



**III REUNIÓN DEL GRUPO ESPECIALIZADO  
EN DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO E  
IDENTIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD  
ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA  
(GEDDI-SEF)**



**Valencia 28-30 noviembre de 2017**



Con el patrocinio de:



Y la colaboración de:



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA





## COMITÉ ORGANIZADOR:

**-María Isabel Font San Ambrosio.** Grupo de Virología, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València.

**-Paloma Abad Campos.** Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València.

**-Josep Armengol Fortí.** Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València.

**-José Luis Palomo Gómez.** Centro Regional de Diagnóstico. Junta de Castilla y León. Salamanca.

## ÍNDICE:

### Programa:

**1ª Sesión: Virus y Viroides**

**2ª Sesión: Hongos y Oomicetos**

**3ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas I**

**4ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas II**

**5ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas III; Nematodos**

**6ª Sesión: Temas generales**

## PROGRAMA

**Martes 28 de Noviembre**

**09:00 Actividad opcional:** “Jornada práctica de detección polivalente de virus y viroides mediante hibridación molecular con polisondas”

**Jesús A. SánchezNavarro**  
IBMCP Campus UPV

**16:00-16:30 Inauguración de la Reunión**

- **D. Alberto San Bautista Primo** (Director de la ETSIAMN) (Universitat Politècnica de València)  
- **D. Jaime Cubero Dabrio** (Vicepresidente de la SEF)

**16:30-18:30 1ª Sesión: Virus y Viroides**

Moderadores: M Isabel Font S. Ambrosio  
Javier Romero Cano

COD	TEMA	PONENTE
V-1	Detección y caracterización de aislados españoles de <i>Little cherry virus 1</i>	Antonio Olmos Castelló
V-2	Detección de <i>Peach latent mosaic viroid</i> (PLMVd) mediante RT-PCR en tiempo real	Carmen Martínez Manjavacas
V-3	Optimización del tampón de hibridación en la detección de virus mediante hibridación molecular no radioactiva tipo dot-blot de extractos crudos	Jesús A Sanchez Navarro
V-4	Diagnóstico de la variabilidad genética del <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV) por hibridación molecular y la diversidad de síntomas detectados en Canarias	Ana I. Espino de Paz
V-5	Estructura genética de la población del Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) en los cultivos de tomate del Sureste español.	Jesús Agüero González
V-6	Avances en la detección de <i>Southern tomato virus</i> (STV) en distintas especies vegetales y efecto de su coinfección con <i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV) en tomate	M Isabel Font San Ambrosio

**Miércoles 29 de Noviembre**
**9:00-11:00 2ª Sesión: Hongos y Oomicetos**

 Moderadores: Maela León Santana  
Diego Olmo García

COD	TEMA	PONENTE
H-1	Aislamiento de <i>Fusarium circinatum</i> en muestras de madera de pino con chancros resinosos.	Elena Landeras Rodríguez
H-2	Caracterización morfológica y molecular de hongos causantes de enfermedades de madera de vid	Adela Abelleira Argibay
H-3	Identificación molecular de hongos: posibles nuevas detecciones en ajo, almendro y vid	Ramona M Muñoz Gómez
H-4	La Roya del arándano (continuación).	Elena Landeras Rodríguez
H-5	Ensayos de patogenicidad de <i>Gymnopus luxurians</i> en plantas de vid	Adela Abelleira Argibay
H-6	Ensayo de adaptación del protocolo de Côté (2004) de PCR convencional a PCR a tiempo real mediante Sybr®Green, para la detección de <i>Monilinia</i> spp.	Cristina Arribas Fernández
H-7	Detección e identificación de <i>Fusarium petroliphilum</i> causando podredumbre de calabaza de cacahuete ( <i>Cucurbita moschata</i> )	Josep Armengol Fortí

**11:00 Pausa – Café**
**11:30-12:30 3ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas**

 Moderadores: Leandro de León Guerra  
Raquel Marquínez

B-1	Riesgo de introducción de la cancrrosis de los cítricos a través de plantas ornamentales no cítricas	Jaime Cubero Dabrio
B-2	Experiencias en el diagnóstico serológico y molecular de <i>Xylella fastidiosa</i>	Adela Abelleira Argibay
B-3	Optimización de la detección molecular de <i>Xylella fastidiosa</i> para prospecciones a gran escala	Silvia Barbé Martínez
B-4	Desarrollo y evaluación de la técnica Inmunoimpresión-ELISA para la detección de <i>Xylella fastidiosa</i> en distintos huéspedes	María Teresa Gorris

**12:30 Ponencia: “Xylella fastidiosa en España: detección y caracterización**
**Diego Olmo García  
Montserrat Roselló Pérez**
**14:00 Almuerzo**

**16:00-18:00 4ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas II**

Moderadores: Ana Palacio Bielsa  
Silvia Barbé Martínez

B-5	Detección de ' <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ' y <i>Spiroplasma citri</i> en semillas comerciales de umbelíferas mediante PCR a tiempo real	Ana Alfaro Fernández
B-6	Evaluación de la especificidad de protocolos de PCR para la detección de ' <i>Candidatus Liberibacter</i> ' spp. en cítricos	Félix Morán Villamizar
B-7	Evaluación de la eficiencia de los ARNr en la caracterización taxonómica de <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> : Problemas en el haplotipado de poblaciones de CaLSO	Jaime Cubero Dabrio
B-8	Detección de <i>Acidovorax citrulli</i> en semillas de cucurbitáceas: qPCR + test sweat-box	Leandro León Guerra
B-9	<i>Pectobacterium parmentieri</i> . ¿Un nuevo patógeno en España?	Jose Luis Palomo Gómez
B-10	Identificación del agente causal del chancro espumoso del almendro	Nieves Capote Mainez
B-11	Bacterias asociadas al <i>foamy canker</i> o chancro espumoso del almendro	Ester Marco Noales

**Jueves 30 de Noviembre**

**9:00-10:45ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas III**

Moderadores: Felipe Siverio de la Rosa  
Elena Landeras Rodríguez

**Nematodos**

COD	TEMA	PONENTE
B-12	Problemas con el método Enriquecimiento-ELISA para la detección de <i>Erwinia amylovora</i> en muestras de manzano asintomáticas.	Elena Landeras Rodríguez
B-13	Problemática con los medios MGY para la detección de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. actinidae y SSM para <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Remedios Santiago Merino
N-1	Caracterización morfológica y molecular de especies del género <i>Xiphinema</i>	Adela Abelleira Argibay
N-2	Ejercicios anuales de intercomparación (2015 a 2017) para la detección de <i>Xiphinema index</i>	Ramona M Muñoz Gómez
N-3	Eclosión matricida en <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Adela Abelleira Argibay
N-4	Barcoding en nematodos fitoparásitos	Juan E. Palomares Riu

**10:45 Pausa – Café**

**11:15-13:00 6ª Sesión: Temas generales**

Moderadores: Carmen Martínez Manjavacas  
Milagros Marín Terrazas

COD	TEMA	PONENTE
G-1	Guía práctica de fotografías como ayuda para la identificación de enfermedades y plagas de la papa, y otras aplicaciones	Felipe Siverio de la Rosa
G-2	Retos en el diagnóstico de los Laboratorios de Sanidad Vegetal	Jaume Almacellas Gort
G-3	Estandarización de Medios de cultivo para oomicetos del género <i>Phytophthora</i> .	Elena Landeras Rodríguez
G-4	Recomendaciones para la detección e identificación de <i>Phytophthora</i> spp.	Antonio V. Sanz Ros
G-5	Impulso del Documento "Criterios para acreditación de laboratorios de Sanidad Vegetal según la ISO 17025"	Ester Torres
G-6	Propuesta de listado de términos fitopatológicos de la Comisión de Léxico	Mariano Cambra Álvarez

**13:00 Asamblea Extraordinaria GEDDI-SEF**

**13:45 Clausura**

**14:00 Almuerzo**







## **1ª Sesión: Virus y Viroides**

### **Moderadores**

**María Isabel Font San Ambrosio y Javier Romero Cano**

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS ESPAÑOLES DE*****Little cherry virus 1***

Ruiz-García, A.B<sup>1</sup>.; Martínez, C.<sup>1</sup>; [Olmos, A.](#)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) ([aolmos@ivia.es](mailto:aolmos@ivia.es))

*Little cherry virus 1* (LChV-1), del género *Velarivirus*, familia *Closteroviridae*, fue identificado por primera vez por Keim-Konrad y Jelkmann en 1996. Los principales síntomas que produce en el cerezo son la reducción del tamaño y la pérdida de propiedades organolépticas del fruto. El virus, que se transmite por injerto y mecánicamente, está contemplado en las Directivas 2008/61/CE y 2014/98/UE. La detección de LChV-1 se basa fundamentalmente en métodos de RT-PCR convencional, siendo los iniciadores específicos más utilizados los diseñados por Jelkman et al. (2001), LChV-1-F 5' TCCGCCTGAAGCACCTA ATCCA 3' y LChV-1-R 5' GGTAAGCGGTATAAAACCCTCCTCT3'. Sin embargo, cuando se ha utilizado esta técnica para la detección de aislados españoles de LChV-1 ha resultado ser un método poco fiable, habiéndose detectado el virus con una prevalencia baja y de manera poco reproducible. Para confirmar la presencia real del virus en España, se analizaron muestras sintomáticas de brotes de la D.O. Valle del Jerte y Ponferrada mediante secuenciación masiva de siRNAs. El análisis bioinformático permitió recuperar para ambos aislados un genoma completo de 16933 nt (GenBank KX192366 and KX192367). La comparación de los aislados Jerte y Ponferrada con las secuencias disponibles en GenBank mostró una alta homología con el aislado Taian de LChV-1, con una identidad de secuencia que varió entre el 94.8% y el 98.9% para las ocho ORFs virales. El análisis del genoma de los aislados españoles reveló un alto grado de divergencia en las regiones utilizadas para el diseño de los iniciadores descritos en la bibliografía, lo que explica la dificultad de la detección utilizando este método. La caracterización de la secuencia de los aislados españoles nos ha permitido diseñar nuevos iniciadores específicos capaces de detectar el virus, 5'CCAATGCACAAAGCACATATGA3' y 5'ACCGCGACGTGGTCCTAATA3'. El análisis por RT-PCR de un total de 60 muestras de cerezo utilizando estos iniciadores ha confirmado la presencia de este virus en España, con una prevalencia mucho mayor de la esperada.

## DETECCIÓN FIABLE DEL VIROIDE DEL MOSAICO LATENTE DEL MELOCOTONERO (PLMVd) MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL

Martínez, C<sup>1</sup>., Bertolini, E<sup>1,2</sup>., Serra, P<sup>3</sup>., Cambra, M<sup>1</sup>., Flores, R<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (cmartine@ivia.es); <sup>2</sup> Departamento de Fitossanidade. Faculdade de Agronomía. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, Brasil; <sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). UPV-CSIC.

El viroide del mosaico latente del melocotonero (PLMVd) es un patógeno ampliamente extendido que ha sido detectado hace años en España. PLMVd induce retrasos en la brotación, floración y maduración, así como amarilleos y decoloraciones en hojas y deformaciones en frutos. Se denomina “latente” porque en la mayoría de las infecciones naturales no se observan síntomas en hojas y también porque las primeras alteraciones patológicas se observan transcurridos al menos dos años desde la plantación con material infectado.

En el Laboratorio Nacional de Referencia de virus, viroides y fitoplasmas de especies leñosas se diseñaron cebadores y una sonda TaqMan para la detección de PLMVd mediante RT-PCR en tiempo real (rtRT-PCR). El uso de esta técnica se validó comparando los resultados obtenidos al analizar muestras con y sin síntomas frente a los obtenidos mediante hibridación molecular con una ribosonda de longitud completa. Los resultados fueron coincidentes salvo en una muestra de hojas asintomáticas que resultó negativa por rtRT-PCR y positiva mediante hibridación. La secuenciación de este aislado reveló poblaciones de PLMVd constituidas únicamente por variantes poco comunes (aquí denominadas de clase II) que incluyen una serie de cambios nucleotídicos en la región del viroide que cubre la sonda TaqMan, región elegida en su día por la escasa variabilidad que presentan el resto de variantes (de clase I). A la vista de estos resultados, se diseñó una nueva sonda cubriendo la misma región del viroide pero derivada de las variantes de clase II, que puede utilizarse conjuntamente con la anterior para la detección simultánea de ambas variantes.

Para caracterizar biológicamente las variantes de clase II, se inocularon plantas indicadoras del melocotonero de semilla GF305 con la variante asintomática gds6 de clase I y con la variante representativa de clase II, comparándolas con plantas sin inocular. Además, se coinocularon plantas con ambas variantes. Tras un periodo de incubación, se analizaron las progenies por hibridación molecular, rtRT-PCR con ambas sondas TaqMan, RT-PCR convencional y secuenciación. Los resultados indicaron que la nueva variante de clase II es asintomática y tiene una mayor eficacia biológica que la de clase I, ya que en las plantas coinoculadas únicamente se detectó la primera.

Considerando estos resultados, se ha diseñado una tercera sonda “universal” TaqMan para la detección de ambas clases de variantes.

## OPTIMIZACIÓN DEL TAMPÓN DE HIBRIDACIÓN EN LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN MOLECULAR NO RADIOACTIVA TIPO DOT-BLOT DE EXTRACTOS CRUDOS

Sánchez-Navarro, J.A.<sup>1</sup>, Corachán, L.<sup>1</sup>, López-Martínez, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Universidad Politécnica de Valencia. 46022 Valencia ([jesanche@ibmcp.upv.es](mailto:jesanche@ibmcp.upv.es)); <sup>2</sup>Barberet &Blanc S.A., operando bajo la marca Dümme Orange, Camino Viejo 205, 30890 Puerto Lumbreras, Murcia.

La utilización de la hibridación molecular no radiactiva con el uso de diferentes sondas fusionadas en tándem o polisondas, ha permitido la detección polivalente de varios virus y viroides en un mismo test (Peiró et al., 2012). En el presente trabajo hemos analizado la influencia de la solución de hibridación en la sensibilidad de la hibridación molecular no radiactiva, utilizando tanto muestras de ácidos nucleicos purificados como extractos crudos aplicados directamente en membrana.

Los ensayos se han realizado con una ribosonda que permite la detección de 9 virus (Poli-9): *Carnation etched ring virus* (CERV), *Carnation Italian ringspot virus* (CIRSV), *Carnation latent virus* (CLV), *Carnation mottle virus* (CarMV), *Carnation necrotic fleck virus* (CNFV), *Carnation ringspot virus* (CRSV), *Carnation vein mottle virus* (CVMV), *Carnation yellow fleck virus* (CYFV) y *Cucumber mosaic virus* (CMV). Como tejido infectado hemos utilizado muestras de clavel infectadas con CarMV, CNFV o CYFV, mientras que como muestras de ácidos nucleicos purificados hemos utilizado transcritos complementarios a los diferentes fragmentos de Poli-9, a una concentración de 20pg/μl. Las diferentes soluciones de hibridación ensayadas corresponden a la recomendada por Roche DigEasyHyb (nº catálogo: 11796895001) así como la solución estándar al 50% de formamida con diferentes concentraciones de SDS (0.02%, 0.5%, 1%, 2%, 6% y 7%) o agente bloqueante (1% ó 2%; Roche: 11096176001). Para evaluar las diferentes soluciones de hibridación, se prepararon réplicas de la misma membrana de nylon (Roche: 11417240001) en las que se aplicaron 20 picogramos de RNA complementario a cada fragmento viral de la poli-9 así como extractos crudos (1g:5ml) de tejido infectado de clavel en tampón extracción (Citrato sódico 50mM, EDTA 5mM, pH: 8.0) (Sánchez-Navarro et al., 1999). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que las soluciones de hibridación con alto porcentaje de SDS (DigEasyHyb, solución estándar al 6-7% SDS) dieron los mejores resultados con ácidos nucleicos purificados. Sin embargo, los mejores resultados con extractos crudos de tejido se obtuvieron con la solución de hibridación estándar al 0,5% de SDS. De igual forma, la sensibilidad se mejoró utilizando al agente bloqueante al 1% en vez del recomendado al 2%. Sin embargo, también se observó señal inespecífica en tejido sano.

Peiró et al., 2012. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 469-475.

Sánchez-Navarro et al., 1999. *Journal of Virological Methods*, 82, 167-175.

**DIAGNÓSTICO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Pepino mosaic virus* (PepMV) POR HIBRIDACIÓN MOLECULAR Y LA DIVERSIDAD DE SÍNTOMAS DETECTADOS EN CANARIAS**

Espino de Paz, A.I.<sup>1</sup> Botella-Guillen, M.<sup>1</sup>; Otazo-González, C.<sup>2</sup>; Díaz-Marrero, C.J.<sup>3</sup>; Gómez-Aix, C.<sup>3</sup>, Agüero, J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal Tenerife Dirección General de Agricultura ([aesppaz@gobiernodecanarias.org.es](mailto:aesppaz@gobiernodecanarias.org.es)); <sup>2</sup>Sanidad Vegetal Tenerife Dirección General de Agricultura; <sup>3</sup>Abiopep

El Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*, PepMV, género *Potexvirus*, familia *Alphaflexiviridae*) induce en tomate, una gama de síntomas que reduce la producción y la calidad del fruto. Se han descrito 5 tipos genéticos, o cepas, a nivel mundial, el tipo peruano original (PE), detectado por primera vez en 1974 en plantas de pera melón (*Solanum muricatum*), el tipo europeo (EU), el tipo norteamericano (US1), el tipo chileno (CH2), y el tipo Surperuano (PES), descrito a partir de secuencias de aislados de especies salvajes del género *Solanum*.

A partir de las primeras detecciones de PepMV mediante la técnica serológica inmunoenzimática ELISA-DAS en Canarias, en el año 1999 en cultivos de tomate de exportación, se han realizado varias prospecciones hasta la actualidad, para la detección de los diferentes tipos genéticos de PepMV mediante hibridación molecular, con sondas de ARN específicas de cepas SP13-EU y PS5-CH2 (diseñadas por Gómez, P. y Sempere-Navarro, R. del CEBAS-CSIC, Murcia) y 505-EU, 505-CH2 y 505-US1 (diseñadas por Abiopep). Estas prospecciones se han llevado a cabo en las zonas productoras de tomate de las Islas de Tenerife, Gran Canaria y Fuerteventura, y se han identificado positivos al tipo EU en plantas con síntomas de colapso y marchitez reversible o irreversible en Tenerife y en Gran Canaria y PepMV-CH2 aislado necrótico, secuenciado en la ULL, en plantas con necrosis, en la Isla de Tenerife.

Este método molecular empleado para la detección de los diferentes tipos de PepMV presenta ventajas frente al ELISA-DAS, que no distingue los diferentes tipos y es menos sensible, y frente a la RT-PCR, por la mayor dificultad en la extracción del ARN, a la hora de realizar un número elevado de muestras, por lo que ha resultado ser de gran ayuda, para trabajar de manera rutinaria en el Laboratorio de Diagnóstico de Sanidad Vegetal.

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en los diferentes tipos genéticos de PepMV mediante hibridación molecular, así como la variabilidad de síntomas. En Tenerife se han detectado 3 tipos genéticos en las prospecciones del año 2017 (EU, CH2 y US1) y se han observado plantas con síntomas de necrosis en hoja, tallo y fruto que resultaron ser positivas para el tipo CH2. En Gran Canaria se ha detectado PepMV del tipo EU y CH2, y en Fuerteventura del tipo CH2, también en plantas con síntomas de necrosis.

### **Estructura genética de la población del Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) en los cultivos de tomate del Sureste español**

Gómez-Aix, C. <sup>1</sup>; Alcaide, C. <sup>2</sup>; Agüero, J. <sup>1</sup>; Gómez, P. <sup>2</sup>

[jaguero@abiopep.com](mailto:jaguero@abiopep.com)

<sup>1</sup> Abiopep S.L. Parque Científico de Murcia. Ctra. de Madrid Km 388, Complejo Espinardo. Edificio R 2ª planta, 30100. Espinardo, Murcia.

<sup>2</sup> Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)- CSIC, Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, 30100 Espinardo, Murcia.

El Virus del mosaico del pepino dulce (*Pepino mosaic virus*; PepMV; género Potexvirus) es un patógeno emergente en el cultivo de tomate, cuya enfermedad tiene un gran impacto económico en el sector agrícola debido a las pérdidas ocasionadas, principalmente por una disminución en la calidad del fruto. Durante la campaña de 2017 se ha realizado un muestreo en los cultivos de tomate bajo invernadero en distintas regiones productivas del sureste español para determinar la estructura genética de las poblaciones de PepMV. El análisis de detección de PepMV por hibridación molecular (dot-blot) en dos zonas de la Región de Murcia (Águilas y Mazarrón), Almería y Granada, mostró que las poblaciones de PepMV están compuestas mayoritariamente por aislados pertenecientes al genotipo Chileno (PepMV-CH2), aunque también se detectaron aislados próximos a la cepa Europea (PepMV-EU). En particular, los aislados del tipo CH2 fueron detectados de forma predominante en todas las zonas analizadas, mientras que los aislados del tipo EU fueron detectados sobre todo en infecciones mixtas, excepto en Águilas, donde exclusivamente se hallaron aislados del tipo CH2. Entre todos los aislados, se escogieron 52 aislados aleatoriamente y se realizó clonaje y secuenciación de las regiones codificantes del bloque triple de genes y la proteína de la cápsida. Los resultados filogenéticos corroboraron la presencia de ambos grupos de aislados CH2 y EU, y el análisis de variabilidad genética mostró una reducida diversidad nucleotídica, sugiriendo que las poblaciones se encuentran bajo selección purificadora en las distintas zonas productoras. Estos resultados sugieren que los dos tipos de aislados de PepMV continúan circulando en el sureste español y ambos pueden estar contribuyendo a la dinámica evolutiva de PepMV, un aspecto que debe ser considerado en el control de la enfermedad.

**AVANCES EN LA DETECCIÓN DE *Southern tomato virus* (STV) EN DISTINTAS ESPECIES VEGETALES Y EFECTO DE SU COINFECCIÓN CON *Pepino mosaico virus* (PepMV) EN TOMATE**

Alfaro-Fernández, A.<sup>1</sup>; Sanahuja, E. <sup>1</sup>; Blanco, L. <sup>1</sup>; Bosch, R. <sup>1</sup>; Elvira, L.<sup>2</sup>; Rubio, L.<sup>2</sup>; Estévez-Caparrós, J.M.<sup>3</sup>; Muñoz-Yerbes, M.J.<sup>4</sup>; Espino, A.<sup>5</sup>; Botella, M.<sup>5</sup>; Benito, P.<sup>6</sup>; Monagas, J. J.<sup>6</sup>; Serra, J.<sup>2</sup>; Rosello, J.<sup>2</sup>; Hernández, D.<sup>1</sup>; Guerri, J.<sup>2</sup>; Cano-García, A.M.<sup>8</sup>; Reyes-Betancort, J. A.<sup>9</sup>; Galipienso, L. <sup>2</sup>; Font-San-Ambrosio, M.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Virología. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universitat Politècnica de València (mafonsa@upvnet.upv.es); <sup>2</sup>Virología. Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. IVIA ; <sup>3</sup>Granada-La Palma Sociedad Coop. Andaluza; <sup>4</sup>Laboratorio de Diagnóstico Fitopatológico-Virología. Generalitat Valenciana; <sup>5</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal Dirección General de Agricultura. Gobierno Canario; <sup>6</sup>Laboratorio de Fitopatología. Servicio de Laboratorios Agroalimentario y Fitopatológico. Cabildo Insular de Gran Canaria; <sup>8</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal. Región de Murcia; <sup>9</sup>Jardín de Aclimatación de La Oratava (ICIA).

*Southern tomato virus* (STV; género *Amalgavirus*, familia *Amalgaviridae*) fue detectado en España en 2013 y se ha detectado en plantas que presentan frutos con maduración irregular, en infección simple o en coinfección con otros virus, así como en plantas asintomáticas. No se transmite de forma mecánica ni por injerto, pero sí por semilla, con una altísima eficiencia (> 90%).

En este trabajo se resumen diferentes avances en la detección de STV, tanto en diferentes variedades de tomate como en otros hospedantes, así como su efecto en coinfección con el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV). Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto INIA titulado “Emergencia del virus meridional del tomate (*Southern tomato virus*, STV) en cultivos de tomate en España: Caracterización, epidemiología y desarrollo de estrategias para su control” (E-RTA2014-00010-C02-02).

Por el momento, se han analizado más de 20 lotes de semillas, 40 y 20 muestras de plántulas de distintas variedades de tomate y otros cultivos hortícolas (apio, calabacín, lechuga, melón y pimiento), respectivamente, procedentes de semilleros. Además se muestrearon un total de 120 plantas de especies arvenses en Gran Canaria pertenecientes a 9 especies de 7 familias botánicas. En el desarrollo del presente trabajo, se ha podido comprobar que el STV está ampliamente distribuido en el germoplasma de tomate de diferentes variedades, pero no se ha detectado en ninguna otra especie hortícola ni arvense.

Por otro lado para determinar el efecto de STV en infección simple o coinfección con PepMV se llevó a cabo un ensayo compuesto por cuatro bloques de plantas: un bloque de plantas positivas a STV inoculadas con PepMV (infección mixta), otros dos bloques con STV y PepMV, respectivamente (infecciones simples) y un cuarto bloque con plantas no infectadas. En este ensayo se confirmó que las plantas infectadas con STV no presentaban síntomas aparentes y que STV en infección simple y mixta mejoró el desarrollo vegetativo frente a las plantas infectadas con PepMV.

## **2ª Sesión: Hongos y Oomicetos**

### **Moderadores**

**Maela León Santana y Diego Olmo García**



## **AISLAMIENTO DE *Fusarium circinatum* EN MUESTRAS DE MADERA CON CHANCROS RESINOSOS**

Landeras, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias ([elena.landerasrodriguez@asturias.org](mailto:elena.landerasrodriguez@asturias.org))

*Fusarium circinatum* (teleomorfo *Gibberella circinata*) es el agente causal de la enfermedad denominada el chancro resinoso de los pinos.

El protocolo de diagnóstico de *Gibberella circinata* EPPO PM7/91(1), indica el método de aislamiento en medio de cultivo a partir de muestras de semillas, plántulas y chancros resinosos presentes en raíces aéreas, ramas y troncos.

El aislamiento a partir de chancros resinosos, consiste en extraer mediante la utilización de un cuchillo, previamente esterilizado, la parte más externa de la corteza, dejando al descubierto el borde del chancro. Recoger asépticamente trocitos de madera de la zona límite, sumergir en etanol al 70% para eliminar restos de resina, y lavar con abundante agua destilada estéril. Cortar cada trozo en dos mitades y sembrar una mitad en medio de cultivo patata dextrosa agar con estreptomicina (PDA-S) y la otra en Komada.

En Asturias se realizan desde el año 2006, prospecciones anuales en masas forestales de *Pinus* spp. y se toman muestras cuando se observan chancros resinosos para su análisis en el laboratorio.

El Laboratorio de Sanidad Vegetal lleva por lo tanto una década analizando muestras de madera con chancros, siguiendo el método descrito anteriormente, pero en los dos últimos años ha puesto a punto otra metodología basada en realizar una cámara húmeda previa al aislamiento en medio de cultivo que posee dos ventajas importantes: fácil detección y aislamiento del hongo y disminución del riesgo de falsos negativos.

## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES DE MADERA DE VID

Pintos, C., Redondo, V., Costas, D., Aguín, O., Abelleira, A., Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica Areeiro, Deputación de Pontevedra, Subida a la Robleda s/n, 36153 Pontevedra, ([adela.abelleira@depo.es](mailto:adela.abelleira@depo.es))

Las enfermedades de la madera constituyen uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan a la vid en todo el mundo. Se sabe que están provocadas por un complejo de hongos endófitos que, de forma individual o combinada, atacan a la madera de este cultivo, identificándose en la actualidad más de 200 especies.

Dada la importancia económica que tiene la vid en nuestra comunidad, el objetivo de este trabajo fue identificar las especies relacionadas con estas patologías, por morfología y por técnicas moleculares, a partir de muestras de este cultivo recibidas en el laboratorio entre los años 2010-2017.

El aislamiento y la caracterización morfológica de los aislados obtenidos se realizó en distintos medios de cultivo: PDA, AM, AA con acículas de pino y AA con papel de filtro. El estudio molecular se llevó a cabo mediante la amplificación, secuenciación y posterior análisis filogenético de diferentes genes.

En total se detectaron 50 especies diferentes implicadas en las siguientes enfermedades: decaimiento por *Botryosphaeria* (14), pie negro (12), eutipiosis (3), excoriosis (10), yesca (6) y enfermedad de Petri (5). La región ITS y/o el gen *tef1* permitieron la identificación de la mayoría de los aislados. Sin embargo, en algunos casos el análisis filogenético multilocus, en base a secuencias parciales de los genes *cmdA*, *his3*, *rpb2*, *tef1*, *tub2*, y de la región LSU, resultó ser más informativo que la filogenia basada en un único gen, aumentando así la resolución a nivel de especie. De esta manera, para la determinación de aislados responsables del decaimiento por *Botryosphaeria*, la mejor combinación fue con *tub2* y *rpb2*, para los implicados en pie negro (*his3*, LSU y *tub2*) y para los de excoriosis (*tub2*, *his3* y *cmdA*).

Durante estos años de estudio hemos detectado un notable incremento de la incidencia, diversidad y del número de nuevas especies debido, principalmente, al desarrollo de nuevos métodos moleculares de caracterización. Los resultados de este trabajo evidencian la necesidad de utilizar árboles filogenéticos multilocus como un procedimiento rutinario para la identificación de especies.

## **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS: POSIBLES NUEVAS DETECCIONES EN AJO, ALMENDRO Y VID**

Muñoz, R.M. 1; Lerma, M.L. 1; Castillo, P.; Tolosa, V.M.

Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP).

Las nuevas herramientas biotecnológicas permiten la identificación de hongos que no presentan esporulación o no pueden ser identificados mediante métodos morfológicos. Estas técnicas son asimismo útiles para confirmar la identificación morfológica, necesaria en el caso de nuevos patógenos.

La forma más habitual consiste en establecimiento de cultivos puros, bien monospóricos o cultivos por punta de hifa, la extracción de DNA, la amplificación de este por PCR, utilizando una pareja de cebadores universales para la identificación de hongos, la secuenciación de los productos de PCR y el análisis de las secuencias obtenidas mediante el algoritmo BLAST con la base de datos de secuencias del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Este sistema ha sido utilizado para la identificación de cuatro hongos, detectados de forma consistente en ajo, almendro y vid. Estos hongos no están incluidos en la publicación "Patógenos de plantas descritos en España" o no se han encontrado citas en España de los mismos, al menos en el hospedante detectado. Por tanto, es probable que sean nuevas citas de patógenos, aunque también existe la posibilidad de haber sido caracterizados previamente como saprofitos.

En ajo, el hongo se detectó causando podredumbre interna en postcosecha. En almendro dos hongos han sido identificados, uno asociado a podredumbre de raíces y otro asociado a podredumbre en el cuello. En vid, uno de los hongos detectados ha sido identificado como patógeno de la madera en otros países, mientras que el otro hongo, también detectado en almendro, se ha aislado asociado a necrosis de la madera así como en raíces.

En este trabajo se presentan los síntomas observados, así como las identificaciones morfológicas y moleculares efectuadas, con objeto de debatir la posibilidad de tratarse de primeras citas de España y, en su caso, el envío al laboratorio de referencia para la confirmación de su identificación y la realización de las pruebas de patogenicidad pertinentes.

## LA ROYA DEL ARÁNDANO (Continuación)

Landeras, E.<sup>1</sup> León, M.<sup>2</sup>; Berbegal, M.<sup>2</sup> y Armengol, J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias ([elena.landerasrodriguez@asturias.org](mailto:elena.landerasrodriguez@asturias.org));<sup>2</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia.

El genero *Vaccinium* (Ericaceae) es hospedante de tres tipos de roya, *Naohidemycetes vaccinii*, *N. fujisanensis* y *Thekopsora minima* morfológicamente diferenciables por las características de los aecios y telios.

La primera observación de la roya en arándano en España fue en 1997 en dos plantaciones de *V. corymbosum* en Huelva. Posteriormente se identificó y se publicó la primera cita de *Pucciniastrum vaccinii*, sinónimo de *N. vaccinii* en 2002 en el sudeste de España, especie ampliamente distribuida en EEUU.

En Asturias, las primeras observaciones de roya en arándano fueron en 2009 y, desde entonces, todas las muestras recibidas se identificaron como *N. vaccinii*, la especie descrita en España, en base a la observación morfológica de las uredosporas presentes en los uredinios (pústulas de color amarillo anaranjado situadas en el envés de las hojas). Una situación parecida se da en Cantabria y Huelva. Sin embargo, en 2015 se decidió enviar una muestra al Laboratorio de Referencia, donde se identificó la especie *T. minima* mediante métodos morfológicos y la amplificación de la región ITS2-LSU con los primers LR0R y LR6. Muestras de campo recogidas en Asturias en 2015 y 2016 también fueron identificadas como *T. minima*, y en noviembre de 2016, Galicia notificó al MAPAMA su detección en un vivero.

*T. minima* presente en Canadá, EEUU y Japón, ha sido detectada en los últimos años en arándano en Sudáfrica (2010), México y Colombia (2011), Australia (2013) y China (2017). La primera detección oficial en Europa corresponde a Alemania (2015) y desde entonces se han sucedido las siguientes notificaciones: Bélgica (2016), Países bajos (2017) y Portugal (2017).

A raíz de su detección en Europa se incluyó en la lista de alerta de la EPPO, y en la última revisión de septiembre de 2017, se ha incorporado en la Lista A2.

El PRA alemán apunta que algunos registros de *P. vaccinii* en Argentina, Hawai y España, podrían haberse identificado erróneamente y corresponder realmente a *T. minima*. Una vez dicho todo esto, consideramos de gran importancia conocer qué especies de roya están presentes en el arándano en España y el resto de Europa, para determinar si efectivamente *T. minima* ha sido una nueva introducción en la EPPO, o por el contrario, lleva establecido tanto tiempo en Europa como el cultivo del arándano, iniciado en varios países durante la década de 1930.

### ENSAYOS DE PATOGENICIDAD DE *Gymnopus luxurians* EN PLANTAS DE VID

Aguín, O.<sup>1</sup>, Piñón, P.<sup>1</sup>, Sainz, M.J.<sup>2</sup>, Abelleira, A.<sup>1</sup>, Mansilla J.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estación Fitopatológica Areeiro (EFA), Deputación Pontevedra (adela.abelleira@depo.es); <sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.

Durante un estudio sobre la incidencia y distribución de la podredumbre blanca radicular en diferentes zonas de cultivo de vid en Galicia, se recogieron y analizaron muestras de raíz de plantas de vid con síntomas aéreos, y se obtuvieron aislados que formaron un micelio amarillento, compacto y polvoriento en medio de cultivo PDA. La identificación de los aislados se llevó a cabo mediante características morfológicas y por secuenciación y análisis filogenético de la región ITS del ADNr. Las secuencias mostraron una homología del 100% con aislados de *Gymnopus luxurians* disponibles en el Genbank. La secuencia de un aislado del presente estudio fue depositada en el Genbank (MF113050).

Apenas existe información acerca de este hongo como patógeno, por lo que se llevó a cabo un estudio sobre su efecto en plantas de vid. Previamente se produjo inóculo de *G. luxurians* (MF113050) utilizando varetas de dos tipos de material vegetal: viña y pino. Las varetas, de 2,5 cm de longitud x 0,5-0,8 cm de diámetro, se dispusieron en cajas de tinción, se dejaron en agua toda la noche, y se autoclavaron durante 45 minutos a 120°C. Tras enfriar, se añadieron a cada caja 250 mL del medio de cultivo PDA. Una vez gelificado el medio, en cada caja se colocaron 5 fragmentos de los cultivos del aislado de *G. luxurians*, se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron en estufa de cultivo en oscuridad a 24±1°C. A los 8 días se observó que el 100% de las varetas estaban infectadas. Se realizaron dos ensayos de patogenicidad en paralelo: uno colocando el inóculo en el cuello de la planta y otro enterrando el inóculo directamente en el sustrato cerca de las raíces. Para el ensayo de inóculo en cuello se utilizaron 24 plantas de vid; se hizo una herida superficial con un bisturí en el cuello de doce de las plantas, insertándose en seis de ellas una vareta de viña, y una de pino en las otras seis. Las 12 plantas de vid restantes se establecieron como control. Para el ensayo de inóculo en sustrato, se utilizaron 12 plantas: se enterraron dos varetas de viña cerca de las raíces de seis de las plantas (2 varetas/planta) y las otras seis plantas se dejaron como control. En ambos ensayos, en el caso de las plantas control se procedió de la misma forma que con las inoculadas, solo que inoculando varetas esterilizadas. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo bajo condiciones controladas. A los tres meses se observó en todas las plantas inoculadas un ablandamiento de la corteza desde el cuello hacia la parte aérea de la planta, clorosis en las hojas y presencia de micelio. A los seis meses se produjo la muerte de la primera planta, llevándose a cabo el reaislamiento de *G. luxurians*.

## **ENSAYO DE ADAPTACIÓN DEL PROTOCOLO DE CÔTÉ (2004) DE PCR CONVENCIONAL A PCR A TIEMPO REAL MEDIANTE SYBR®green, PARA LA DETECCIÓN DE *Monilinia* spp.**

Arribas Fernández, C.

Laboratorio de Diagnóstico de Sanidad Vegetal , Badajoz.

(cristina.arribas@gpex.es).

En los últimos años, el avance del sector agrícola en Extremadura, y concretamente la comercialización de fruta de hueso, ha llevado a un significativo incremento de las exportaciones, especialmente a terceros países.

La detección en 2009 del hongo *Monilinia fructicola*, ha obligado al estudio minucioso de su ciclo, así como su diagnóstico precoz, fiable y rápido. Este patógeno de cuarentena es uno de los factores limitante en la exportación de fruta de hueso. Primero se emplearon métodos morfológicos; aislamiento del hongo, estudio del tamaño y forma de las fructificaciones, crecimiento y morfología de las colonias, formación o no, de conidios en medios agarizados. Estos métodos son lentos y poco exactos en sus resultados. Recurrir a las técnicas moleculares ha sido imprescindible para obtener resultados fiables y rápidos.

Este ensayo tiene como objetivo estudiar la viabilidad de adaptar los materiales y protocolo de Côté (2004) de PCR convencional (PCR Multiplex), a PCR a Tiempo Real, como posible mejora de los métodos analíticos, requisito necesario para una buena y fluida comercialización.

En la optimización de esta adaptación, se han hecho dos estudios paralelos; uno sobre la variación de la concentración de ADN y otra sobre la variación de la concentración de los cebadores. Se llegaron a unas concentraciones óptimas tanto de ADN, como de cebadores, que nos ha permitido obtener tanto curvas de amplificación como curvas de disociación adecuadas para la diferenciación de las especies objeto de estudio.

Tras la optimización, se obtuvieron para *Monilinia fructicola* valores de Ct de 19 y TM de 78,4° mientras que para *Monilinia laxa* se obtuvieron Ct de 17 y TM de 82,3° valores óptimos en cuanto a las CT para ambas especies, que nos indica un método estable y valores claramente distintos de las TM que nos permite diferenciar e identificar *Monilinia fructicola* de *Monilinia laxa* de manera inequívoca y rápida.

Con estos resultados se demuestra que es posible esta adaptación del protocolo de Côté (2004) de PCR Multiplex convencional, a PCR a Tiempo Real, y que es muy adecuada para análisis simultáneos de gran número de muestras.

## DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium petroliphilum* CAUSANDO PODREDUMBRE DE CALABAZA DE CACAHUETE (*Cucurbita moschata*)

V. González<sup>1\*</sup>, J. Armengol<sup>2</sup>, A. Garcés-Claver<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Unidad de Sanidad Vegetal / Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avenida de Montañana, 930, 50059 Zaragoza; <sup>2</sup>Instituto AgroforestalMediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera S/N, 46022 Valencia; <sup>3</sup>Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Unidad de Hortofruticultura / Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avenida de Montañana, 930, 50059 Zaragoza.

En el año 2016, en la provincia de Valencia se detectaron frutos de calabaza de cacahuete (*Cucurbita moschata* Duchesne) con podredumbres, tanto en campo como en almacén. En ellos se aislaron consistentemente colonias de *Fusarium*. El estudio morfológico, realizado en los medios de cultivo PDA y Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), permitió su identificación como pertenecientes al complejo de especies de *Fusarium solani*. Los macroconidios presentaban 3-4 septos, eran ligeramente curvados y sus dimensiones (34) 45 (51) x (3.5) 4.2 (5)  $\mu\text{m}$ ; los microconidios eran abundantes, ovoides o reniformes y medían (16.4) 8.6 (4.9) x (2.7) 3.4 (4)  $\mu\text{m}$ . Las secuencias de la región ITS y del gen EF-1 $\alpha$  del aislado GIHF-146 mostraron un 99% de homología con secuencias de la especie *F. petroliphilum* (Q.T. Chen & X.H. Fu) D. Geiser, O'Donnell, Short & Zhang. Además, la comparación de estas secuencias en la "Fusarium ID Database" (<http://www.westerdijkinstituut.nl/fusarium/>) también mostró niveles parecidos de similitud. Se realizaron filogenias de estas dos regiones genómicas que confirmaron la identificación de *F. petroliphilum*. Para estudiar su patogenicidad, el aislado GIHF-146 se sembró en medio de cultivo líquido Patata Sacarosa y se mantuvo en agitación durante 2-3 días a 25°C en oscuridad. Plántulas de calabaza (*Cucurbita ficifolia* Bouché cv 'Cabello de Ángel') crecidas en sustrato estéril se sumergieron en una suspensión conidial ( $3 \times 10^6$  conidios/mL) durante 2 minutos y se trasplantaron a macetas con sustrato estéril. Como controles se utilizaron plantas no inoculadas. Simultáneamente, frutos de *C. moschata* se inocularon inyectando 1 mL de la misma suspensión de conidios y los controles se inocularon inyectando agua estéril. Las plántulas y los frutos se incubaron en una cámara de cultivo a 25°C durante 20 días con un fotoperiodo de 16/8 horas. Seis días después de la inoculación aparecieron lesiones con podredumbre y abundante micelio en los frutos, mientras que todas las plántulas y los frutos no inoculados permanecieron asintomáticos. *Fusarium petroliphilum* es una especie descrita recientemente para incluir táxones del complejo *F. solani* que se aíslan tanto de biopelículas de drenaje de fontanería como de queratitis micótica humana, y que también incluye ciertos aislados patógenos de cucurbitáceas anteriormente denominados como *F. solani* f. sp. *Cucurbitae* raza 2, que causan podredumbre específicamente en frutos de calabaza. Hasta la fecha en España solo se había detectado la raza 1 de *F. solani* f.sp. *cucurbitae*.



## **3ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas I**

### **Moderadores**

**Leandro de León Guerra y Raquel Marquínez**



## RIESGO DE INTRODUCCIÓN DE LA CANCROSIS DE LOS CÍTRICOS A TRAVÉS DE PLANTAS ORNAMENTALES NO CÍTRICAS

Redondo, C.<sup>1</sup>, Ferragud, E.<sup>1</sup>, Licciardello, G.<sup>2</sup>, Pruvost, O.<sup>3</sup>, Robene, I.<sup>3</sup>, Licciardello, C.<sup>4</sup>, Caruso, P.<sup>4</sup>, Catara, V.<sup>2</sup>, Cubero, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). <sup>2</sup>Dipartimento di Agricoltura Alimentazione e Ambiente, Università degli Studi di Catania, Italia. <sup>3</sup>CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), Francia. <sup>4</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Italia. Email: ([cubero@inia.es](mailto:cubero@inia.es))

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) y *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolia* (*Xfa*) causan la cancrrosis o chancro de los cítricos, una de las bacteriosis más importantes de este cultivo, caracterizada por la aparición de lesiones acorchadas en hojas, ramas y frutos, que hacen que éstos sean difícilmente comercializables. La cancrrosis es una enfermedad de cuarentena de UE y para evitar su introducción existen medidas reguladoras en relación a la importación de frutos o material vegetal de especies cítricas desde zonas afectadas por la enfermedad.

La EFSA (European Food Safety Authority) ha concluido además que la importación de plantas asintomáticas de especies de rutáceas no cítricas, especialmente aquellas no contempladas en la directiva europea 2000/29EC, también suponen un riesgo de introducción de la cancrrosis. Sin embargo no se conoce en profundidad la interacción real de las bacterias causantes de cancrrosis con estas especies.

El proyecto ORPRAMed (Ornamental *Rutaceae* plants *Xcc* risk assessment in Mediterranean) va dirigido a establecer los riesgos reales que existen de introducir CBC en el área mediterránea a través rutáceas ornamentales, para lo cual se está estudiando entre otras cosas, la susceptibilidad de algunas de ellas a diferentes cepas de *Xcc* y *Xfa*. Además se evalúa la supervivencia de estas bacterias no solo en el interior de los tejidos vegetales sino también en la superficie foliar de estas plantas, ya que *Xcc* está demostrado que es capaz de formar agregados bacterianos o biopelículas que le permiten sobrevivir en condiciones medioambientales adversas.

En este trabajo presentaremos algunos resultados sobre la susceptibilidad de algunos géneros de rutáceas a estas bacterias, así como la supervivencia de las mismas en forma de biopelícula en la superficie de sus hojas sin dar lugar a ningún tipo de sintomatología, con el consiguiente peligro que eso supone para la diseminación de la cancrrosis. Este conocimiento contribuirá al establecimiento, si fuera necesario, de nuevas medidas para evitar la introducción de la cancrrosis en la UE.

El proyecto en España es financiado por el INIA (ERA67-OPRAMED-INIA) dentro de la red Arimnet 2.

## **EXPERIENCIAS EN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y MOLECULAR DE *Xylella fastidiosa***

Abelleira, A., Aguin, O., Piñón, P., Prado, A., Ferreiroa, V., Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica Areeiro (EFA), Deputación Pontevedra, Subida á Carballeira s/n, 36153 Pontevedra, (adela.abelleira@depo.es)

*Xylella fastidiosa* es una bacteria de cuarentena que causa enfermedades de gran importancia económica. En Europa, se detectó por primera vez en el año 2013 sobre olivos en el sur de Italia y, posteriormente se identificó en otros países europeos, entre ellos, España en 2016.

Teniendo en cuenta la alarma que ha suscitado la reciente aparición de esta bacteria en nuestro país, en el laboratorio de la EFA se han establecido varias técnicas, siguiendo los diferentes protocolos de la EPPO, para llevar a cabo el diagnóstico rutinario de material vegetal susceptible tanto sintomático como asintomático. Como técnica serológica se ha optado por ELISA-DAS y para las técnicas moleculares se han seleccionado PCR convencional y Real Time PCR recomendados en el protocolo estándar de la EPPO PM 7/24(2) para *Xylella fastidiosa*; DNA barcoding recomendado en el protocolo de la EPPO PM 7/129 (1) DNA barcoding como herramienta de identificación de algunas enfermedades reguladas y Nested end-point PCR aplicando el kit comercial de la casa Qualiplante (Francia, Referencia PCR.Xfas-25-liq).

En los primeros análisis realizados las muestras fueron siempre negativas para todas las técnicas y siendo congruentes los resultados de los controles utilizados en todos los experimentos. Sin embargo, al ir ampliando el estudio a diferentes huéspedes y, especialmente en aquellas muestras que presentaban algún síntoma (biótico o abiótico) se obtuvieron algunos resultados contradictorios. Por eso el objetivo de este trabajo es presentar nuestra experiencia en el diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal con los diferentes métodos utilizados y las modificaciones que se han realizado en algunas técnicas para conseguir una mayor eficacia y coherencia en los resultados.

## OPTIMIZACIÓN DE LA DETECCIÓN MOLECULAR DE *Xylella fastidiosa* PARA PROSPECCIONES A GRAN ESCALA

Barbé, S.; Ouertani, K.; Gorris, M. T.; Navarro, I.; Morán, F.; Monterde, A.; López, M. M.; Marco-Noales, E.  
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (barbe\_sil@gva.es)

Tras la declaración oficial en 2013 del primer brote en Europa de *Xylella fastidiosa*, en Italia, se establecieron controles en los países de la UE para la detección precoz de dicho patógeno en plantas potencialmente hospedadoras y en los principales vectores. Estos controles incluyen prospecciones periódicas a gran escala, que conllevan el procesado y análisis de un gran número de muestras en el menor tiempo posible, para tomar las medidas correspondientes en caso de resultar positivas, por lo que es fundamental que las técnicas de detección empleadas sean sencillas, rápidas, sensibles y específicas y que, a su vez, tengan un coste asumible.

Con el fin de optimizar el protocolo de detección, se han ensayado tres técnicas de procesado y análisis de las muestras en diferentes matrices vegetales a las que se añadieron distintas concentraciones de *X. fastidiosa*: fijación del extracto vegetal en membrana (*spots*), impresión directa de peciolo sobre membrana, y extracción de ADN genómico siguiendo el protocolo CTAB. Con las tres técnicas se ha procesado también una selección de muestras naturalmente infectadas por *X. fastidiosa* para ser analizadas posteriormente por el método de PCR en tiempo real (Harper *et al.*, 2010 y *erratum*, 2013), considerado como el más sensible para esta bacteria (EPPO, 2016).

El objetivo de estos análisis es poner a punto la impresión de peciolo de hojas de distintas especies, para facilitar la detección molecular a gran escala mediante un primer cribado rápido y fiable del material vegetal, sin recurrir a la extracción de ADN. Con este método únicamente sería necesario realizar un ulterior procesado (con extracción de ADN) en las muestras que resultasen negativas. Una ventaja añadida de esta técnica es que la impresión podría realizarse *in situ* el personal encargado de prospecciones rutinarias de los servicios de sanidad vegetal u otros organismos, evitando el transporte de material potencialmente infectado.

En el trabajo se exponen los resultados obtenidos con muestras de diferentes huéspedes, tanto inoculadas como naturalmente infectadas, centrándose principalmente en almendro, por ser el único hospedador en el que, al menos hasta el momento, se ha detectado *X. fastidiosa* en la Comunidad Valenciana.

## **DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOIMPRESIÓN-ELISA PARA LA DETECCIÓN DE *Xylella fastidiosa* EN DISTINTOS HUÉSPEDES**

Gorris, M.T.<sup>1</sup>; Barbé, S.<sup>1</sup>; Navarro, I.<sup>1</sup>; Monterde, A.<sup>1</sup>; Martínez, M.E.<sup>1</sup>; Gómez, E.<sup>1</sup>; López, M.M.<sup>1</sup> y Marco-Noales, E.<sup>1</sup>

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (mtgorris@ivia.es)

Tras la detección de *Xylella fastidiosa* (Xf) en las Islas Baleares y, posteriormente, en Alicante, se hace aún más necesario disponer de técnicas que faciliten la prospección en amplias zonas y el análisis de gran número de muestras de distintas especies para poder determinar la distribución de la enfermedad y evitar así la dispersión del patógeno. Deben ser técnicas que puedan realizarse con rapidez, bajo coste y que no requieran complejas infraestructuras ni gran especialización técnica.

Las técnicas serológicas y moleculares utilizadas de manera habitual exigen la realización de extractos del material vegetal, lo que dificulta la posibilidad de su utilización a gran escala. Por ello, se han desarrollado variantes de ELISA y PCR que emplean material vegetal inmovilizado sobre membranas. En el caso de las técnicas serológicas, el procedimiento fue descrito como DTBIA (*Direct Tissue Blot Immuno-Assay*) (Lin *et al.* 1990) y ha sido puesto a punto para diferentes modelos, siendo el más estudiado y con el que se posee mayor experiencia el utilizado para la detección de CTV (Cambra *et al.* 1992). De hecho, el DTBIA está recomendado en el protocolo de diagnóstico de la EPPO para *X. fastidiosa* (2016) para el análisis a gran escala de muestras sintomáticas de olivo.

Se ha puesto a punto un método de Inmunoimpresión-ELISA (DTBIA) para la detección de Xf. Para ello se han obtenido seis antisueros que se han evaluado frente a una colección de cepas de Xf y otras bacterias de distintos géneros. Se ha seleccionado el antisuero Xf1-wc/IVIA, capaz de reconocer todas las cepas de Xf estudiadas y no mostrar reacción cruzada con otras bacterias de distintos géneros.

Se ha comparado la detección de Xf mediante la técnica de Inmunoimpresión-ELISA y la técnica de PCR en tiempo real (Harper *et al.* (2010, erratum 2013) con extracción previa de ADN mediante CTAB, con muestras de distintos huéspedes enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia por los Laboratorios de Sanidad Vegetal de Baleares y de la Comunidad Valenciana, habiéndose obtenido excelentes resultados, también se está realizando un seguimiento comparativo entre las dos técnicas en muestras de dos parcelas de almendro de la Comunidad Valenciana, en las que previamente se ha detectado Xf. La precisión diagnóstica obtenida con la Inmunoimpresión-ELISA versus PCR en tiempo real tras extracción de ADN, posibilita la utilización de la técnica desarrollada, para el cribado rutinario a gran escala, de muestras sospechosas de Xf, con el consiguiente ahorro económico de tiempo.

## **4ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas II**

### **Moderadores**

**Ana Palacio Bielsa y Silvia Barbé Martínez**

## DETECCIÓN DE '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' Y *Spiroplasma citri* EN SEMILLAS COMERCIALES DE UMBELÍFERAS MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Alfaro- Fernández, A.<sup>1</sup>; Blanco, L.<sup>1</sup>; Sanjuán, S.<sup>2</sup>; Font, M.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universitat Politècnica de València (IAM-UPV) ([analfar1@doctor.upv.es](mailto:analfar1@doctor.upv.es)); <sup>2</sup> Agrícola Villene Coop. V.

Durante el año 2008, se iniciaron los estudios para determinar la etiología de los desarreglos vegetativos observados en algunos cultivos de apio y zanahoria de Villena (Alicante). En 2010 y 2014, se detectaron asociados a esta enfermedad dos organismos restringidos al floema: *Spiroplasma citri* y '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'.

'Ca. L. solanacearum' es una bacteria Gram-negativa que se transmite de manera persistente mediante distintas especies de psilas. Se han descrito 5 haplotipos diferentes: LsoA y LsoB asociados con *Bactericera cockerelli* (Orden: Hemiptera) en cultivos de patata, tomate y pimiento; mientras que los haplotipos LsoC, LsoD y LsoE están asociadas con *Bactericera trigonica* y *Trioza apicalis* en cultivos de zanahoria y apio. *S. citri* es una bacteria que pertenece al género Mollicutes y se transmite mediante cicadélidos a diversas especies principalmente de las familias Rutaceae y Apiaceae. Ambos organismos se transmiten mediante semillas comerciales de zanahoria.

Desde su detección en España, su incidencia en los cultivos de zanahoria, apio y chirivía de nuestro país, sigue siendo alta e incluso se ha visto incrementado en algunas zonas. Por ello y con el fin de conocer el papel que desempeña la semilla comercial en la dispersión de ambos patógenos, se planteó evaluar la presencia de 'Ca. L. solanacearum' y *S. citri* en semilla comercial de zanahoria, apio y chirivía, así como determinar los haplotipos de 'Ca. L. solanacearum' en lotes de semilla positivos.

Se analizaron un total de 229 lotes de semilla en tres años (2015-2017) mediante PCR a tiempo real con cebadores y sondas TaqMan específicas de ambos patógenos. Se seleccionaron dos muestras de semillas de zanahoria positivas a 'Ca. L. solanacearum' para la identificación de los haplotipos presentes.

Los resultados de los análisis reflejaron que la bacteria 'Ca. L. solanacearum' estaba presente en el 10%, 35% y 37% de los lotes de zanahoria analizados en 2015, 2016 y 2017, respectivamente. En semilla de apio, únicamente se detectó la presencia de esta bacteria en el 2,4 % de los lotes analizados, y en chirivía fue detectada en el 21% y 37% de los analizados de 2015 y 2017, respectivamente, pero no en los analizados en 2016.

Por otro lado, *S. citri* se detectó en el 3%, 8% y 4% de los lotes de zanahoria analizados de 2015, 2016 y 2017, respectivamente, y en chirivía en el 2% de los lotes analizados en 2015. Sin embargo, este organismo no fue detectado en ninguno de los lotes analizados de apio.

Las dos muestras de semilla de zanahoria positivas a 'Ca. L. solanacearum' secuenciadas presentaron infección mixta de los haplotipos D y E.

## EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE PROTOCOLOS DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE '*Candidatus Liberibacter*' spp. EN CÍTRICOS.

Morán, F.; Navarro, I.; Peñalver, J.; Barbé, S.; López, M. M.; Marco-Noales, E.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

'*Candidatus Liberibacter*' spp. agrupa bacterias limitadas al floema de la planta y a la hemolinfa de sus vectores, e incluye patógenos asociados a enfermedades que afectan a cultivos de gran importancia económica, como son los cítricos o plantas hortícolas de las familias solanáceas y apiáceas. Estos patógenos producen diversos síntomas en sus huéspedes, todos ellos relacionados con la reducción en el suministro de nutrientes. La enfermedad conocida como *huanglongbing* (HLB o *greening*) de los cítricos, asociada a '*Ca. Liberibacter africanus*', '*Ca. Liberibacter asiaticus*' y '*Ca. Liberibacter americanus*', supone un grave problema para la citricultura de aquellos países donde está presente y constituye una seria amenaza para toda la cuenca mediterránea, libre hasta el momento de estas bacterias. Estas especies aún no se han podido cultivar, lo que supone una gran dificultad para su estudio. Aunque hay varios protocolos específicos para la detección por PCR en tiempo real de las tres especies causantes de HLB, hay pocos diseñados para la detección universal de '*Ca. Liberibacter*' spp., entre ellos el de Bertolini *et al.* (2014), que figura en el protocolo EPPO (2014). Los protocolos universales tienen la ventaja de que permiten realizar un cribado rápido de las muestras a analizar y las positivas posteriormente deben ser analizadas con protocolos específicos como el descrito por Li *et al.*, (2006), según EPPO (2014).

Entre los años 2014 y 2017 en el Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas (LNR) se analizaron 128 muestras de cítricos mediante la PCR en tiempo real de Bertolini *et al.* (2014). Los análisis dieron resultado negativo en la mayoría de las muestras (122), mientras que solo 6 mostraron una curva de amplificación en ciclos tardíos (Ct: 38-45). El análisis bioinformático de las secuencias amplificadas mostró que ninguna de ellas tenía homología con secuencias de especies de '*Ca. Liberibacter*' depositadas en la base de datos del NCBI. Sin embargo, sí que se encontró homología con secuencias de especies de los géneros *Sphingomonas* y *Rhizobium* y con una bacteria no cultivable (no clasificada). Además de ello, una muestra también amplificó para una PCR de una especie asociada a HLB (Li *et al.*, 2006), tratándose de *Sphingomonas* ssp. Un análisis detallado de las secuencias demostró que existían regiones con una alta afinidad tanto por el cebador directo (CalsppF) como por la sonda (sonda HLBr) diseñados por Bertolini *et al.* (2014) y por Li *et al.* (2006), respectivamente. Aunque se ha encontrado un porcentaje de amplificaciones no deseadas inferior al 1% con la PCR universal (Bertolini *et al.*, 2014), sigue siendo válida para un cribado rápido de muestras para la detección de HLB. Sin embargo, es necesario optimizar la PCR específica para '*Ca. Liberibacter asiaticus*' (Li *et al.*, 2006) para evitar amplificaciones no deseadas.

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS ARNr EN LA  
CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE *Candidatus Liberibacter  
solanacearum*: PROBLEMAS EN EL HAPLOTIPADO DE POBLACIONES  
DE CALSO**

Redondo, C.<sup>1</sup>, Ruiz-Padilla, A.<sup>1</sup>, Ferragud, E.<sup>1</sup>, Asensio, A.<sup>1</sup>, Garita-Cambronero, J.<sup>1</sup>, Palomo, J.L.<sup>2</sup>, De Leon, L.<sup>3</sup>, Siverio, F.<sup>4</sup>, Cubero, J.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA);  
<sup>2</sup>Centro regional de Diagnóstico (Junta de Castilla y León); <sup>3</sup>Asociación Nacional de Obtentores Vegetales (ANOVE); <sup>4</sup>Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). E-mail: ([cubero@inia.es](mailto:cubero@inia.es))

*Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso) es una bacteria gran negativa no cultivable, agente causal de la enfermedad conocida como “zebra chip” en tubérculo de patata. Además también puede afectar a otras especies de solanáceas como tomate o pimiento, y apiáceas como apio, chirivía, y zanahoria.

En base a la comparación de las secuencias correspondientes a los genes que codifican para los ARN ribosómico (ARNr) 50S y 16S, se han identificado cinco haplotipos de la bacteria (A, B, C, D y E). En España han sido descritos los haplotipos D y E en chirivía y zanahoria, y recientemente el haplotipo E en patata. El método de haplotipado basado en el ARNr puede presentar algunas dificultades. En primer lugar, el número de copias de estos operones ribosómicos por genoma bacteriano puede variar entre las cepas estudiadas, y existir un cierto grado de heterogeneidad entre las secuencias correspondientes a una misma cepa. Obviamente, esta variabilidad, tiene importantes implicaciones prácticas para la identificación de los haplotipos. Además, procesos técnicos como la extracción del ADN y la amplificación de los ARNr, son factores críticos que pueden condicionar la obtención de resultados.

Actualmente, están disponibles las secuencias de los genomas completos de la mayor parte de los haplotipos de CaLso, por lo que es posible realizar la comparación múltiple de diferentes regiones génicas de los mismos. En este trabajo se muestra la potencialidad de algunos genes que por su función *housekeeping* puedan ser útiles en una estrategia de análisis multilocus de secuencias (MLSU-*multilocus sequence analysis*) como un instrumento de genotipificación para mejorar la reproducibilidad del método actual.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto ERTA2014-0008-C04-03



## DETECCIÓN DE *Acidovorax citrulli* EN SEMILLAS DE CUCURBITÁCEAS : qPCR + TESTS WEAT-BOX

Pérez, V.<sup>1</sup>; Moyano, C<sup>1</sup>; Portillo, I<sup>1</sup>; Gálvez, J. M.<sup>1</sup>; Viles, A. M.<sup>2</sup>; De León, L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA);

<sup>2</sup>Semillas Fitó – Barcelona

<sup>3</sup>Asociación Nacional de Obtentores Vegetales (ANOVE) ([ldeleon@anove.es](mailto:ldeleon@anove.es))

*Acidovorax citrullis* el agente causante de la mancha bacteriana del fruto (BFB – *bacterial fruitblotch*) en cucurbitáceas, que afecta principalmente a sandía y melón, y en menor medida a pepino, calabacín y calabaza. Esta bacteria se transmite por semillas y ha sido incluida en la lista A1 de patógenos de cuarentena en la UE. El desarrollo de esta enfermedad se ve favorecido por unas condiciones ambientales más propias de climas tropicales, con temperaturas y humedad relativamente altas. Esta es una de las causas por las que no se ha establecido en el territorio nacional o por las que tan sólo se ha detectado de forma esporádica en territorio europeo. Sin embargo, esta enfermedad es considerada como una de las principales amenazas para las empresas españolas de semillas, que tienen sus áreas de producción en regiones donde la bacteria está presente. El comercio de estas semillas requiere de controles sanitarios adecuados que aseguren la ausencia del patógeno en el material vegetal.

Los protocolos para la detección de *A. citrulli* a partir de muestras de semillas indican la necesidad de confirmar la viabilidad del patógeno antes de dar un resultado positivo. En ausencia de medios de cultivo adecuados para el aislamiento del patógeno, la alternativa es aplicar de forma combinada técnicas de detección moleculares y bioensayos: los lotes de semillas son sometidos a un *prescreening* por qPCR que en caso de dar un resultado positivo para *A. citrulli* son evaluados mediante el test de *sweat-box*, una prueba de germinación donde se dan las condiciones idóneas para el desarrollo de síntomas de la enfermedad.

En este trabajo se presentan los resultados preliminares de los ensayos de detección de *A. citrulli*. Las evaluaciones se han realizado con muestras de semillas de melón infectadas de forma natural con el patógeno, mediante la utilización de un protocolo que combina qPCR y el test *sweat-box* y que actualmente se encuentra en fase de evaluación en ISHI-Veg (*International Seed Health Initiative for Vegetables*). Se muestran los aspectos más relevantes del método, prestando especial atención a los puntos críticos durante su desarrollo.

### ***Pectobacterium parmentieri*. ¿UN NUEVO PATÓGENO EN ESPAÑA?**

Feria, F.J.<sup>1</sup>; Martín-Robles M.J.<sup>1</sup>; Suárez, M.B.<sup>2</sup>; Palomo, J.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Regional de Diagnóstico (Junta de Castilla y León) ([palgomio@jcyf.es](mailto:palgomio@jcyf.es)); <sup>2</sup>Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC/Universidad de Salamanca)

El género *Pectobacterium* (*Erwinia*) incluye especies causantes de podredumbres blandas en diferentes cultivos, con una gran importancia económica a nivel mundial. En el caso concreto del cultivo de la patata es el agente causante de la podredumbre blanda de los tubérculos y del pie negro. Tradicionalmente la identificación de estas especies se ha realizado mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas clásicas. Sin embargo, la utilización de estas pruebas, no permitía una correcta identificación de todas las cepas aisladas, siendo necesario recurrir a técnicas moleculares (PCR).

Al aplicar diferentes métodos de PCR a cepas de *Pectobacterium* aisladas de tubérculos con podredumbre blanda en Castilla y León entre 2009 y 2016, se obtuvieron 4 cepas que inicialmente fueron identificadas como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, con resultado negativo en PCR para detección de *P. atrosepticum* y *Dickeya* spp. (Peters et al., 2007) y con resultado positivo para *P. c. carotovorum* (Kang et al., 2003). Sin embargo, su identificación bioquímica y fisiológica no concordaba con la descrita para la subespecie *carotovorum*, ya que no había crecimiento a 37°C ni en NaCl 5%. Además se obtuvo resultado negativo al aplicar un método de PCR específico para *P. c. carotovorum* (Suarez et al., pte. publ.). Como el método de PCR Kang et al. puede reconocer cepas de *P. wasabiae*, se utilizaron unos cebadores específicos para *P. wasabiae* (Kim et al., 2012), con los que se obtuvo resultado positivo en las cuatro cepas analizadas, confirmándose inicialmente la primera identificación de esta especie en España. No obstante, al efectuar una caracterización bioquímica más exhaustiva, se comprobó que los aislados obtenidos diferían en su capacidad para producir ácido de melibiosa, rafinosa, lactosa y D-galactosa, con respecto a la cepa tipo de *P. wasabiae*. A finales de 2016, Khayi et al., propusieron la reclasificación de las cepas de *P. wasabiae* aisladas de patata en una nueva especie, *P. parmentieri*, cuya descripción bioquímica si concuerda plenamente con la obtenida en nuestros aislados. Para confirmar esta identificación se secuenció el ARN ribosomal 16S de los aislados, que al compararlo con la base de datos Ez-taxon, mostró una identidad de entre el 99,6 y el 100% con la cepa tipo de *P. parmentieri*.

Se confirma por tanto la primera detección de *P. parmentieri* en España, aunque en realidad puede considerarse una reclasificación de cepas que hasta ahora se habían considerado como *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

## IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DEL CHANCRO ESPUMOSO DE ALMENDRO

Arroyo, F.T., Rodríguez-Berbel, N., Camacho, M.G., Capote, N.

Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) Centro Las Torres-Tomejil ([marian.capote@juntadeandalucia.es](mailto:marian.capote@juntadeandalucia.es))

El cultivo del almendro ha experimentado importantes cambios en las últimas décadas en Andalucía. Así, de ser un cultivo relegado a zonas poco productivas y casi en su totalidad cultivado en secano, ha pasado a ser un cultivo mayoritariamente en regadío en zonas agrarias de vega de gran fertilidad. Por otro lado, el uso de nuevas variedades y distintos tipos de manejo (convencional, ecológico, intensivo, superintensivo), han generado un escenario totalmente distinto, con importantes demandas de conocimiento en aspectos relacionados con la detección e identificación de plagas y el diagnóstico certero de enfermedades.

En plantaciones de almendro de la provincia de Sevilla se detectaron árboles afectados de chancro espumoso o “foamycanker”. Los árboles presentaban desecación total de las ramas, y un exudado gomoso a partir de chancros ocasionados en la parte alta del tronco y en la base de las ramas. Cuando los síntomas fueron muy severos se produjo un exudado de color salmón-naranja acompañado de una espuma blanca con un intenso olor a fermento. También se observó necrosis en los haces vasculares de las ramas afectadas. Los árboles finalmente se marchitan y mueren. La enfermedad se detectó en las variedades “Lauranne”, “Guara”, “Marta” y “Soleta” en árboles de edades comprendidas entre los 3 y los 10 años.

El agente causal del chancro espumoso es desconocido aún. Por ello, en un intento por determinar el/los agente/s causal/es de esta enfermedad se hicieron aislamientos a partir de exudados y haces vasculares de plantas enfermas. Del exudado se aisló una bacteria anaerobia facultativa, con forma de bacilo, colonia color marfil, con capacidad de crecer a pH 3,5. La secuenciación del ADNr 16S identificó a *Gibbsiella greiggi*, la cual ha sido asociada con el decaimiento del roble en EEUU. A partir de los haces vasculares necrosados se aisló una bacteria anaerobia facultativa, bacilo, colonia de color salmón anaranjado, que se identificó por secuenciación del ADNr 16S como *Methalobacterium*.

Ambas bacterias han sido caracterizadas en base a una serie de actividades enzimáticas y se han inoculado en árboles jóvenes de almendro de la variedad “Guara”, individual y conjuntamente para evaluar posibles síntomas.

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación del proyecto PP.AVA.AVA201601.18; P.O FEDER Andalucía 2014-2020: “Gestión integral del cultivo del almendro y otros frutos secos en Andalucía (INNOVA-Nuts)”.

## BACTERIAS ASOCIADAS AL FOAMY CANKER O CHANCRO ESPUMOSO DEL ALMENDRO

Monterde, A.<sup>1</sup>; Gorris, M.T.<sup>1</sup>; Morente, M.C.<sup>1</sup>; Morán, F.<sup>1</sup>; Barbé, S.<sup>1</sup>; Navarro, I.<sup>1</sup>; Malagón, J.<sup>2</sup>; López, M.M.<sup>1</sup>; , Marco-Noales, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

(emarco@ivia.es)<sup>2</sup>Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural, Generalitat Valenciana

El chancro espumoso del almendro es una enfermedad emergente de etiología desconocida. De hecho, está muy poco estudiada, y de ella se sabe poco más que los síntomas que la caracterizan. El más típico, y que da nombre a la enfermedad, es una espuma de color anaranjado que brota de chancros en el tronco, donde el tejido subcortical aparece necrosado. Además, en la herida se percibe olor a alcohol. Hasta la fecha, la única bacteria que se había relacionado en EE. UU. con esta enfermedad pertenecía a *Zymomonassp.*, bacteria vascular en diversas plantas y fermentadora de azúcares, pero con la que no se han logrado reproducir los postulados de Koch.

En España, se tienen también noticias de la presencia de dichos síntomas en plantaciones de almendro de distintas CC. AA. En 2016 y 2017, entre finales de verano y principios de otoño, se han recibido y analizado en el IVIA 10 muestras de almendro, de 5 orígenes distintos y de las variedades Lauranne, Soleta y Vairo, que presentaban chancros espumosos, en algunos casos muy espectaculares por la longitud del chancro y la abundancia de espuma naranja. Se analizaron tanto muestras del exudado como del tejido subcortical para la presencia de bacterias. En general, hubo un crecimiento abundante de colonias bacterianas, algunas de ellas mayoritarias. En dos casos se aisló *Lonsdalea quercina* y en otros tres una bacteria próxima a dicha especie o a *Brenneria sp.*, descritas como causantes de chancros en quercíneas y otros huéspedes forestales. En todas las muestras, se hallasen o no colonias tipo *Lonsdalea*, se aislaron otras colonias de color blanquecino que se correspondían con una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, oxidasa negativa, catalasa positiva, que ha sido identificada por secuenciación del 16SARNr como *Zymobacter palmae*. Es una bacteria fermentadora de azúcares aislada de savia de palmera en Japón, que produce etanol y CO<sub>2</sub>. Hasta donde sabemos, es la primera vez que *Z. palmae* se aísla de almendro. La relación directa de todas estas bacterias con la patología del chancro espumoso está ahora siendo estudiada mediante ensayos de patogenicidad.



## **5ª Sesión: Bacterias y Fitoplasmas III**

### **Nematodos**

#### **Moderadores**

**Felipe Siverio de la Rosa y Elena Landeras Rodríguez**

## PROBLEMAS CON EL MÉTODO ENRIQUECIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE *Erwinia amylovora* EN MUESTRAS DE MANZANO ASINTOMÁTICAS

Landeras, E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias ([elena.landerasrodriguez@asturias.org](mailto:elena.landerasrodriguez@asturias.org))

El protocolo de diagnóstico de *Erwinia amylovora* EPPO PM7/20(2) indica que su detección en muestras asintomáticas es difícil y que por lo tanto las muestras deben ser tomadas en verano o principios del otoño para incrementar la probabilidad de detección.

Además, indica que el análisis directo de muestras asintomáticas es normalmente negativo debido a la baja población bacteriana presente y aconseja realizar un paso previo de enriquecimiento en dos medios: uno no selectivo (King B) y otro semi-selectivo (CCT), a 25 °C durante 48 h ó 72 h. En este punto indica que se deben incluir tubos con sólo el tampón de maceración como controles negativos del enriquecimiento, pero en ningún caso comenta la posibilidad de utilizar controles positivos.

El siguiente paso es utilizar al menos dos de las siguientes técnicas para detectar directa o indirectamente la presencia de *E. amylovora*: ELISA-DASI, PCR, PCR en tiempo real y aislamiento a partir del enriquecimiento.

En Asturias se analizan entre finales de verano y principios de otoño numerosas muestras asintomáticas procedentes de vivero, principalmente de manzano, utilizando el enriquecimiento en los dos medios selectivos mencionados y tres técnicas para la detección: aislamiento en CCT, ELISA-DASI y PCR convencional según Taylor, *et al.* (2001). La única variante con respecto al protocolo EPPO, es que se incluyen en el enriquecimiento varios tubos control para cada medio: tampón de maceración (control negativo de enriquecimiento – NEC1), extracto mezcla de las muestras asintomáticas a analizar (NEC2), tampón de maceración al que se añade una pequeña cantidad de una suspensión de *E. Amylovora* avirulenta de referencia (control positivo de enriquecimiento – PEC1) y extracto mezcla de las muestras asintomáticas a analizar al que se añade la misma cantidad de *E. Amylovora* (PEC2)

En este Trabajo presentamos la experiencia obtenida al aplicar el método de enriquecimiento y tres técnicas de detección de *E. amylovora* en muestras de Manzano asintomáticas, al incluir los controles descritos anteriormente.

**PROBLEMÁTICA CON EL MEDIO MGY PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Pseudomonas syringae* PATÓGENOS DE KIWI Y CON EL MEDIO SSM PARA EL AISLAMIENTO DE *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***

Landeras, E.<sup>1</sup>; López, M. M.<sup>2</sup>; Santiago, R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias; <sup>2</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA); <sup>3</sup> Laboratorio de Diagnóstico del Servicio de Sanidad Vegetal, Badajoz ([remedios.santiago@juntaex.es](mailto:remedios.santiago@juntaex.es))

El medio de cultivo B de King o KB (King, Ward y Raney, 1954) es el más utilizado para la observación de la producción de pigmentos fluorescentes a la luz UV, de las bacterias pertenecientes al grupo de *Pseudomonas* fluorescentes. Además de este medio, hay otros como MGY (Bender y Cooksey, 1986) utilizados también para tal fin.

En la anterior reunión del GEDDI (2015), celebrada en Sevilla se presentó un trabajo de detección de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en limonero donde se mostraban los mejores resultados obtenidos con el medio MGY, en comparación con el medio KB en cuanto a intensidad de la fluorescencia. Por ello, se evaluó su interés para la identificación de *P. syringae* pv. *actinidiae*, agente causal del chancro bacteriano del kiwi, así como los aislamientos de su biovar 4 que posteriormente han pasado a denominarse *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*, ya que dichos patovares no presentan fluorescencia en medio KB y en cambio sí lo hace *P. syringae* pv. *syringae*, frecuentemente presente en kiwi.

En ensayo realizado en el IVIA con cepas de 3 patovares de *P. syringae* (pv. *syringae*, pv. *actinidiae* y pv. *actinidifoliorum*) los resultados para *syringae* y *actinidiae* (1 cultivo) han sido los esperados: positivos en los dos medios, en el pv. *syringae* y negativos en los dos medios para el pv. *actinidiae*; pero no coincidentes en 4 cultivos de *actinidifoliorum*: 3/4 negativos en KB y 4/4 positivos en MGY.

En aislamientos asturianos de los patovares *actinidiae* y *actinidifoliorum* también se han observado casos de fluorescencia positiva en MGY, manteniéndose negativos en KB.

En vista de la discrepancia de resultados observada y dado que el protocolo de diagnóstico de *P. syringae* pv. *actinidiae* EPPO PM7/120(1) propone el medio KB, no se recomienda utilizar como alternativa el medio MGY para determinar la fluorescencia en aislados de *Pseudomonas* procedentes de kiwi.

Por otra parte, el medio semiselectivo SSM (Tegli, et al. 1998) se propone en el protocolo EPPO de diagnóstico de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* PM7/102(1), para el aislamiento semiselectivo a partir de muestras vegetales y de semillas. Sin embargo, se ha constatado que además de ser un medio de composición compleja y preparación muy laboriosa, no se consigue crecimiento de varias cepas de colección en Asturias, de este patovar, ni tampoco con dicho medio elaborado en el IVIA y con cepas de colección del IVIA. Por lo tanto, no se aconseja su uso para el aislamiento de dicho patógeno.

## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE ESPECIES DEL GENERO *Xiphinema*

Abelleira A., Aguín O., Prado, A., Piñón, P., Ferreiroa, V., Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica Areeiro (EFA), Deputación Pontevedra, Subida á Carballeira, s/n, 36153 Pontevedra. ([adela.abelleira@depo.es](mailto:adela.abelleira@depo.es))

El género *Xiphinema* actualmente se divide en dos grupos: el grupo *Xiphinema americanum* (61 spp.) y el grupo *Xiphinema non-americanum* (200 spp.). Ambos engloban importantes especies patógenas y polífagas, con lo cual se hace necesario disponer de herramientas de identificación adecuadas para obtener un diagnóstico fiable.

Tradicionalmente, su identificación se basaba en los caracteres morfológicos y morfométricos, los cuales presentan generalmente poca diversidad interespecífica, lo que dificulta su diagnóstico. Sin embargo, en los últimos años la aplicación de las técnicas moleculares y, en consecuencia, el aumento del número de secuencias incluidas en las base de datos han contribuido de una forma complementaria a su identificación. La integración de los resultados morfológicos, morfométricos y moleculares permite una clasificación taxonómica más precisa y facilita la caracterización de especies de ambos grupos del género *Xiphinema*.

Por eso el objetivo de este trabajo es identificar especies del género *Xiphinema* obtenidas a partir de diversos cultivos durante el periodo 2013 - 2017 aplicando el estudio taxonómico integrativo y discutir las ventajas y limitaciones encontradas.

Para el análisis molecular se ha utilizado principalmente la amplificación, secuenciación y análisis filogenético de los segmentos de expansión D2-D3 del 28S rDNA.

En el estudio se han determinado once especies; seis pertenecientes al grupo *Xiphinema americanum*: *X. brevisicum*, *X. madeirense*, *X. pachtaicum*, *X. rivesi*, *X. paratenuicutis* y *X. santos* y cinco incluidas en el grupo *Xiphinema non-americanum*: *X. index*, *X. turdetanense*, *X. pseudocoxi*, *X. coxieuropaeum* y *X. abrantinum*.



## **EJERCICIOS ANUALES DE INTERCOMPARACIÓN (2015 A 2017) PARA LA DETECCIÓN DE *Xiphinema index***

Muñoz, R.M. 1; Lerma, M.L. 1; Castillo, P.

Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP).

En 2015 el Laboratorio del Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria (SEDAF) del Instituto Técnico Agronómico Provincial de Albacete (ITAP) fue acreditado según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 para la realización del ensayo “Detección de nematodos de la familia *Xiphinema* e identificación morfológica de la especie *Xiphinema index* y *Xiphinema diversicaudatum* mediante microscopía”.

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025, recoge que el laboratorio debe tener procedimientos de control de la calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos y las calibraciones llevadas a cabo, incluyendo la participación en programas de intercomparación entre las herramientas básicas de aseguramiento de la calidad de los laboratorios.

Dado que no se han encontrado ejercicios de intercomparación suministrados por un proveedor, este laboratorio ha sido el organizador de los ejercicios realizados. El objetivo fundamental de estos ejercicios es evaluar la calidad de los resultados obtenidos en el ensayo de detección de *Xiphinema index*, a través de la comparación e intercambio de información posterior entre los laboratorios participantes en el ensayo.

Los ejercicios han sido realizados en 2015, 2016 y 2017, participando 3, 7 y 6 laboratorios, respectivamente. El número de muestras que fueron remitidos anualmente a los laboratorios participantes fue de 3, incluyendo al menos una muestra positiva y otra negativa. El porcentaje medio de coincidencia de resultados obtenido entre laboratorios ha sido del 83,4%.

En el presente trabajo se exponen detalles de la organización de los ejercicios, se comentan los resultados obtenidos y se indican las recomendaciones de diagnósticos a realizar para la implantación de nuevos viñedos.

### **ECLOSION MATRICIDA en *Bursaphelenchus xylophilus***

Abelleira, A., Prado, A., Ferreiroa, V., Mansilla, J.P.

Estación Fitopatológica Areeiro (EFA), Deputación Pontevedra, Subida á Carballeira, s/n, 36153 Pontevedra, ([adela.abelleira@depo.es](mailto:adela.abelleira@depo.es))

El organismo de cuarentena *Bursaphelenchus xylophilus*, nematodo de la madera del pino, se identifica por primera vez en Europa en 1999 en la península Ibérica, siendo actualmente el único territorio afectado en este continente.

En Galicia, una de las comunidades autónomas donde se ha detectado, se mantiene la población en condiciones de laboratorio para posteriores estudios.

La cría y multiplicación de *B. xylophilus* se realiza generalmente en placas de PDA (Potato Dextrose Agar) con el hongo *Botrytis cinerea* Pers incubadas en estufa. Una vez alcanzada una alta densidad de la población, las placas se lavan con agua destilada estéril y se almacenan en nevera. Mensualmente las placas se revisan para controlar su estado y viabilidad.

Durante el proceso de control de las placas almacenadas en frío, se observó el fenómeno de desarrollo y eclosión intrauterina de huevos ocasionado la muerte de la hembra, también denominado eclosión matricida, habitual en nematodos de vida libre, entomopatógenos u otros nematodos parásitos. Sin embargo este fenómeno es muy poco común en fitopatógenos que generalmente se reproducen sexualmente con oviposición, como es el caso de *B. xylophilus*. Existen muy pocas referencias de este fenómeno en nematodos fitopatógenos, entre las que se incluyen algunos géneros y especies de *Anguina* spp., *Meloidogyne* spp. y *Xiphinema* spp. entre otros. En el género *Bursaphelenchus*, solamente está citado en *B. eremus*.

En cuanto a las posibles causas que pueden inducir este fenómeno, existen estudios que lo asocian a la baja disponibilidad de alimento, altas densidades de nematodos, bajas temperaturas en poblaciones almacenadas, edad materna avanzada o disfunción de los órganos reproductivos de la hembra debido a su senescencia. Aunque estos factores podrían explicar la presencia de este fenómeno en nuestra población, se necesitan más estudios para conocer las causas reales del desarrollo y eclosión intrauterina de huevos en hembras de *B. xylophilus*.

## BARCODING EN NEMATODOS FITOPARÁSITOS

Palomares-Rius, J.E.<sup>1</sup>; Cantalapiedra-Navarrete, C.<sup>1</sup>; Archidona-Yuste, A.<sup>1</sup>; Subbotin, S. A.<sup>2,3</sup>; Castillo, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC (IAS-CSIC), Córdoba ([palomaresje@ias.csic.es](mailto:palomaresje@ias.csic.es)); <sup>2</sup>Plant Pest Diagnostic Center, California, USA; <sup>3</sup>Center of Parasitology of A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

La identificación tradicional de especies de nematodos fitoparásitos mediante estudios de morfología y morfometría es complicada por la presencia de una alta variabilidad morfológica que puede incidir en un gran solapamiento de muchos caracteres provocando una interpretación ambigua de éstos para el diagnóstico de especies. En muchos casos existe la presencia de especies crípticas (muy similares morfométricamente, pero distintas molecularmente) que hacen necesaria la utilización de marcadores moleculares conservados (generalmente ribosómicos o mitocondriales) que permiten la correcta identificación de dichas especies. Por este motivo, es necesario integrar la morfología y morfometría con marcadores moleculares apropiados en un contexto de “taxonomía integrativa”.

En este contexto las técnicas de barcoding para distintos marcadores moleculares pueden ayudar a la identificación de especies tanto en estudios rutinarios de poblaciones de campo como en estudios de meta-barcoding de suelo. Los genes ribosómicos (18S, región D2-D3 del gen 28S y la región intergénica de separación de genes ribosómicos(ITS)) y algunos marcadores moleculares del ADN mitocondrial (*cox1* y *cytB*) parecen ser buenos marcadores para la identificación y filogenia en nematodos.

La familia Longidoridae comprende importantes especies de nematodos fitoparásitos, tanto por su parasitismo al alimentarse de las raíces de las plantas, como por ser transmisores de algunas especies de nepovirus. Dentro de esta familia, hay claros ejemplos de especies crípticas y de grupos de especies con escasas diferencias morfológicas entre sí, pero con importantes características fitopatológicas (p. ej. transmisión de virus), lo que lo hace ser un buen ejemplo para integrar estas técnicas de taxonomía integrativa y barcoding.

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en el análisis de 560 secuencias de la región D2-D3 y 253 secuencias parciales del gen *cox1* de nematodos de la familia Longidoridae (*Xiphinema*, *Longidorus* y *Paralongidorus*) y se discuten las potencialidades y debilidades de las técnicas de barcoding en la identificación de este grupo de nematodos.



## **6ª Sesión: Temas generales**

### **Moderadores**

**Carmen Martínez Manjavacas y Milagros Marín Terrazas**

## GUÍA PRÁCTICA DE FOTOGRAFÍAS COMO AYUDA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y PLAGAS DE LA PAPA, Y OTRAS APLICACIONES

Zerolo-Hernández, J.<sup>1</sup>; Hernández Guerra, N.<sup>1</sup>; Siverio de la Rosa, F.<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> Gestión Orgánica de la Información Agrícola (GOIA). <sup>2</sup> Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). <sup>3</sup> Sección de Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias ([fsiverio@icia.es](mailto:fsiverio@icia.es)).

La observación y reconocimiento directo de síntomas y signos ha sido siempre el primer recurso a la hora de llevar a cabo el diagnóstico de un problema fitosanitario en campo o en el laboratorio de Sanidad Vegetal. Para ello se ha recurrido a libros de referencia que recojan imágenes de plagas y enfermedades del cultivo con las que comparar cada caso. La mayor parte de los libros suelen agrupar las imágenes por organismos nocivos y éstos por tipos, con lo que la observación de los síntomas implica el paginado continuo del libro buscando similitudes. Algunos autores modificaron este enfoque agrupando las imágenes por síntomas, con lo que se simplifica el proceso de búsqueda. La elección adecuada de las opciones, en este primer paso del diagnóstico, puede ser determinante a la hora de proponer la aplicación de un tratamiento fitosanitario o de orientar la elección de los protocolos de laboratorio necesarios para la detección, determinación e identificación del patógeno.

La aplicación para ordenadores y móviles que presentamos en este trabajo (<http://www.goia.es/sintoma/index/2>) cuenta con más de 300 fotografías de síntomas y signos de enfermedades y plagas del cultivo de la papa, tal y como se pueden observar “a simple vista”, así como otras de otras fotografías complementarias de observaciones “a la lupa” o de preparaciones “al microscopio”. Las imágenes se pueden seleccionar según su localización (plantación, planta, hoja, tallo externo, tallo interno, cuello, tubérculo externo, tubérculo interno, y raíz; además de imágenes de preparaciones y ejemplares) y/o según el agente causal (fisiopatías, hongos y oomicetos, bacterias, virus, insectos y ácaros) por lo que pueden observarse en una sola pantalla síntomas y signos de enfermedades muy distintas que, sin embargo, pueden presentar parecidos que hacen difícil su distinción. La elección de una imagen nos lleva a la identificación del agente causal, y con él a todas las imágenes asociadas al mismo. Esta aplicación permite también la búsqueda de organismos nocivos por su nombre común o científico y la búsqueda de otros términos asociados.

También se incluyen en la página principal de la aplicación herramientas para realizar el seguimiento del cultivo de la papa en cada parcela georreferenciada y para generar un sistema de seguimiento y alerta participativo de sus enfermedades y plagas.

## RETOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS LABORATORIOS DE SANIDAD VEGETAL

Almacellas, J.; Monné, D.; Del Cueto, A.; Hidalgo, M.; Sobreperre, M.; Paniello, M; Ramos, V. y Hernandez, G.

Laboratorio de Agricultura y Sanidad Vegetal de Cataluña (LASVC). Servicio de Sanidad Vegetal. Generalitat de Cataluña (jalmacellas@gencat.cat).

Los laboratorios de diagnóstico en sanidad vegetal (LSVs) tienen unos objetivos y un entorno de manejo que los hace muy complejos en el diseño de su trabajo y en sus competencias científicas y técnicas. Según diversas fuentes, en el mundo son entre 12.000 y 20.000 los organismos microbianos potenciales susceptibles de ser diagnosticados en estos laboratorios, infectando cerca de 40.000 especies vegetales huéspedes, lo cual supone un espectro muy amplio y complejo de manejo de organismos totales respecto al que se enfrentan muchos laboratorios de diagnóstico que trabajan en otros ámbitos de la salud. A los anteriores se les puede añadir una lista de aproximadamente 25.000 especies de artrópodos. Sobre todos estos organismos se pueden aplicar técnicas de diagnóstico muy diversas, desde las microbiológicas clásicas a las más avanzadas mediante la huella de ADN o ARN.

La EPPO-OEPP establece que de todo el espectro fitopatógeno, existen unas 1.600 especies de interés de regulación y que son objeto de especial atención para los LSVs de las NPPOs<sup>1</sup>. Este número potencial de cuarentenas es también muy elevado para administrarlo en los laboratorios, puesto que no existen protocolos implementados para la determinación de todas ellas y con una elevada fiabilidad.

Las técnicas utilizadas por los LSVs son múltiples y dependen en gran manera de los recursos humanos y materiales asignados a cada laboratorio. Los más completos pueden utilizar técnicas microbiológicas clásicas, inmunológicas y moleculares hasta el barcoding, aunque existen otras técnicas no comunes a todos ellos como por ejemplo la determinación bacteriana-MIS por el espectro de ácidos grasos. Así, las técnicas usadas pueden ser de tipo organismo-objetivo o bien organismo-agnósticas y de ello depende el resultado final. Las primeras se basan en buscar concretamente y solamente el organismo especificado, como en las pruebas ELISA y las de PCR. Las segundas pueden determinar potencialmente casi cualquier organismo en la muestra o un grupo muy amplio, como los aislamientos en cámara húmeda, el MIS, el MALDI-TOF, los chips o *arrays* de ADN, la secuenciación o, si se dispusieran, las técnicas metagenómicas. Respecto a estas últimas, existen estudios recientes que indican una vía de diagnóstico global, desde una perspectiva holística de la sanidad vegetal, que los hace muy interesantes y potencialmente útiles, aunque se precisan de estudios para su correcto desarrollo y aplicabilidad en el ámbito de trabajo de los LSVs.

Se citan algunos ejemplos de los principales problemas recogidos en el LASVC para su discusión.

<sup>1</sup> Organizaciones nacionales de protección vegetal. En nuestro caso también extensible a los servicios de sanidad vegetal y los laboratorios de las comunidades autónomas.

## RECOMENDACIONES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Phytophthora* spp.

Sanz-Ros, A.V.<sup>1</sup>; Landeras, E.<sup>2</sup>; Páez, J.<sup>3</sup>; Santiago, R.<sup>4</sup>; Bascón, J.<sup>5</sup>; Collar, J.<sup>6</sup>; Rodríguez, C.<sup>7</sup>; Benito, P.<sup>8</sup>; Palomo, J.L.<sup>9</sup>

<sup>1</sup>CSF Calabazanos (Palencia) ([asanzros@gmail.com](mailto:asanzros@gmail.com)); <sup>2</sup>LSV Asturias; <sup>3</sup>LAPSV Sevilla. <sup>4</sup>LD Badajoz; <sup>5</sup>LAPSV Huelva. <sup>6</sup>LAFIGA Galicia. <sup>7</sup>LSV Tenerife. <sup>8</sup>LF Gran Canaria. <sup>9</sup>CRD Aldearrubia (Salamanca).

Se indican algunas recomendaciones para la detección e identificación de oomicetos, basada en los métodos usados exitosamente por diferentes laboratorios oficiales de diagnóstico fitopatológico, así como en la bibliografía científica disponible. Dentro de los oomicetos destaca el género *Phytophthora*, donde se incluyen numerosos patógenos vegetales que provocan pérdidas considerables en cultivos hortícolas, forestales y ornamentales. El cultivo directo de tejidos dañados (raíz, tallo, hojas y frutos) en medio semiselectivo (CMA-PARPH o similar), tras lavado con agua e inmersión en etanol 70% durante 30-60 segundos puede ser realizado de forma simultánea a las bateas. Este método (baiting) consiste en colocar diferentes trampas vegetales flotando sobre una capa de agua (3-5 cm) que inunda al suelo (muestra). Tras dejarlo reposar (1-12 horas) se limpia la superficie, se colocan las trampas vegetales y se incuban a 22±2 °C entre 1-7 días. Las zoosporas nadan hacia las trampas y las infectan produciendo necrosis, que después son separadas y cultivadas en medio semiselectivo. Entre 24 h y 7 días los organismos que crecen son aislados en cultivos puros (se pueden usar los medios V8, carrot agar o agar guisante. De ahí se dejan crecer entre 3-10 días a 22-25 °C; se cortan varios cuadrados (1x1 cm) en una placa petri y se inundan con solución de suelo no estéril (SSNE), situándolos bajo luz blanca fría, a las 2 h se cambia la SSNE. Los próximos 4 días, cada 24 horas se cambia la SSNE (2 veces) y agua destilada (2 veces); generalmente durante alguno de estos pasos se observan esporangios característicos de *Phytophthora*. Diferentes aspectos presentan varias opciones, como el tipo de agua, las trampas usadas, los tiempos y temperaturas de incubación, la observación microscópica de las trampas tras el baiting. Otras técnicas alternativas pueden ser realizadas, como los baitings de raicillas, el re-baiting (inundación-secado 7 días-inundación), la doble capa de agar, así como la incubación en frío o el secado del suelo antes del baiting.

La identificación de los aislados se suele llevar a cabo por una combinación de morfología y técnicas moleculares. Cuando se sospecha de una especie en concreto es suficiente hacerlo por PCR convencional o qPCR usando cebadores específicos, en PCR sencilla o anidada. En caso contrario diversas técnicas pueden ser usadas, como la secuenciación de determinados fragmentos del genoma y la posterior comparación de las secuencias con GenBank o *Phytophthora* database. Estas y otras técnicas pueden realizarse mediante extracción de ADN directamente de los tejidos vegetales, evitando hacer baitings y cultivos, aunque en este caso se carece de la confirmación morfológica y no se dispone del organismo en cultivo.

## **IMPULSO DEL DOCUMENTO “CRITERIOS PARA ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS DE SANIDAD VEGETAL SEGÚN LA ISO 17025”**

Torres, E.<sup>1</sup>; Comisión de trabajo del GEDDI “Criterios para la acreditación de los laboratorios que realizan ensayos fitopatológicos”

<sup>1</sup> Dirección General de Calidad Ambiental y Cambio Climático. Generalitat de Catalunya (ester.torres@gencat.cat)

En la II Reunión del Grupo Especializado en Detección, Diagnóstico e Identificación de la SEF (GEDDI-SEF), celebrada en Sevilla los días 10 y 11 de noviembre de 2015 se debatió sobre las particularidades de los ensayos de laboratorios del ámbito de la Sanidad vegetal con referencia a la implantación de los requisitos técnicos recogidos en la norma 17025 y se propuso la creación de una comisión para evaluar qué aspectos, en un laboratorio de fitopatología, pueden requerir una normalización adicional que facilite la implantación de los criterios de acreditación al laboratorio y a ENAC sus tareas de evaluación.

La comisión se creó con un primer objetivo, redactar una Nota Técnica o documento guía sobre los criterios a tener en cuenta por los laboratorios de sanidad vegetal que quieran acreditarse o bien quieran mantener o ampliar la acreditación según la Norma ISO17025. A través del GEDDI se hizo una llamada de colaboración a las personas interesadas en el tema y actualmente el grupo está formado por 15 expertos en distintas técnicas y patógenos.

En esta reunión presentaremos los resultados de un sondeo sobre los controles de calidad internos y externos necesarios para asegurar la calidad de los ensayos, teniendo en cuenta las posibilidades según los distintos métodos a acreditar.

Recientemente se ha aprobado el REGLAMENTO (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios. En el artículo 37 se indica que las autoridades competentes solo podrán designar como laboratorio oficial un laboratorio que, entre otros requisitos, funcione de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025 y esté acreditado de acuerdo con dicha norma por un organismo nacional de acreditación. Aunque se establece la posibilidad de excepciones y permite un periodo de transición hasta 29 de abril de 2022, este reglamento posiblemente acabará obligando a todos los laboratorios de sanidad vegetal que realicen control oficial.

Así pues, ante este escenario en un futuro no tan lejano, la actividad de este grupo para consensuar criterios y trasladar la propuesta a ENAC se perfila como especialmente útil para todos.