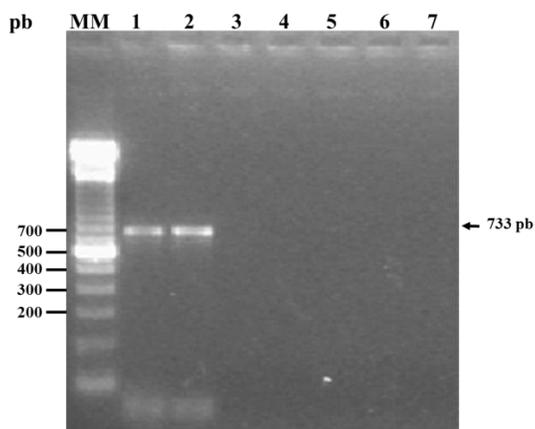


Figura 3. Amplificación de los productos de PCR con los primers RST31 y RST33. 1) y 2) Controles positivos. 3) Control negativo de matriz 4) Control negativo de reactivos. 5), 6) y 7) Muestras. Marcador molecular (MM) 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Amplicón esperado 733 pb

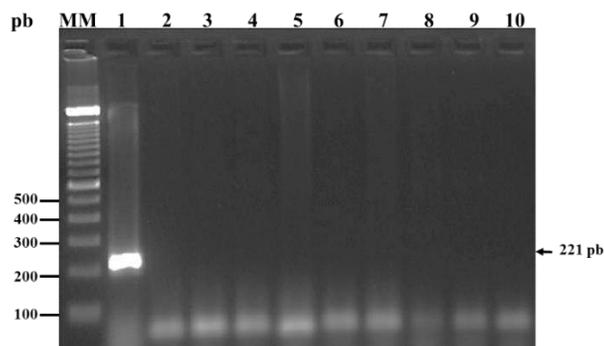


Figura 4. Amplificación de los productos de PCR con los primers HL5 y HL6. 1) Control positivo. 2), 3), 4), 5), 6), 7) y 8) Muestras. 9) y 10) Control negativo de reactivos. Marcador molecular (MM) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Amplicón esperado 221 pb

3.3.8 Interpretación de resultados de qPCR

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- El control positivo con el par de *primers* y sonda empleados, deberán generar una curva con crecimiento sigmoideal (**Figura 5a**). Además, deberá presentar tres fases: basal, exponencial y estacionaria con un valor numérico de cuantificación (Cq por sus siglas en inglés de *Cycle of quantification* Ct de *Cycle threshold*) Cq mayor a 15.00 y menor a 35.00.

- El control negativo de reactivos con el par de *primers* y sonda empleados, deberá permanecer en la línea basal por debajo del umbral establecido “*Threshold*” y no deberá presentar ningún valor de cuantificación ($Cq = N/A$ / $Cq = 0.00$) (**Figura 5c**).
- Se considera como resultado positivo a aquellas muestras que generen una curva sigmoidea con un valor de $15.0 \leq Cq \leq 35.0$ (**Figura 5b**).
- Se considera como resultado negativo a aquellas muestras que generen un $Cq = 0.00$ o Cq mayor a 35.00.
- Las muestras que presenten valores de Cq entre 32.01 y 34.99 deben ser confirmadas con una segunda prueba de qPCR.

Nota: El análisis y cuantificación de los datos se realiza en la Fase Exponencial de la reacción

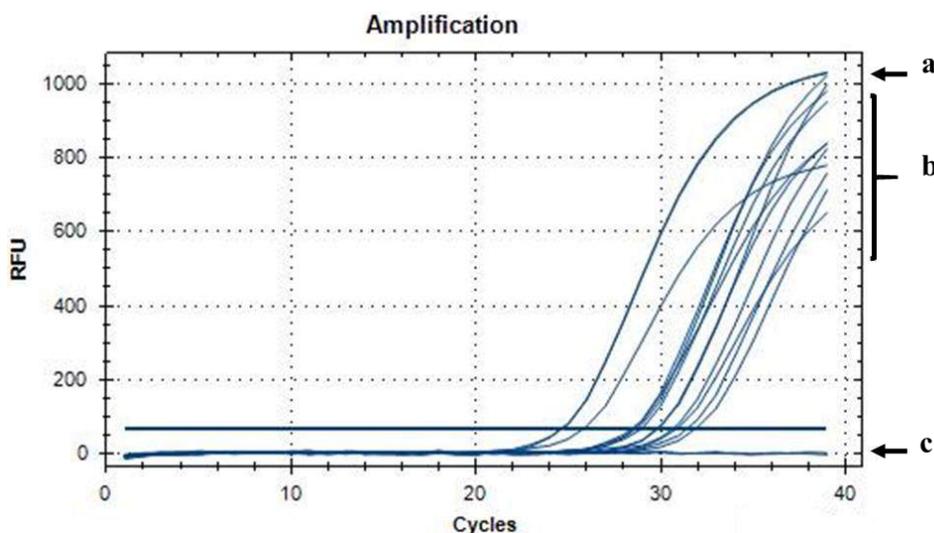


Figura 5. Amplificación de las muestras mediante qPCR con los *primers* XF-F y XF-R y sonda la XF-P. Unidades de fluorescencia relativa frente a los ciclos de amplificación a) Control positivo. b) Muestras y c) Control negativo de reactivos. Fluoróforo FAM (Invitrogen). Valor numérico de cuantificación (Cq) esperado < 35.0

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 *primers* (**Cuadro 1**) y amplificación positiva del ensayo de qPCR con al menos un par de *primers* (**Cuadro 6**).

Como prueba de corroboración, se sugiere secuenciar el fragmento obtenido en el ensayo de PCR punto final de al menos uno de los pares de *primers* mencionados.

3.5. MLST (Multilocus sequence typing) para la determinación 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. Es indispensable partir de un aislamiento puro para evitar mal interpretación de los datos.

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 (*glfT*). 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 11. Secuencias de primers empleados 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 AACTG	
Sentido	<i>petC</i> -for	GCTGCCATTCG TTGAAGTACCT	533
Antisentido	<i>petC</i> -rev	GCACGTCCTCCCAAT AAGCCT	
Sentido	<i>malF</i> -for	TTGCTGGTCCT GCGGTGTTG	730
Antisentido	<i>malF</i> -rev	GACAGCAGAAGCAC GTCCAGAT-	
Sentido	<i>cysG</i> -for	GCCGAAGCAGT GCTGGAAG	600
Antisentido	<i>cysG</i> -rev	GCCATTTTCGATCAG TGCAAAAG	
Sentido	<i>holC</i> -for	ATGGCACGCGC CGACTTCT-	379
Antisentido	<i>holC</i> -rev	ATGTCGTGTTTGTTC ATGTGCAGG-	
Sentido	<i>nuoL</i> -for	TAGCGACTTAC GGTTACTGGGC-	557
Antisentido	<i>nuoL</i> -rev	ACCACCGATCCACA ACGCAT	
Sentido	<i>glfT</i> -for	TCATGATCCAAA TCACTCGCTT-	654
Antisentido	<i>glfT</i> -rev	ACTGGACGCTGCCTC GTAAACC-3	

- 1) Descongelar los reactivos y preparar la mezcla de reacción según lo señalado en el **Cuadro 12**.

Nota: las concentraciones y volúmenes de la mezcla de reacción deberán ser las mismas para todos los pares de *primers*.

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

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen (μL) 1X
<i>Buffer</i> de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.2 mM	0.4
<i>Primer</i> Sentido	10 μM	0.4 μM	1.0
<i>Primer</i> Antisentido	10 μM	0.4 μM	1.0
<i>Taq</i> DNA Pol	5 U/μL	0.06 U/μL	0.3
DNA	20 - 50 ng/μL	4 - 10 ng/μL	5.0
Agua grado biología molecular	-	-	14.05
		Volumen final	25

2) 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 *primers* del MLST.

Cuadro 13. Programa del termociclador para los *primers* del MLST

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

3) 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 ultra pura al 1.5 % en *buffer* TAE 1X.

Nota: el *buffer* de corrida debe ser teñido previamente 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. Puede utilizarse algún otro método de tinción siempre y cuando permita la interpretación de los resultados.

4) 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 una banda amplificada, es decir, que no se presenten amplificaciones inespecíficas.



- 5) Los productos de PCR de los siete genes MLST deben enviarse a secuenciar de forma individual.
- 6) Las 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/EPPO, 2019)

ST	leuA	petC	malF	cysG	holC	nuoL	glT	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/sa ndyi</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/sa ndyi</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/sa ndyi</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/sa ndyi</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)
								<i>multiplex</i>	Marchi et al., (2019), Saponari et al., (2019)
87	5	3	5	3	3	21	3		

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 parametos 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 Live).

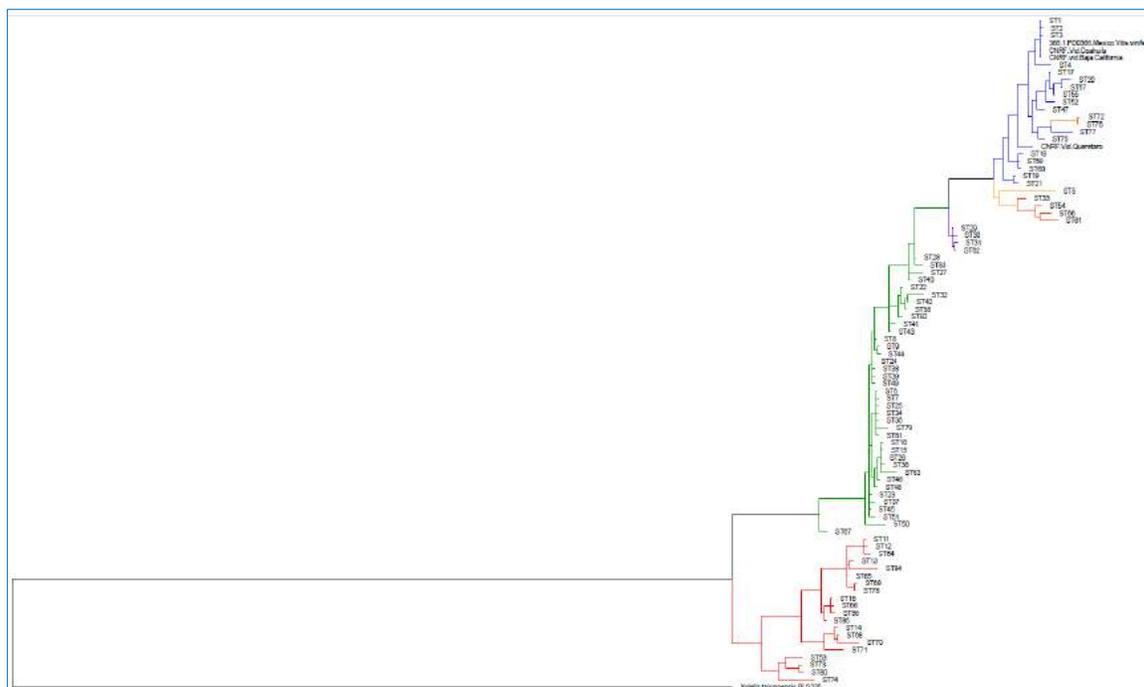


Figura 6. Filogenia de subespecies de *X. fastidiosa*. Árbol inferido mediante método bayesiano empleando siete genes concatenados, incluyendo secuencias de las 87 ST de *X. fastidiosa* más las muestras denominadas: vid Coahuila, vid Baja California y vid Querétaro. Se utilizó a *X. taiwanensis* como nodo raíz externo al grupo

3.6 Detección de subespecies de *Xylella fastidiosa* por qPCR

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

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

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5´- 3´)	Tamaño (pb)	subespecie
Sentido	XF-F	AACCTGCGTGACTCTGGTTT	118	*Detecta solo especie
Antisentido	XF-R	CATGTTTCGCTGCTTGGTCC		
Sonda	XF-P	FAM-GCTCAGGCTGACGGTTTCACAGTGCA-BHQ1		
Sentido	XFF-F	TTACATCGTTTTTCGCGCACG	100	<i>fastidiosa</i>
Antisentido	XFF-R	TCGGTTGATCGCAATACCCA		
Sonda	XFF-P	HEX-CCCGACTCGGCGCGGTTCCA-BHQ1	TaqMan	
Sentido	XFFSL-F	TAGTATGCGTGCGAGCGAC	75	<i>fastidiosa</i>
Antisentido	XFFSL-R	CGCAATGCACACCTAAGCAA		



Sonda	XFFSL-P	HEX-CGCGTACCCACTCACGCCGC-BHQ1	TaqMan	
Sentido	XFM-F	ACGATGTTTGAGCCGTTTGC		
Antisentido	XFM-R	TGTCACCCACTACGAAACGG	88	<i>multiplex</i>
Sonda	XFM-P	ROX-ACGCAGCCCACCACGATTTAGCCG-BHQ2	TaqMan	
Sentido	XFMO-F	TAACGCTATCGGCAGGTAGC		
Antisentido	XFMO-R	GCATCAGCTTCACGTCTCCT	123	<i>morus</i>
Sonda	XFMO-P	CY5-GGTTCCGCACCTCACATATCCGCC-BHQ2	TaqMan	
Sentido	XFP-F	TGCGTTTTCTAGGTGGCAT		
Antisentido	XFP-R	GTTGGAACCTTGAATGCGCA	154	<i>pauca</i>
Sonda	XFP-P	CY5-CCAAAGGGCGGCCACCTCGC-BHQ2	TaqMan	

1) Realizar la mezcla de reacción según lo señalado en el **Cuadro 16**.

Nota: Se puede emplear por separado cada par de *primers* (con su respectiva sonda), o en mezcla de hasta cuatro pares (tetralex). Es importante indicar que no se deben utilizar los *primers* 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 *primers* 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)
<i>Buffer</i> PCR	10X	1X	2.2
MgCl ₂	50 mM	1.72 mM	0.76
dNTP	10 mM	0.27 mM	0.6
<i>Primer</i> sentido	10 µM	0.27 µM	0.6
<i>Primer</i> antisentido	10 µM	0.27 µM	0.6
Sonda	10 µM	0.2 µM	0.44
<i>Taq</i> DNA Pol	5 U/µL	0.09 U/µL	0.4
DNA	20 - 50 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. Las condiciones de este ensayo se estandarizaron en el termociclador marca Bio-Rad CFX-96 real-time thermocycler (Bio-rad Laboratories1).

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el **Cuadro 17**.

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

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95 °C	3 min	1
Alineamiento	95 °C	15 s	40
Extensión	60 °C	30 s	

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de *X. fastidiosa* conforme 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 -20 °C.
- Mantener los insectos en su empaque original con alcohol al 70 % y con los datos de identificación, a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal.
- Inactivar y desechar las cepas bacterianas.
- 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
- Resguardar los insectos en un lugar fresco y seco.
- Mantener el DNA obtenido en congelación a -20 °C o en un utracongelador a -80 °C.
- Resguardar los resultados de las pruebas moleculares (incluyendo las fotografías de los geles, curvas de qPCR y secuencias, cuando aplique).



- Resguardar los resultados obtenidos de la prueba de ELISA.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.bacteriologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 5905 1000, ext. 51314 y 51333.

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Bacteriología (Andrés Aguilar Granados, Bárbara Hernández Macías, Lidia Guadarrama Valencia, Sandra Lourdes Moya Hernández); revisado por el Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández).

7. REFERENCIAS

- CABI. (2019). *Xylella fastidiosa* (Pierce's disease of grapevines). Recuperado de <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., & 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., & 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. *The American Phytopathological Society*, (100), 1282–1288. <https://doi.org/10.1094 / PHYTO-06-10-0168>
- Harris, J. L., & Balci, L. (2015). Population Structure of the Bacterial Pathogen *Xylella fastidiosa* among Street Trees in Washington D.C. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121297>
- He, C. X., Li, W. B., Ayres, A. J., Hartung, J. S., Miranda, V. S., & 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. 84(6), 622–626. Recuperado de <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. Recuperado de 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., & Rossetti, V. (1991). Citrus variegated chlorosis: A new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry*, 72(15), 10–13.
- Li W, Teixeira DC, Hartung JS, 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., & Stall, R. E. (1994). Development of a Polymerase Chain Reaction Protocol for Detection of *Xylella fastidiosa* in Plant Tissue. *The American Phytopathological Society*, 84, 456–461. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1994Articles/P_hyto84n05_456.PDF
- Nunney, L., Schuenzel, L. E., Scally, M., Bromley, R. E., & 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(10), 3025–3033. <https://doi.org/10.1128/AEM.04112-13>
- OEPP/EPPO. (2019). PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. *EPPO Bulletin*, 48(3), 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., & Hanson, S. F. (2009). Genetic Analysis of a Novel *Xylella fastidiosa* Subspecies Found in the Southwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 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., & 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(7), 4249–4255. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4249>
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M. Barek, & 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. *Systematic ans Applied Microbiology*, 27, 290–300. Recuperado de https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41245242/Xylella_fastidiosa_subspecies_X_fastidi20160114-5392-2w31y9.pdf20160115-19908-1cz6lnp.pdf?response-content-disposition=inline%3B_filename%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., & 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(7), 3832–3839. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3832>

Varani, A. M., Monteiro-Vitorello, C. B., Nakaya, H. I., & 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., & 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(2), 136–143. Recuperado de <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/37/2/ijjs-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. (2020). Protocolo de Diagnóstico: *Xylella fastidiosa* y sus subespecies [Versión 2.0]. Autor.

8. ANEXOS

8.1 Síntomas



Figura 7. Síntomas de *Xylella fastidiosa*. a) Secado, desprendimiento de hojas y maduración irregular de la rama/tallo. b) Secado marginal de hoja en olivo. c) Momificación de frutos en vid



8.2 Consideraciones para el envío de la 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 7**), 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 y enviarse al día siguiente, evitar fin de semana.

8.3. Medios de cultivo

Medio PW

Reactivo	Cantidad
Peptona	4.0 g
Triptona (peptona de caseína)	1.0 g
Cloruro de hemina (hemin chloride)	0.01 g
Sulfato de magnesio pentahidratado	0.4 g
Fosfato de potasio	1.2 g
Fosfato de potasio monobásico	1.0 g
Rojo de fenol	0.02 g
L-glutamina	4.0 g
Albumina de suero de bovino fracción V (BSA)	6.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Ajustar el pH en 6.8 y esterilizar durante 20 minutos a 121 °C.



Medio PD2

Reactivo	Cantidad
Peptona	4.0 g
Triptona (peptona de caseína)	1.0 g
Citrato trisodico	1.0 g
Sucsanato de Sodio	1.0 g
Cloruro de hemina (hemin chloride)	0.01 g
Almidón de papa soluble	2.0 g
Sulfato de magnesio pentahidratado	0.4 g
Fosfato de potasio	1.5 g
Fosfato de potasio monobásico	1.0 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1000 mL

Ajustar el pH en 6.8 y esterilizar durante 20 min a 121 ° C, cuando el medio alcance una temperatura aproximada de 50 °C agregar por filtración Millipore el Cloruro de hemina previamente diluido en 5mL de agua destilada.

Medio CS 20

Reactivo	Cantidad
Peptona de soya	2.0 g
Triptona (peptona de caseína)	1.0 g
Cloruro de hemina (hemin chloride)	0.01 g
Sulfato de magnesio pentahidratado	0.4 g
Fosfato de amonio dibásico	0.85 g
Fosfato de potasio dibásico	1.0 g
Dextrosa	1.0 g
Almidón de papa soluble	2.0 g
L- Histidina	1.0 g
Albumina de suero de bovino fracción V (BSA)	2.0 g
Rojos de fenol	0.01 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Ajustar el pH en 6.8 y esterilizar durante 20 min a 121 ° C. Los aminoácidos (Glutamina e Histidina) se preparan por separado, así como el BSA, agregar por filtración Millipore.

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.