



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Xanthomonas fragariae* Y EVALUACIÓN DE SU SEVERIDAD EN GENOTIPOS DE FRESA

NOEMI RIVERA ZABALA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada: **Variabilidad genética de *Xanthomonas fragariae* y evaluación de su severidad en genotipos de fresa.** Realizada por la alumna: **Noemí Rivera Zabala,** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO




Dr. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ

ASESOR



DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR



DR. DOUGLAS RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo de 2016

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Xanthomonas fragariae* Y EVALUACIÓN DE SU SEVERIDAD EN GENOTIPOS DE FRESA

NOEMI RIVERA ZABALA, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2016.

RESUMEN

En México la producción de fresa es una actividad de importancia socioeconómica, se considera el cultivo con mayor índice de empleo por hectárea. Éste cultivo es afectado por diversos patógenos, en base a los daños que ocasionan destacan: *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae*, *Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV), *Beet pseudo yellows virus* (BPYV), Nematodos y *Xanthomonas fragariae* (mancha angular de la fresa). Ésta última es una enfermedad que tiene gran impacto en viveros, por su comportamiento como infección sistémica, lo que favorece su dispersión a largas distancias a través de estolones infectados. La variabilidad genética de bacterias se estudia recientemente mediante la amplificación y secuenciación de genes constitutivos. Los genes *gyrB* y *hrp* se utilizan para este fin por su importancia en funciones estructurales de la bacteria. Actualmente no se cuenta con control eficiente de la bacteria. Debido a que todos los cultivares utilizados comercialmente en el país son susceptibles a la enfermedad, la obtención de variedades resistentes resulta de gran importancia para su manejo. Para tal fin es de importancia medir la intensidad de daño de la enfermedad en diversos genotipos.

Palabras clave: mancha angular de la fresa, *Fragaria ananassa*, *gyrB*, *hrp*, escala diagramática de severidad.

GENETIC VARIABILITY OF *Xanthomonas fragariae* AND EVALUATION OF ITS SEVERITY ON STRAWBERRY GENOTYPES

**NOEMI RIVERA ZABALA, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2016.**

ABSTRACT

In Mexico, the strawberry production is an activity of economic importance, is considered considering the crop with the highest employment per hectare. This crop is affected by various pathogens, based on the damage are: *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, *Phytophthora cactorum*, *Verticillium dahliae*, Strawberry pallidosis associated virus (HVPS), Beet pseudo yellows virus (BPYV), Nematodes and *Xanthomonas fragariae* (angular leaf spot strawberry). The last is a disease that has great impact on nurseries, by their behavior as a systemic infection, which favors their spread over long distances through infected stolons. The genetic variability of bacteria was recently studied by amplification and sequencing of constitutive genes. The *hrp* and *gyrB* genes, are used for this purpose because of its importance in structural functions of the bacteria. Actually it does not have efficient control of the bacteria, because all cultivars used commercially in the country are susceptible to disease, the resistant varieties is of great importance for the management. To this purpose it is important to measure the damage intensity of disease in various genotypes.

Keyword: angular leaf spot of strawberry, *Fragariae ananassa*, *gyrB*, *hrp*, diagramatic severity scale.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir esta experiencia con salud y energía.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico en la realización de mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, programa de Fitosanidad-Fitopatología por fomentar mi desarrollo profesional.

A la empresa Driscoll's Servicios Corporativos S. De R.L. de C. V. México, por el apoyo y las facilidades otorgadas en la toma de muestra y estancia profesional.

Al Dr. Daniel L. Ochoa por apoyarme durante el desarrollo de la maestría, por guiarme y hacer de mí una mejor profesionista. A mis asesores: Dra. Reyna I. Rojas, Dr. Douglas Rodríguez, Dr. Sergio Aranda, gracias por la orientación y apoyo en la realización de esta investigación.

A Martín Zapien por participar en el diseño de la escala diagramática, gracias por las ideas, animarme y por el espíritu de superación.

A Luz Rojas, Guadalupe Callela e Isaías Cárdenas, mil gracias por su amistad y apoyo

Al Dr. Gustavo Mora y Gerardo Acevedo por su disponibilidad en proporcionar las herramientas para el análisis estadístico y elaboración de la escala diagramática.

Al Sr. Ricardo y Sr. Carlos por el apoyo en laboratorio.

A todos los docentes del Colegio de Postgraduados por los conocimientos y experiencias que compartieron conmigo a lo largo de estos dos años.

A mis amigos: Guadalupe V, Edith M, Katya O, Adriana Z, Norma A, Erika Z, Paty V, Edgar C, Santo A. Silvana R. gracias por su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres **Rosemberg Rivera Trujillo** y **Adela Zabala Avendaño**, por apoyarme siempre en mi desarrollo profesional y personal. Gracias por su amor incondicional y por ser mi ejemplo.

A mis hermanos: Arianne, Agustín, Adalberto y Ana Isabel; cuñados Nanci y Avenamar y a mis sobrinos Alondra†, Rosemberg, Esmeralda, Alisson, Itza y Ximena. Son mi motivación.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	x
CAPÍTULO I	1
REVISIÓN DE LITERATURA	1
1. Importancia del cultivo de fresa.....	1
2. Principales enfermedades de la fresa.....	2
3. Bacterias fitopatógenas en fresa.....	5
3.1 Importancia de las bacterias fitopatógenas.....	5
3.2 <i>Xanthomonas fragariae</i>	6
3.2.1 Posición taxonómica.....	6
3.2.2 Ciclo de vida y epidemiología.....	6
3.2.3 Características morfológicas y detección.....	7
3.2.4 Sintomatología.....	8
4. Variabilidad de la interacción planta-patógeno.....	8
4.1 Técnicas para determinar la variabilidad genética en bacterias.....	10
5. Mejoramiento genético.....	11
5.1 Variedades de fresa en México.....	12
5.2 Técnicas de mejoramiento genético.....	13
6. Métodos de inoculación de <i>Xanthomonas fragariae</i>	14
7. Medición de la severidad.....	14
LITERATURA CITADA.....	16
CAPITULO II.....	21
VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>Xanthomonas fragariae</i> Y EVALUACIÓN DE SU SEVERIDAD EN GENOTIPOS DE FRESA.....	21
RESUMEN.....	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUCCIÓN.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Colecta de material vegetal y aislamiento de la bacteria.....	24
Pruebas de patogenicidad.....	25
Extracción de DNA bacteriano.....	25
Análisis filogenético.....	25

Escala diagramática	26
Evaluación de la severidad	27
Análisis estadístico	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Pruebas de patogenicidad	27
Análisis filogenético	30
Escala diagramática	31
Evaluación de severidad	33
Inoculación por inyección	33
Inoculación por aspersión	36
CONCLUSIONES	37
LITERAURA CITADA	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Hojas de fresa infectadas de forma natural por *Xanthomonas fragariae*. Manchas angulares rodeadas por un halo amarillo (A), lesiones necróticas y deformación de hojas (B)..... 28
- Figura 2.** Vista abaxial (A) y adaxial (B) de las hojas con lesiones acuosas observadas en los sitios de inoculación (por inyección)de *Xanthomonas fragariae* a los 15 días después de la inoculación. 29
- Figura 3.** Árbol generado con el método Neighbour-joining. Las distancias evolutivas se obtuvieron por el método de Tamura 3-parameter model empleándose bootstrap con 10,000 repeticiones a partir de secuencias de nucleótidos concatenados con regiones parciales de los genes *hrp* y *gyrB* de 14 aislamientos de *Xanthomonas fragariae*. La barra indica el número de sustituciones por sitio. Únicamente se muestran valores de bootstrap arriba del 80%..... 31
- Figura 4.** Escala diagramática obtenida para evaluar la severidad de *Xanthomonas fragariae* en genotipos de fresa. En cada nivel se indica el rango de área foliar afectada y se integra con una imagen representativa que muestra el porcentaje de tejido dañado calculado con el software..... 32
- Figura 5.** Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en siete materiales de fresa inoculados por inyección con *Xanthomonas fragariae*. 34
- Figura 6.** Síntomas observados en siete variedades de fresa inoculados por inyección con *X. fragariae*. A) Manchas necróticas irregulares rodeadas por un halo amarillo que generalmente cubrían la lámina foliar. B) Mancha necrótica con tejido acuoso en la zona de avance de la lesión. C) Lesiones necróticas que no aumentaron de tamaño. D) Plantas testigo inyectadas con agua sin daño aparente. 36
- Figura 7.** Síntomas inducidos mediante la inoculación de *Xanthomonas fragariae* por aspersión en genotipos de fresa. A) manchas angulares inicialmente acuosas que necrosaban con el tiempo B) lesiones necróticas con halo amarillo en ciertas zonas de avance de la lesión. 36

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Origen de aislamientos e identificación de *Xanthomonas fragariae*, período de incubación y tamaño de lesión registrada en plantas de fresa var. Monterrey. . 29
- Cuadro 2.** Tamaño de lesiones (cm) ocasionadas por *Xanthomonas fragariae* en hojas de siete genotipos de fresa inoculadas por inyección. 35

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Importancia del cultivo de fresa

La fresa es una planta herbácea y perenne de la familia *Rosaceae* y género *Fragariae*. Las principales variedades comerciales son el producto del cruce entre la especie *Fragariae virginiana*, originaria de Norteamérica, con la especie chilena *Fragaria chiloensis*. Estos híbridos se caracterizan por presentar frutos de mayor tamaño que las especies originales (Baraona y Barrantes, 1998). La fresa es una planta cultivada por su fruto o fresa que es en realidad un falso fruto (infrutescencia), botánicamente denominado “eterio”, formado por el engrosamiento del receptáculo floral, en el que están insertos los verdaderos frutos llamados aquenios (Hurtado, 1996).

En México la producción de fresa es una actividad de alta importancia socioeconómica pues se considera el cultivo con mayor índice de empleo por hectárea con un estimado de 725,000 jornales anuales por cada 1000 ha. Los empleos derivados de la producción de fresa mitigan en cierta medida las migraciones al extranjero, mejoran el nivel de vida de la población rural y contribuyen al empleo de personal para la industrialización de la fruta además de generar divisas al país por la exportación de fruta fresca y congelada. Durante los últimos 60 años, México figura entre los 10 principales países productores de este cultivo y entre los primeros tres exportadores de fresa congelada. La productividad y calidad de la fruta nacional no es lo más sobresaliente. En el mercado mundial destaca su participación principalmente por los menores costos de producción. En las últimas décadas, las demandas de los consumidores han variado significativamente, por lo que se estima que

el mercado exigirá solo fruta inocua, producida bajo sistemas orgánicos y con alta calidad nutracéutica (Dávalos *et al.*, 2011).

2. Principales enfermedades de la fresa

La fresa es afectada por diversos microorganismos fitopatógenos que dañan el sistema radical, follaje y fruta. Entre los más importantes se encuentran los siguientes:

Colletotrichum acutatum

Este hongo produce antracnosis en tallo y fruta. Cuando la infección se produce poco después del trasplante, se presenta retraso del crecimiento y amarillamiento. Las lesiones del tallo o daños en la corona pueden preceder al colapso de las plantas afectadas. En el tallo, aparecen como puntos oscuros, marrones o negros hundidos. En condiciones cálidas y húmedas, se pueden formar masas de esporas en estas lesiones. La fruta puede ser infectada en cualquier etapa de desarrollo pero el daño es más frecuente en la maduración en donde bajo condiciones de humedad se producen masas de esporas color naranja (Koike *et al.*, 2014). Otras especies de *Colletotrichum* involucradas en la antracnosis de la fresa son: *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* pero es menos frecuente encontrarlas (Peres, 2015)

Botrytis cinerea

Las infecciones por este hongo ocasionan pudrición de las flores. En esta condición, las esporas permanecen en estado latente que germinan al final de la temporada en cualquier momento antes o después de la cosecha cuando el contenido de azúcares aumenta y las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad son adecuadas. Inicialmente se observan lesiones pequeñas de color marrón, a menudo bajo el cáliz, en las cuales se forma micelio que al poco tiempo comienza a esporular (Koike *et al.*, 2014).

Fusarium oxysporum f. sp. fragariae

Los síntomas inducidos por este hongo son marchitamiento, disminución del crecimiento, secado y muerte de las hojas maduras, mientras que las jóvenes frecuentemente quedan verdes. Los síntomas generalmente aparecen poco después del establecimiento de las plantas. Cuando la infección ocurre en plantas con gran cantidad de fruta o sometidas a estrés las plantas pueden colapsar y morir. Cuando se examinan las coronas de plantas, tejidos vasculares y corticales, éstas son de color oscuro a naranja-marrón mientras que los tejidos internos de las raíces principales por lo general no se ven alterados. Las clamidosporas formadas por este hongo, son estructuras de resistencia que persisten mucho tiempo en el suelo (Koike *et al.*, 2014).

Phytophthora cactorum

Este oomyceto causa pudrición de plantas y frutos; la enfermedad es favorecida por temperaturas cálidas y períodos prolongados de humedad, condiciones muy comunes durante el establecimiento de la planta (Peres, 2015). Todas las etapas de desarrollo del fruto son susceptibles a la pudrición siendo los síntomas típicos lesiones irregulares de color café a morado. En infecciones severas el fruto se pudre totalmente y se observa de color café. Las zoosporas y clamidosporas de este fitopatógeno pueden persistir en el suelo y restos vegetales (Koike *et al.*, 2005).

Verticillium dahliae

Las plantas infectadas presentar disminución del crecimiento. Las hojas exteriores muestran una coloración café en los márgenes y entre las venas, seguido eventualmente por el colapso. Las hojas interiores se mantienen verdes pero se atrofian y muestran rayas o manchas de color café oscuro. Este último síntoma permite distinguir a esta enfermedad de la pudrición de la corona causada por *Phytophthora cactorum*. *V. dahliae* no es específico

de fresa e infecta muchas especies de malezas y cultivos en todo el mundo, siendo especialmente severo en zonas semiáridas con sistema de riego y aplicaciones frecuentes de nitrógeno (Koike *et al.*, 2005).

Virus

Más de 30 virus y fitoplasmas se reportan en el género *Fragaria*. Con frecuencia más de uno se puede presentar y en conjunto pueden causar severas reducciones de la producción y la calidad de la fruta (Spiegel y Martin, 1998). Las enfermedades ocasionadas por virus suelen confundirse frecuentemente con deficiencias nutricionales y otras alteraciones abióticas por lo que son difíciles de diagnosticar y confirmar en campo. Sin embargo, es común observar que las hojas de las plantas infectadas toman un color púrpura a rojo y reducen su crecimiento si son afectadas en etapas tempranas de desarrollo lo cual disminuye la producción de frutas. Los brotes de plantas con síntomas se asocian generalmente con la presencia de mosca blanca y áfidos aunque también pueden ocurrir en ausencia de éstos debido a la infección de las plantas en vivero (Koike *et al.*, 2014). Algunas especies son: *Strawberry crinkle virus*, *Strawberry latent C virus*, *Strawberry mild yellow-edge virus*, *Strawberry mottle virus*, *Strawberry vein banding virus*, *Arabidopsis mosaic virus*, *Strawberry latent ringspot virus*, *Tomato ringspot virus*, *Strawberry pallidosis associated virus*, *Beet pseudo yellows virus* entre otras (Gubler y Converse, 2015).

Nematodos

Las dos especies asociadas más comúnmente con daños al cultivo de fresa son el nematodo foliar, *Aphelenchoides fragariae*, y el nematodo del nódulo de la raíz, *Meloidogyne hapla*. El primero se encuentra en el suelo o como endoparásito sedentario en las raíces, mientras que el segundo es un parásito de las partes aéreas de la planta y puede ser endo- o ectoparásito, ambos pueden ocasionar estrés en las plantas y reducir el rendimiento

(Koike *et al.*, 2005). Otras especies de importancia son: *Ditylenchus dipsaci*, *Xiphinema americanum*, *Pratylenchus penetrans* y *P. pratensis* (Gubler y Converse, 2015).

3. Bacterias fitopatógenas en fresa

3.1 Importancia de las bacterias fitopatógenas

Las bacterias son organismos procariontes, unicelulares, provistos de una envoltura o pared celular y una membrana interna que contiene al citoplasma. Poseen un cromosoma constituido de DNA; su tamaño es generalmente de 0.3-1.5 a 0.7-5 μm , pueden tener forma de cocos, bacilos o espirilos y se reproducen por fisión binaria. Su pared celular es delgada y frágil lo que ocasiona desecación por radiación solar y altas temperaturas cuando se encuentran fuera del hospedante. Las bacterias fitopatógenas no forman esporas ni estructuras de resistencia, su dispersión a grandes distancias es limitada y ocurre comúnmente por el aire, salpique, por vectores y por movimiento de material vegetal enfermo. Algunas bacterias, particularmente las que infectan los haces vasculares, se pueden transmitir a través de semilla. Estos microorganismos no atraviesan la cutícula vegetal, por lo que penetran a través de aberturas naturales como estomas, lenticelas, hidátodos o nectarios o por pequeñas heridas causadas por insectos, granizo o la arena arrastrada por el viento (Vidaver y Lambrecht, 2004; Janse, 2005; Agrios, 2008).

Debido a su alta multiplicación y movilidad infectan rápidamente y a menudo son difíciles de controlar (Agrios, 2008). Las bacterias fitopatógenas pueden infectar xilema, floema o parénquima (Janse, 2005) y cuando las condiciones nutricionales y ambientales son favorables, sobre todo de temperatura, duplican su número cada 20 ó 30 minutos (Agrios, 2008).

3.2 *Xanthomonas fragariae*

En el cultivo de fresa, una de las enfermedades bacterianas más importantes económicamente es la mancha angular.

3.2.1 Posición taxonómica

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Género: *Xanthomonas*

Especie: *Xanthomonas fragariae* (Kennedy & King, 1962) (CABI, 2015)

3.2.2 Ciclo de vida y epidemiología

Durante el desarrollo del cultivo se pueden presentar varios ciclos de infecciones secundarias. Cuando las condiciones ambientales favorecen la exudación y propagación de *X. fragariae* se producen infecciones sistémicas, las cuales pueden presentarse incluso en vivero. Por esta razón, la bacteria se puede transmitir a grandes distancias a través de estolones infectados (CABI, 2015). Esta bacteria no puede vivir libremente en el suelo. Sin embargo, puede invernar en materia vegetal infectada (Koike *et al.*, 2005), en donde puede sobrevivir hasta por un año. Poco se sabe acerca de la epidemiología de la bacteria. Sin embargo, el desarrollo de la enfermedad se ve favorecida por días frescos de 20°C y noches frías de 2-4°C (Peres, 2015). Tejido joven y hojas de plantas sanas y vigorosas tienen más probabilidades de infectarse que las plantas enfermas estresadas por el ambiente (Maas, 1998).

3.2.3 Características morfológicas y detección

Xanthomonas fragariae es una bacteria aeróbica, Gram negativa, no forma esporas, no es encapsulante, tiene forma de varilla con un tamaño promedio de 0.4x1.3µm; la mayoría de las células no son móviles y algunas tienen un flagelo polar. En extracto de carne (peptona)-agar sin hidratos de carbono, las colonias son circulares, convexas, brillantes, translúcidas a amarillo pálido. El cultivo puro es distinguible de otras especies del género *Xanthomonas* en al menos siete características: no hay crecimiento a 33°C; no hidrolizan esculina; no producen ácido a partir de arabinosa, galactosa, trehalosa y celobiosa; poseen tolerancia al NaCl en concentraciones de 0.5-1.0 % (CABI, 2015).

La presencia de la bacteria en las plantas infectadas se puede confirmar por aislamiento directo o por inmuno-fluorescencia indirecta (IFAS) a partir de suspensiones obtenidas por maceración de tejido infectado. La detección en plantas asintomáticas mediante examen histológico en plantas individuales es útil pero no práctica para utilizarla en grandes lotes de plántulas. La técnica de ELISA es otro método que se utiliza con éxito en la detección (CABI/EPPO, 1998).

Recientemente se usa con mayor frecuencia la técnica de PCR que es más sensible que ELISA. Roberts *et al.* (1996) diseñaron los primers XF9/XF11, que amplifican un fragmento del gen de hipersensibilidad (*hrp*) con los cuales se puede detectar a la bacteria a partir de tejido infectado con síntomas y asintomático. Adicionalmente se desarrolló una técnica de PCR anidada con la cual se incrementa la sensibilidad para su detección en plantas asintomáticas (Mahuku y Goodwin, 1997). Asimismo, la técnica de PCR en tiempo real es utilizada para detectar a la bacteria en materiales con infecciones latentes y es capaz de detectar 300 UFC en 100 mg de tejido foliar de fresa (Weller *et al.*, 2007, Vandroemme *et al.*, 2008).

3.2.4 Sintomatología

La infección aparece inicialmente como manchas húmedas en el envés de las hojas. Las lesiones se agrandan hasta formar manchas angulares translúcidas limitadas por venas pequeñas de las cuales a menudo escurren exudados bacterianos que aparecen como una película blanquizca y escamosa después de secarse. Al desarrollarse la enfermedad, las lesiones coalescen en la parte superior de las hojas y aparecen manchas de color café-rojizo que posteriormente se necrosan (Koike *et al.*, 2005; Peres, 2015). Un círculo clorótico usualmente rodea el área infectada. La mancha foliar angular generalmente tiene poco efecto en el rendimiento de la fruta. Sin embargo, es una preocupación en los viveros de fresa pues pueden ser sujetos de cuarentena si multiplican material propagativo para exportación (Koike *et al.*, 2005).

4. Variabilidad de la interacción planta-patógeno

Las plantas son resistentes a ciertos patógenos debido a que pertenecen a grupos taxonómicos que son “inmunes” a ellos (resistencia de plantas no hospedantes). Esta defensa la proporcionan principalmente genes de resistencia además de otros factores aún desconocidos. Por otro lado, dentro de una especie vegetal que sea susceptible a un patógeno particular, existe una considerable variación tanto en la susceptibilidad de sus diferentes cultivares como en la virulencia de las distintas razas del patógeno. La enorme variación que es observada en la susceptibilidad de los cultivares ante los diferentes patógenos se debe al número de genes existentes en cada genotipo (Riveros, 2010). La resistencia inducida es una forma de defensa activa que involucra la expresión diferencial

de genes y cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de un proceso de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno (Madriz, 2002).

Una pequeña proporción de las interacciones planta-patógeno producen enfermedades y esto ocurre principalmente porque: a) el cultivar atacado por el patógeno no presenta los requerimientos que éste necesita para su establecimiento y desarrollo (resistencia a nivel de la especie); b) existen barreras pre-existentes (estructurales, químicas o bioquímicas no específicas para cada patógeno) que impiden su entrada (resistencia no-hospedante); c) los mecanismos de defensa de la planta son activados tras el reconocimiento del patógeno y d) se dan condiciones ambientales adversas para el patógeno. En todos estos casos se dice que la interacción es incompatible y, por tanto, hay resistencia. Por el contrario, cuando la enfermedad se desarrolla, se habla de un tipo de interacción compatible, la cual ocurre solo cuando: a) las defensas pre-existentes de la planta no son suficientes o no están presentes; b) las condiciones ambientales son favorables para el patógeno y c) las respuestas de defensa de la planta no son efectivas (Riveros, 2010).

Los genotipos avirulentos del patógeno producen factores que la planta puede reconocer, mientras que los virulentos no, y por lo tanto, no inducen la respuesta de defensa en ella. Este patrón en que la virulencia es el proceso activo del patógeno se ha comprobado en varias instancias. Una posible excepción es el caso de los hongos productores de toxinas específicas del hospedante, en los cuales la virulencia está determinada por la producción misma de la toxina. La subpoblación del patógeno con los mismos genes de avirulencia, y con capacidad para causar enfermedad en los mismos genotipos del hospedante se denominan patotipos o razas fisiológicas (Arauz, 1998).

4.1 Técnicas para determinar la variabilidad genética en bacterias

La variabilidad genética de bacterias se estudia mediante rep-PCR (secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas-PCR), Box-PCR (amplificación de secuencias distribuidas aleatoriamente a través del genoma) (Barionovi y Scortichini, 2006), ERIC (secuencias consenso intergénicas repetidas en las enterobacterias), REP con juegos de iniciadores y AFLP (amplificación de fragmentos polimórficos largos). En la mayoría de estas técnicas se usa gran parte del genoma de la bacteria para su análisis (Stöger *et al.*, 2008). Por otro lado, la metodología de reasociación DNA-DNA se utiliza con frecuencia para hacer estudios de filogenia entre especies estrechamente relacionadas, sin embargo, tiene la desventaja de no distinguir entre miembros de familias alejadas, además de su elevado costo (Cohan, 2002). Más recientemente se utiliza la amplificación y secuenciación de fragmentos de genes constitutivos (housekeeping) que posteriormente pueden concatenarse para realizar un análisis multilocus (MLSA), con el cual es posible reclasificar especies (Young *et al.*, 2008).

El gen *gyrB* codifica la subunidad B de la DNA girasa y se utiliza como un marcador molecular debido al gran número de sustituciones de bases que posee. Este gen es esencial en todo microorganismo y es suficientemente grande para utilizarse en estudios de comunidades microbianas (Watanabe *et al.*, 1999). Por otro lado el gen *hrp* controla la capacidad de las bacterias fitopatógenas para causar enfermedad y para provocar reacciones de hipersensibilidad en las plantas resistentes. Los estudios genéticos y bioquímicos muestran que las proteínas Hrp son componentes de los sistemas de secreción tipo III, proteínas reguladoras, inductoras de la reacción de hipersensibilidad y constituyentes de las enzimas necesarias para la síntesis de glucano periplásmico. La activación transcripcional

de los genes de avirulencia (*avr*) es controlada por proteínas reguladoras del gen *hrp* y recientemente la evidencia experimental sugiere que dichas proteínas son transportadas por el sistema de secreción. Por lo anterior, los genes *hrp* constituyen uno de los grupos más importantes que se encuentran en bacterias fitopatógenas que están estrechamente relacionados con la patogenicidad y la gama de hospedantes (Lindgren, 1997).

5. Mejoramiento genético

La resistencia de las plantas a enfermedades depende a menudo de su capacidad para reconocer al patógeno y activar rápidamente sus mecanismos de defensa (Riveros, 2010). Esta interacción se explica por medio de la hipótesis gen-a-gen propuesta por Flor (1942), la cual establece que la expresión de la resistencia de la planta se debe al reconocimiento específico de una proteína codificada por un gen de resistencia dominante (R) en la planta (ubicada en la membrana celular) denominada receptor, que reconoce el producto de un gen específico de avirulencia dominante (Avr) sintetizado por el patógeno.

La variación en la susceptibilidad que se observa en los diversos cultivares ante distintos microorganismos fitopatógenos se debe a diferentes tipos y número de genes de resistencia que existen en cada uno de ellos. Evidentemente, un cultivar que sea muy susceptible a un aislamiento de cierto patógeno carece de los genes apropiados que le proporcionen resistencia a éste (Agrios, 2008).

Diferentes genotipos del patógeno pueden producir diferentes niveles de enfermedad en las variedades con resistencia horizontal. La severidad relativa de la enfermedad causada por un determinado genotipo del patógeno es una medida de su patogenicidad horizontal o agresividad (Arauz, 1998).

El proceso de mejoramiento genético para la resistencia, involucra la identificación de fuentes de resistencia, su introducción en variedades con buenas características agronómicas y la selección y estabilización de plantas que combinen la resistencia con las características deseadas (Arauz, 1998).

La mancha angular de la fresa es una enfermedad que tiene gran impacto en los viveros productores de material propagativo ya que actualmente no hay ingredientes activos químicos disponibles que ofrezcan un control eficiente de la bacteria. Debido a que todos los cultivares utilizados comercialmente en el país son susceptibles a la enfermedad, la obtención de variedades resistentes resulta de gran importancia para su manejo (Bestfleisch *et al.*, 2015).

5.1 Variedades de fresa en México

Los insumos principales que inciden en la productividad y calidad del cultivo de fresa en México son altamente dependientes del exterior; los cuales, por un lado, favorecen parcialmente los modestos aumentos de la productividad, pero por el otro, son los responsables directos de los incrementos en los costos de producción, principalmente por el pago de regalías por patentes y marcas extranjeras (Dávalos *et al.*, 2011). Los productores dependen principalmente de importaciones de plantas madres provenientes de la Universidad de Davis en California y la Universidad de la Florida en los Estados Unidos. Las principales variedades utilizadas de fresa en México son Camarosa, Festival, Sweet Charlie, Galexia, Camino real, Albion, Aromas, Ventana y Diamante El costo de la planta madre comercializada, incluyendo las regalías muestra un crecimiento del 300% desde el 2002. Aunado a lo anterior el productor se enfrenta con el problema de variedades

desarrolladas para otras condiciones agroclimáticas, se requiere de variedades con mayor adaptación al subtropical, resistente a plagas y enfermedades, con buena calidad de fruto, altamente productivas y precoces para aprovechar al máximo la ventana de oportunidad en el mercado (Sánchez, 2008). En los últimos años el Colegio de Postgraduados desarrolla un programa de mejoramiento genético con la Fundación Produce Michoacán, en donde se evalúa material genético y compara con las variedades importadas de Estados Unidos

5.2 Técnicas de mejoramiento genético

La reproducción asexual de la fresa es el método rutinario que se utiliza para la propagación comercial de esta especie, debido a que se conservan las características genéticas y de calidad de las variedades mejoradas. La clonación permite obtener plantas genéticamente iguales a la planta madre lo que favorece la uniformidad del cultivo. No obstante, una de las principales desventajas de estos métodos de propagación es la diseminación de microorganismos fitopatógenos si no se aplican las medidas adecuadas (Dávalos *et al.*, 2011).

Los métodos que comúnmente se utilizan para la obtención de plantas resistentes a enfermedades son cultivo de tejidos de individuos resistentes, aislamiento de mutantes resistentes a partir de cultivos de células vegetales, producción de diploides resistentes a partir de plantas haploides, fusión de protoplastos, selección masiva de semillas, del pedigrí o de líneas puras, recurrente o retro-cruza (Agrios, 2008; Arauz, 1998).

Otras técnicas comprenden el uso de híbridos o mutantes obtenidos natural o artificialmente con luz UV o rayos X que muestren una mayor resistencia o variación del número cromosómico, producción de euploides (4n, 6n) o aneuploides ($2n \pm 1$ ó 2 cromosomas). Por otro lado, mediante ingeniería genética es posible la detección, aislamiento, modificación, transferencia y expresión de genes de resistencia a patógenos de forma individual (o grupos de genes relacionados) de un organismo a otro (Agrios, 2008); no obstante, la transgénesis cuenta con numerosos detractores que limitan su uso a escala comercial.

6. Métodos de inoculación de *Xanthomonas fragariae*

Maas *et al.* (2000), utilizaron la técnica de inoculación por inyección que consiste en infiltrar una suspensión bacteriana de concentración conocida con el auxilio de una jeringa en cuatro puntos por foliolo de dos hojas jóvenes de fresa, con la cual observaron lesiones en poco tiempo. Por otro lado, Hildebrand *et al.* (2005) inocularon la superficie abaxial de hojas de fresa con un dispositivo de pulverización que ocasiona heridas por las cuales penetran las bacterias al interior de la hoja. Con este método de inoculación, las lesiones se distribuyen de manera uniforme y su número aumenta dependiendo de la distancia del dispositivo a la hoja y la duración de la pulverización.

7. Medición de la severidad

La medición de la intensidad de una enfermedad (incidencia o severidad), es un requisito indispensable en estudios epidemiológicos básicos, como la caracterización cuantitativa de epidemias, desarrollo de modelos de pronóstico, comparación de diversas prácticas de manejo de enfermedades, así como para determinar la importancia económica de las mismas por medio de modelos de estimación de pérdidas (Campbell y Madden, 1990). La medición de una enfermedad con base en severidad es un problema complejo ya que pueden cometerse errores graves de precisión, exactitud y reproducibilidad, además de ser menos eficiente que la medición considerando incidencia. La información que normalmente proporciona una medición de severidad puede tener un alto costo que debe minimizarse (Mora *et al.*, 2000). Las escalas logarítmicas diagramáticas de severidad generadas con base en el principio general de Weber-Fechner tienen la ventaja de ser prácticas y de fácil uso. Aunque no hay consenso de que un sistema logarítmico de medición supere aquellos basados en intervalos no logarítmicos (lineales o arbitrarios), existen evidencias experimentales de que en forma natural las evaluaciones visuales son de tipo logarítmico (Large, 1966; Sherwood *et al.*, 1983).

La elaboración de escalas diagramáticas debe considerar aspectos importantes como el límite superior de las escalas que corresponde con el máximo real de la enfermedad observada y su representación en la escala siguiendo la ley de Weber-Fechner. De acuerdo

con esta ley, la agudeza visual humana es proporcional al logaritmo de la intensidad del estímulo. Además, con el fin de verificar la calidad de la estimación obtenida de la escala diagramática, los niveles de exactitud, precisión y reproducibilidad deben ser validados (Campbell y Madden, 1990).

LITERATURA CITADA

- Agrios G. N. 2008. Fitopatología. Ed. Limusa. 922 p.
- Arauz, C. L. F. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 471 p.
- Baraona C. M. y E. Barrantes S. 1998. Fruticultura especial Fascículo 6: Manzana, melocotón, fresa y mora. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 145 p.
- Barionovi D and M. Scortichini. 2006. Assessment of integrin gene cassette arrays in strains of *Xanthomonas fragariae* and *X. arboricola* pvs. *fragariae* and Pruni. *Journal of Plant Pathology*, 88:279-284.

- Bestfleisch, M., K. Richter, A. Wensing N, Wünsche J, V. Hanke M, M. Höfer, E. Schulte, and H. Flachowsky. 2015. Resistance and systemic dispersal of *Xanthomonas fragariae* in strawberry germplasm (*Fragaria* L.). *Plant Pathology* 64:71-80.
- CABI. 2015. *Xanthomonas fragariae* (angular leaf spot). *Crop Protection Compendium* CAB International. Wallingford, UK.
- CABI/EPPO: 1998. *Xanthomonas fragariae*. – Distribution maps of Quarantine Pests for Europe No. 284. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.
- Campbell, C. L. and L. V. Madden. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley & Sons. New York. 532 p.
- Cohan, F. M. 2002. What are bacterial species?. *Annual Review of Microbiology* 56:457-487.
- Dávalos G. P. A, R. Aguilar G, A. E. Jofre G, A. R. Hernández R. y M. N. Vázquez S. 2011. Tecnología para sembrar viveros de fresa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 153p.
- Flor H. H. 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-669. Citado por: Riveros A. A. S. 2010. Inducción de Resistencia en plantas. Interacción: planta-patógeno. Universidad de Tolima Ibagué, Tolima, Colombia. 238 p.
- Gubler, W. D. and R. H. Converse. 2015. Diseases of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). The American Phytopatological Society. <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Strawberry.aspx>
- Hildebrand, P.D., G. Braun P, E. Renderos W, R. Jamieson R, B. McRae, K. and R. Binns, M. 2005. A quantitative method for inoculating strawberry leaves with

- Xanthomonas fragariae*, factors affecting infection, and cultivar reactions. Canadian Journal of Plant Pathology. 27:16-24.
- Hurtado M. 1996. Productor de fresas. Revista Fox-Expor. P11.
- Janse, J. D. 2005. Phyto bacteriology principles and practice. CABI Publishing is a división of CAB International. 360 p.
- Kennedy, B. W. and T.H. King. 1962. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. Phytopathology 52:873-875.
- Koike, S. T., G. T. Browne, T. R. Gordon. And W. D. Guber. 2014. UC IPM Pest Management Guidelines. Strawberry. Agriculture and Natural Resources, University of California. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/selectnewpest.strawberry.html>
- Koike, S. T., W. D. Gubler, G. T. Browne. 2005. Strawberry. University of California. UC IPM Pest Management Guidelines. http://www.oregon-strawberries.org/fmr/fact_sheets/Guia_Fresas_Espanol.pdf
- Large, E. C. 1966. Measuring Plant Disease. Annual Review of Phytopathology 4: 9-28.
- Lindgren, B. P. 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. Annual Review of Phytopathology 35:129-152.
- Sánchez R. G. 2008. Sistema de inteligencia de mercados. El cluster agroindustrial de Zamora. La red de valor fresa. Fundación Produce Michoacán. 145 p.
- Spiegel S. and R. R. Martin. 1998. Virus and viruslike disease. In: Maas, J. L. 1998. Compendium of strawberry disease. The American Phytopathological Society. USA. 96 p.
- Maas, J. L., Gouin B. C., Hartung J. S. and Hokanson S. C. 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. Hort Science 35:128-131.

- Madriz O. K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 63:22-32.
- Mahuku, S. G. and P. H. Goodwin. 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR). Canadian Journal of Plant Pathology 19:366-370.
- Mora-Aguilera, G.; Rivas-Valencia, P.; Gongora-Canul, C.; Tovar-Soto, A.; Cristóbal-Alejo, J.; Loeza-Kuk, E.; S Michereff, A Marinelli, Osada-Velázquez, K. 2000. Sistemas computarizados en la epidemiología: 1. 2-LOG ver 1.0 y su aplicación en el diseño de escalas diagramáticas logarítmicas. XXIX Simp. Nal. De Parasit. Agric. 15-17 oct. Pto. Vall., Mex.
- Peres, N. A. 2015. 2015 Florida plant disease management guide: strawberry. IFAS Extension University of Florida. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PG/PG05600.pdf>
- Riveros A. A. S. 2010. Inducción de Resistencia en plantas. Interacción: planta-patógeno. Universidad de Tolima Ibagué, Tolima, Colombia. 238 p.
- Roberts, P. D., B. Jones J, K. Chandler C, E. Stall R. and D. Berger R. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. Plant Disease 80:1283-1288.
- Sherwood, R T., Berg C. C, Hoover M. R. and Zeider K. E. 1983. Illusions in visual assessment of *Stagonospora* leaf spot of orchardgrass. Phytopathology 73: 173-177.
- Stöger, A., D. Barionovi, A. Calzolari, R. Gozzi, W. Ruppitsch. and M. Scortichini. 2008. Genetic variability of *Xanthomonas fragariae* strains obtained from field outbreaks and culture collections as revealed by repetitive-sequence PCR and AFLP. Journal of Plant Pathology 90:469-473.

- Vandroemme, J., S. Baeyen, J. Van Vaerenbergh, P. De Vos. and M. Maes. 2008. Sensitive real time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology* 57:438-444.
- Vidaver, A. K. and P. A. Lambrecht. 2004. Bacteria as plant pathogens. *The Plant health Instructor*: DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0809-01
- Watanabe, K., M. Teramoto. And S. Harayama. 1999. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2813-2819.
- Weller, S. A., N. J. Beresford J, J. Hall, R. Thwaites, N. Parkinson. And J. G. Elphinstone. 2007. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 70:376-383.
- Young, J. M., C Park D, M. Shearman H. and E. Fargier. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31:366-377.

CAPITULO II
**VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Xanthomonas fragariae* Y EVALUACIÓN DE SU
SEVERIDAD EN GENOTIPOS DE FRESA**

Noemí Rivera Zabala

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

Se realizó un análisis filogenético con secuencias parciales de los genes *hrp* y *gyrB* de 14 aislamientos de *Xanthomonas fragariae*, causante de la mancha angular de la hoja en fresa colectados en diversas localidades productoras de los estados de Michoacán, Jalisco y Puebla. El árbol filogenético mostró similitud entre los aislamientos analizados. Con el

propósito de contar con genotipos de fresa que puedan ser utilizados en programas de mejoramiento genético buscando resistencia a la bacteria, se inocularon por inyección y aspersión dos variedades comerciales y cinco genotipos y se evaluó la severidad de los síntomas mediante una escala diagramática diseñada para esto. Los genotipos de fresa FragLa y FragMa tuvieron los menores valores de severidad.

Palabras clave: mancha angular de la fresa, *Fragaria ananassa*, escala diagramática de severidad.

ABSTRACT

A phylogenetic analysis with partial sequences of the *hrp* and *gyrB* genes of 14 isolates of *Xanthomonas fragariae*, causing angular leaf spot on strawberry collected in different production areas of the Michoacan, Jalisco and Puebla states. The phylogenetic tree showed similarity between the isolates analyzed. With the purpose to have genotypes of strawberry that can be used in breeding programs seeking resistance bacteria, they were inoculated by injection and spray in two commercial varieties and five genotypes, the severity of symptoms was assessed using a diagrammatic scale designed for this. FragLa and FragMa strawberry genotypes had the lowest severity values.

Keywords: angular leaf spot of strawberry, *Fragaria ananassa*, diagrammatic severity scale.

INTRODUCCIÓN

La mancha angular de la hoja ocasionada por *Xanthomonas fragariae* (Kennedy & King, 1962) es una enfermedad de importancia económica en el cultivo de la fresa debido a que reduce considerablemente el rendimiento; particularmente cuando infecta el cáliz (Wyenandt y Nitzsche, 2013) ocasionando su decoloración y pérdidas de rendimiento (Roberts *et al.*, 1997). La enfermedad es sistémica y está sujeta a cuarentena en diversos países debido a que muchas plantas infectadas pueden permanecer asintomáticas, lo cual favorece el movimiento de material vegetativo infectado a grandes distancias (CABI/EPPO, 1998; Koike *et al.*, 2005). En México, el cultivo de fresa es importante socioeconómicamente. Los principales estados productores en cuanto a superficie sembrada son Michoacán, Baja California, Guanajuato y Jalisco (SIAP, 2014). En 2014, la mancha angular se reportó por primera vez en el estado de Michoacán (Fernández-Pavía *et al.*,

2014) y a la fecha no se han realizado estudios de variabilidad genética de la bacteria o de su epidemiología para generar información que permita establecer estrategias de manejo sustentable de la enfermedad. El análisis filogenético de los genes *hrp* y *gyrB* se utiliza para conocer la variabilidad genética en especies del género *Xanthomonas* (Yin *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010). El conocimiento de esta variabilidad constituye un elemento básico para determinar el impacto económico que pueden ocasionar diferentes aislamientos en condiciones específicas del país; o bien, para delimitar zonas donde se detecten aislamientos con mayor severidad y evitar el cultivo de fresa en estas regiones, así como para establecer medidas de manejo o de movilización de material propagativo más estrictas. Por otro lado, si bien todas las variedades cultivadas de fresa son susceptibles a la infección de *X. fragariae*, la búsqueda de materiales que sean menos afectadas es importante para iniciar programas de mejoramiento genético y enfocar el manejo de la enfermedad mediante el uso de variedades menos susceptibles en zonas con elevada fuente de inóculo. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue conocer la variabilidad genética de 14 aislamientos de *X. fragariae* y evaluar su severidad en dos variedades comerciales y cinco genotipos de fresa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal y aislamiento de la bacteria

Se colectó tejido foliar de fresa en huertas comerciales de los estados de Michoacán (Tupátaro, Tangancícuaro, Jacona y Santiago de Tangamandapio); Jalisco (Ciudad Guzmán, Tapalpa) y Puebla (San Salvador del Seco) con síntomas característicos de la mancha angular consistente en lesiones acuosas delimitadas por las venas. De estas lesiones

se tomó fluido bacteriano a partir de tejido enfermo y tejido sano adyacente y se sembró en cajas Petri con medio de cultivo Wilbrink (Koike, 1965, citado por Vandroemme *et al.*, 2008). Las cajas se incubaron a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta observar crecimiento bacteriano a partir del cual se hicieron reaislamientos en el mismo medio hasta obtener colonias puras pequeñas de color blanco sedoso, brillantes, mucoides y apariencia viscosa. Los aislamientos puros aislados se preservaron en caldo nutritivo con glicerol al 40% a -20°C .

Pruebas de patogenicidad

Los aislamientos de *X. fragariae* se inocularon individualmente en dos plantas de fresa var. Monterrey de 4 semanas de edad establecidas en macetas con suelo estéril siguiendo la metodología propuesta por Maas *et al.* (2000). Las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara de crecimiento a temperatura de $25-27^{\circ}\text{C}$ con humedad relativa de 50 a 65% y fotoperíodo de 16 h/luz. Se realizaron observaciones cada 24 h para registrar el período de incubación y a los 15 días después de la inoculación se midió el tamaño de la lesión en las hojas inoculadas.

Extracción de DNA bacteriano

Se realizó a partir de colonias puras reaisladas de las plantas inoculadas con 72 h de crecimiento en medio de cultivo Wilbrink, siguiendo el protocolo descrito por Minas *et al.* (2011). El DNA obtenido se re-suspendió en agua destilada estéril y se conservó a -20°C .

Análisis filogenético

A partir del DNA obtenido se amplificaron mediante PCR segmentos de los genes *hrp* y *gyrB*. Para ello se utilizaron los iniciadores y las condiciones de PCR empleadas por

Roberts *et al.* (1996) y Young *et al.* (2008), que amplifican fragmentos de 537 pb y 865 pb, respectivamente. Los amplicones obtenidos se purificaron y enviaron a secuenciar a la Cia. Macrogen Inc. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, generándose las secuencias consenso. Posteriormente fueron alineadas con el software CLUSTALW incluido en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6) (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias se editaron obteniéndose 414 y 529 pb para los genes *hrp* y *gyrB* respectivamente, y se concatenaron para tener un segmento con una longitud de 943 pb. Se construyó un árbol filogenético con el programa MEGA 6 por el método Neighbour-joining. Las distancias evolutivas se obtuvieron por el método de Tamura 3-parameter model empleándose bootstrap con 10,000 repeticiones. Las secuencias editadas fueron depositadas en la base de datos del GenBank®

Escala diagramática

Se colectaron 200 hojas trifoliadas de fresa con diferentes niveles de daño por mancha angular las cuales se escanearon a una resolución de 200 dpi en una multifuncional HP Officejet Pro 276dW®, USA. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software Assess 2.0 (The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA) para determinar el porcentaje de área foliar dañada. La escala fue desarrollada de acuerdo a la ley de agudeza visual de Weber-Fechner teniendo en cuenta los límites inferior y superior de severidad de la enfermedad detectada en campo. A partir del porcentaje de daño más alto, se establecieron seis niveles de severidad determinados con el programa 2LOG v.1.0, considerando el punto medio de cada nivel para ubicar imágenes representativas (Mora-Aguilera *et al.*, 2000).

Evaluación de la severidad

Se seleccionó la cepa bacteriana 12XfMxJal que mostró menor período de incubación en la prueba de patogenicidad para evaluar la susceptibilidad de las variedades comerciales de fresa Fortuna y Festival así como en los genotipos Frag53, Frag40, FragLa, FragMa y FragSp. Se preparó una suspensión bacteriana (3×10^8 UFC.mL⁻¹ agua estéril) y se utilizaron dos métodos de inoculación: **a) inyección:** Se inocularon 10 plantas de cada variedad comercial y genotipo, siguiendo la metodología de Maas *et al.* (2000); **b) aspersión:** Se asperjaron **10** plantas por material hasta punto de goteo siguiendo la metodología de Bestfleisch *et al.* (2015). El experimento se estableció en campo bajo túneles de plástico con un diseño de bloques completos al azar.

Con ambos métodos de inoculación, las plantas se observaron cada 24 h durante 11 días para registrar el período de incubación y posteriormente cada 4 días durante cuatro semanas para evaluar la severidad mediante la escala que se indica posteriormente.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de severidad se sometieron a análisis de la varianza y posterior separación de medias con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) con el paquete estadístico SAS (The SAS System for Windows v9.0).

Con los datos de incidencia se obtuvo el área bajo la curva del progreso de la enfermedad para cada material evaluado (LANREF-Mora-Aguilera, COLPOS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de patogenicidad

Se obtuvieron 14 aislamientos de *X. fragariae* de los estados de Michoacán, Jalisco y Puebla (Cuadro 1), a partir de hojas con síntomas típicos de la bacteria (Fig. 2). Todos los aislamientos fueron patogénicos al ser inoculados en plantas de fresa (var. Monterrey) y ocasionar manchas acuosas en el sitio de inoculación (Fig. 1), síntomas típicos de la infección por esta bacteria. El período de incubación osciló entre tres y cinco días, registrándose los más cortos para los aislamientos (2XfMxMich) y (12XfMxJal) (Cuadro 1).



Figura 1. Hojas de fresa infectadas de forma natural por *Xanthomonas fragariae*. Manchas angulares rodeadas por un halo amarillo (A), lesiones necróticas y deformación de hojas (B).

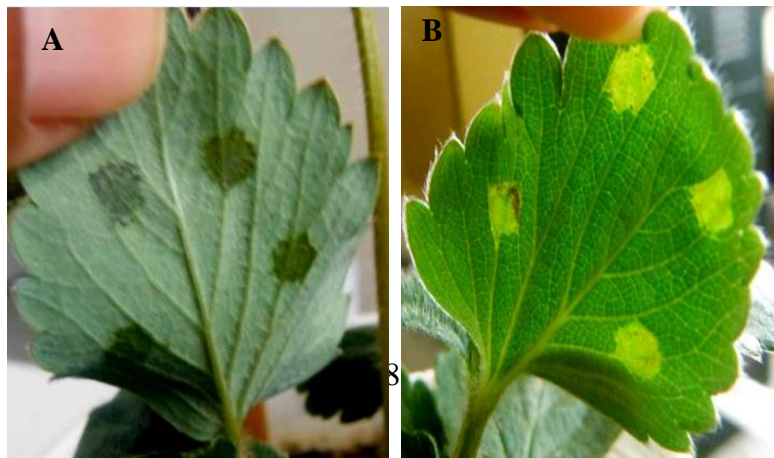


Figura 2. Vista abaxial (A) y adaxial (B) de las hojas con lesiones acuosas observadas en los sitios de inoculación (por inyección) de *Xanthomonas fragariae* a los 15 días después de la inoculación.

Cuadro 1. Origen de aislamientos e identificación de *Xanthomonas fragariae*, período de incubación y tamaño de lesión registrada en plantas de fresa var. Monterrey.

Aislamiento	Localidad	Período de incubación (días)	Tamaño de la lesión (cm)	No. accesión	
				<i>gyrB</i>	<i>hrp</i>
1XfMxMich	Tupátaro †	5	0.38	KU684652	KU747975
2XfMxMich	Tangancícuaro†	3	0.45	KU684654	KU747976
3XfMxMich	Jacona†	5	0.41	KU684655	KU747977
4XfMxMich	Tangancícuaro†	5	0.37	KU684656	KU747978
5XfMxMich	Tangancícuaro†	5	0.37	KU719623	KU747979
6XfMxMich	Santiago, Tangamandapio †	5	0.37	KU719624	KU747980
				KU719625	KU747981
7XfMxMich	Santiago, Tangamandapio†	5	0.45	KU719626	KU747982
8XfMxMich	Santiago, Tangamandapio†	5	0.46	KU719627	KU747983
9XfMxMich	Tangamandapio†	5	0.38		
10XfMxMich	Jacona†	5	0.38	KU719628	KU747984
11XfMxJal	Tapalpa¶	5	0.51	KU719629	KU747985
12XfMxJal	Tapalpa¶	3	0.38	KU719630	KU747986
13XfMxJal	Cd. Guzmán¶	5	0.45	KU684653	KU747987
14XfMxPue	San Salvador el seco§	5	0.38	KU719631	KU747988

†= Michoacán; ¶= Jalisco; §=Puebla

Análisis filogenético

El análisis de las secuencias de los segmentos de los genes *hrp* y *gyrB* agrupó a los 14 aislamientos del presente estudio con un aislamiento de Australia (*GenBank Accession* HQ223085) (Fig.3.), agrupándose en una sola rama lo que indica que son muy similares entre sí. Los aislamientos de *X. fragariae* infectaron a las plantas de fresa var. Monterrey con un período de incubación de cinco días, excepto en los aislamientos 2XfMxMich y 12XfMxMich que fue de tres días. Estas diferencias muestran la variabilidad inherente de esta especie bacteriana. Si bien pudieron observarse diferencias a nivel biológico, no fue posible encontrar a nivel genético con las regiones de los genes estudiados. Stöger *et al.* (2008) estudiaron la variabilidad genética de diversos aislamientos de *X. fragariae* mediante Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) y Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) sin encontrar diferencias entre ellos. No obstante, estudios donde se analizaron los genes *hrp* y *gyrB* para diversas especies de bacterias fitopatógenas, incluyendo otras especies del género *Xanthomonas* spp., fueron consistentes y mostraron la variabilidad genética que existe entre ellas (Yin *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010). Sin embargo, los resultados del análisis de las secuencias parciales de los genes *hrp* y *gyrB* de los 14 aislamientos de *X. fragariae* de la presente investigación, no mostraron variabilidad a pesar de las diferentes condiciones ambientales, variedades y manejo del cultivo, entre otros factores, que existen en las tres regiones donde se colectaron las muestras. Lo anterior pudiera indicar una baja diversidad genética, probablemente por un origen común de los aislamientos que se introdujeron en México o pudiera deberse a que actualmente se cuenta

con un número reducido de secuencias de los genes *hrp* y *gyrB* de esta especie en la base de datos del GenBank que permitan detectar diferencias en estas regiones del genoma. Actualmente se trabaja en el secuenciamiento del genoma completo de estos aislamientos, con la intención de tener mayor claridad en cuestiones relacionadas con la interacción genotipo/severidad de los síntomas inducidos, así como posibles estudios filo-geográficos de los mismos.

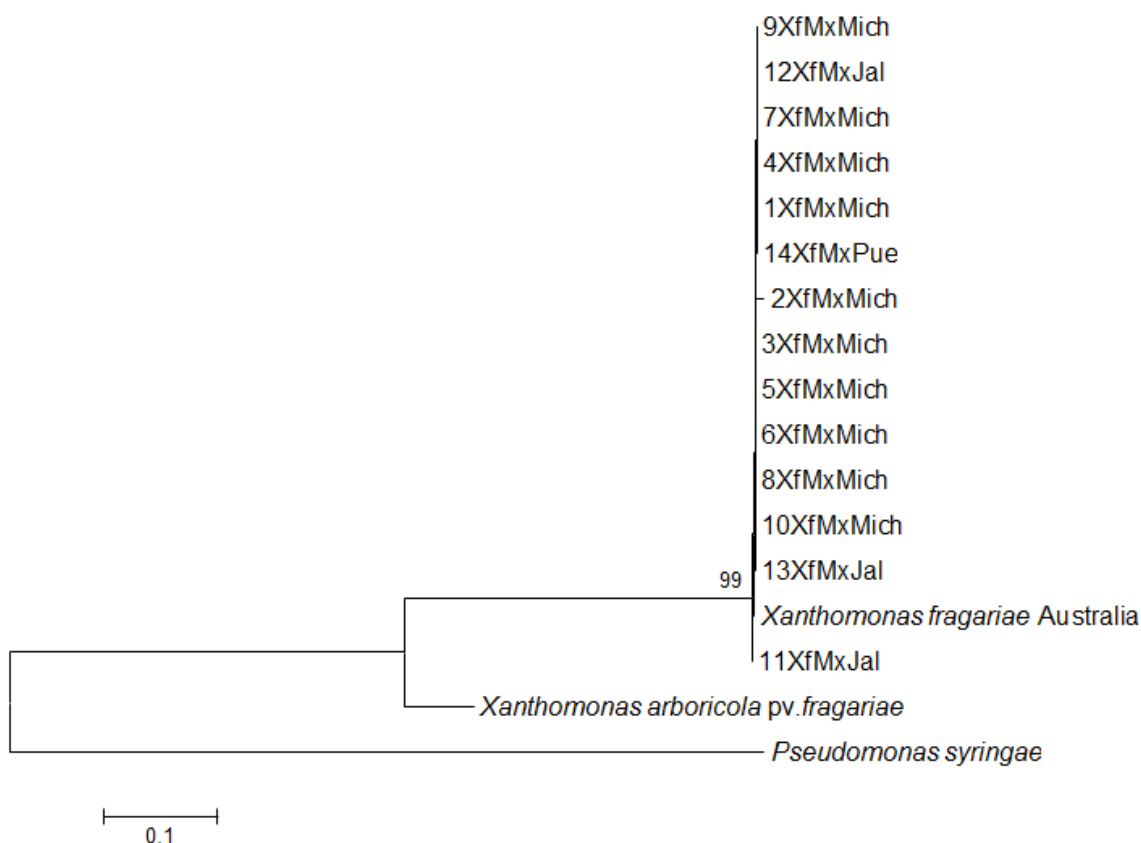


Figura 3. Árbol generado con el método Neighbour-joining. Las distancias evolutivas se obtuvieron por el método de Tamura 3-parameter model empleándose bootstrap con 10,000 repeticiones a partir de secuencias de nucleótidos concatenados con regiones parciales de los genes *hrp* y *gyrB* de 14 aislamientos de *Xanthomonas fragariae*. La barra indica el número de sustituciones por sitio. Únicamente se muestran valores de bootstrap arriba del 80%.

Escala diagramática

La escala diagramática diseñada tuvo cinco niveles de severidad (Fig. 4) en los que se indica el rango de área foliar afectada. Con el propósito de facilitar la evaluación del daño en campo. Esta escala se integró con una imagen que muestra el porcentaje de daño calculado con el software y que es representativa de cada nivel.

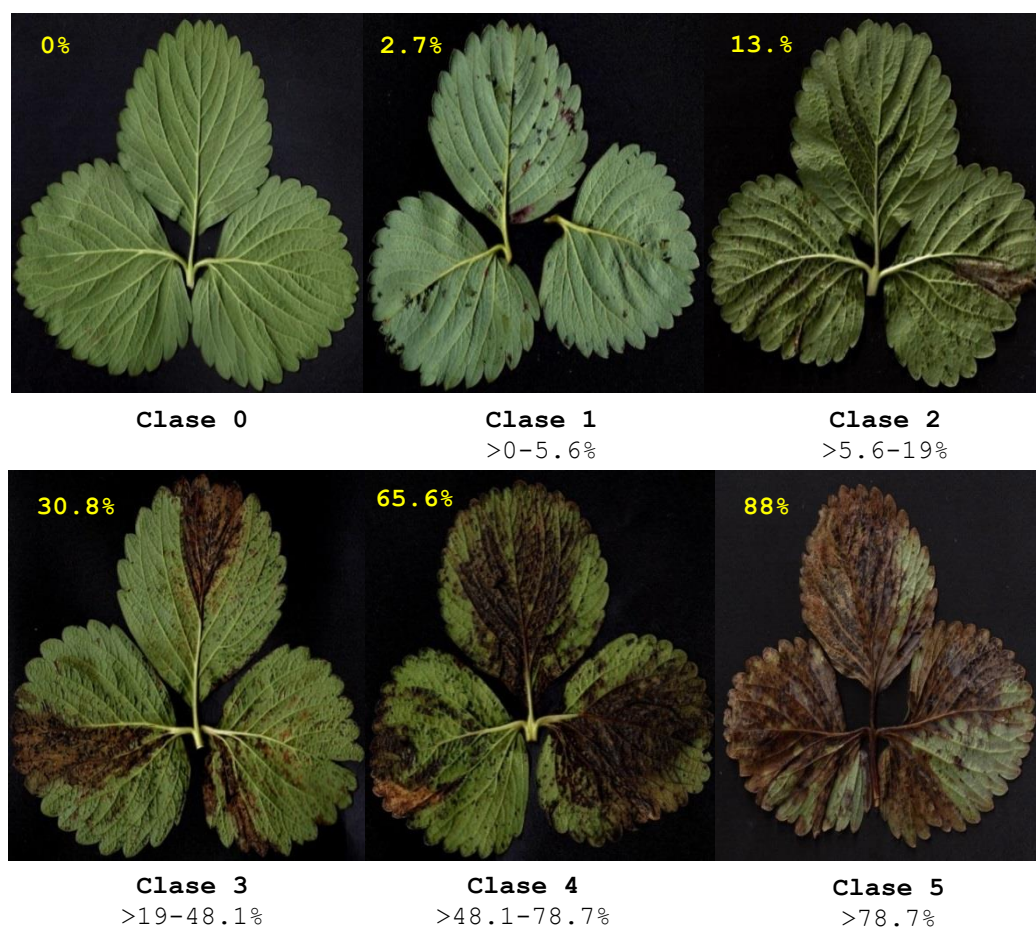


Figura 4. Escala diagramática obtenida para evaluar la severidad de *Xanthomonas fragariae* en genotipos de fresa. En cada nivel se indica el rango de área foliar afectada y se integra con una imagen representativa que muestra el porcentaje de tejido dañado calculado con el software.

El uso de este tipo de escalas reduce la subjetividad en las estimaciones de la gravedad de una enfermedad y constituyen un elemento indispensable en estudios epidemiológicos (Menge *et al.*, 2013). Bestfleisch *et al.* (2015) propusieron una escala de severidad para *X. fragariae* de nueve niveles; Sin embargo, nuestra experiencia mostró dificultad en la evaluación de severidad en este estudio, posiblemente debido al número de clases. En otras enfermedades se han diseñado escalas de severidad con cinco o seis niveles las cuales tienen valores aceptables de precisión y exactitud en la validación (Menge *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). La escala propuesta en la presente investigación muestra una secuencia progresiva del avance del área foliar afectada con fotografías que proporcionan de manera clara el nivel de daño que ocasiona esta bacteria en las localidades estudiadas.

Evaluación de severidad

Durante el período de evaluación (septiembre-octubre de 2015) se registraron temperaturas diurnas de 16-28°C y nocturnas de 18-28°C, con humedad relativa de 44-99%. Los siete genotipos evaluados de fresa resultaron susceptibles a *X. fragariae* al ser inoculados por inyección o aspersion.

Inoculación por inyección

Se observaron lesiones acuosas y necróticas formando una mancha angular delimitada por las nervaduras. En todos los genotipos evaluados, el 100% de plantas mostraron síntomas a los 11 días después de la inoculación, encontrándose variación en el periodo de incubación de cuatro, seis, nueve días y 11 días, lo que pudiera denotar mayor susceptibilidad del genotipo Frag53. En el caso del área bajo la curva del progreso de la enfermedad fue variable entre los diferentes genotipos siendo el genotipo FragLa quien tuvo el menor valor (31.82) de severidad (Fig. 5).

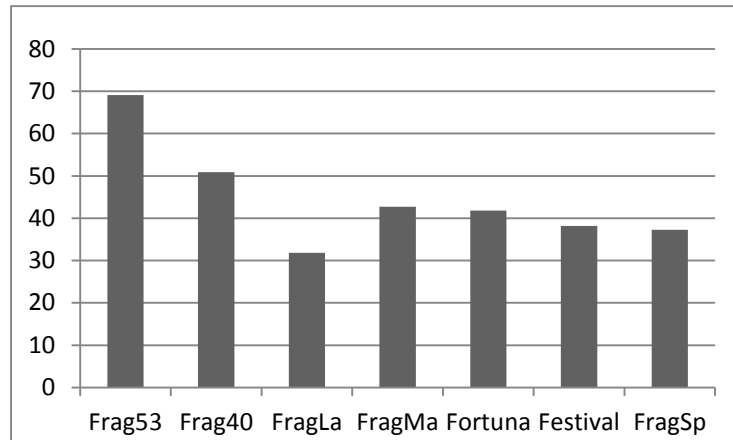


Figura 5. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en siete materiales de fresa inoculados por inyección con *Xanthomonas fragariae*.

Con respecto del tamaño de la lesión (cm), se observó que a los 34 días después de la inoculación (ddi), el genotipo Frag53 tuvo el mayor valor seguido de la variedad Festival. El resto de los materiales fueron estadísticamente similares (Cuadro 2). A los 18 ddi los genotipos Frag53 y la variedad Fortuna fueron estadísticamente similares y a partir de los 22 ddi se comportaron de manera diferente hasta finalizar la evaluación.

En todos los casos las lesiones aumentaron progresivamente de tamaño durante el tiempo que duró el experimento siendo de dos tipos: manchas necróticas irregulares rodeadas por un halo amarillo que generalmente llegaba a cubrir la totalidad de la lámina foliar (Fig. 6A), lesiones necróticas bordeadas por tejido acuoso (Fig. 6B). Solamente en el genotipo FragLa se observó que el 65 % de los sitios de inoculación formaron un tercer tipo de lesión consistente en manchas necróticas (Fig. 6C) y limitadas al área de inoculación, semejantes a las que se producen en una reacción de hipersensibilidad (RH). La RH es considerada la máxima expresión de resistencia de las plantas al ataque por patógenos y se define como una muerte rápida de las células vegetales asociada con la restricción del crecimiento del patógeno, que generalmente se reconoce por la presencia de una o varias células muertas con coloración café en el sitio de infección (Greenberg y Yao, 2004;

Sanzón y Zavaleta, 2011). Se considera que las plantas en las que se produce una RH poseen cierto grado de resistencia al patógeno que la indujo (Vlot *et al.*, 2008). Se ha reportado que diferentes especies de bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* y *Ralstonia solanacearum*, entre otras, poseen elicitores que disparan la RH (Grant y Mansfield, 1999). Bestfleisch *et al.* (2015) por su parte reportan que las plantas de fresa son más susceptibles a *X. fragariae* en etapas tempranas de desarrollo y que conforme maduran presentan cierta resistencia que puede hacerse más evidente con el tiempo.

Cuadro 2. Tamaño de lesiones (cm) ocasionadas por *Xanthomonas fragariae* en hojas de siete genotipos de fresa inoculadas por inyección.

Material	Días después de la inoculación				
	18	22	25	29	34
Frag53	1.18a*	1.78a	1.82a	2.08a	2.2a
Fortuna	0.99a	1.13b	1.27b	1.43b	1.72b
Festival	0.67b	0.70c	0.87c	0.91c	0.88c
FragMa	0.58b	0.62c	0.80c	0.87c	0.85c
FragLa	0.60b	0.60c	0.71c	0.67c	0.71c
Frag40	0.56b	0.60c	0.67c	0.65c	0.67c
FragSp	0.64b	0.63c	0.62c	0.64c	0.66c

*Tratamientos con la misma letra son estadísticamente similares (Tukey, $\alpha=0.05$)



Figura 6. Síntomas observados en siete variedades de fresa inoculados por inyección con *X. fragariae*. A) Manchas necróticas irregulares rodeadas por un halo amarillo que generalmente cubrían la lámina foliar. B) Mancha necrótica con tejido acuoso en la zona de avance de la lesión. C) Lesiones necróticas que no aumentaron de tamaño. D) Plantas testigo inyectadas con agua sin daño aparente.

Inoculación por aspersión

Con este método de inoculación, se observó consistentemente un mismo tipo de síntoma de manchas angulares acuosas (Fig. 7A) que coalescieron con el tiempo formando áreas necróticas de mayor tamaño bordeadas por tejido con coloración amarillo (Fig 7B). Este tipo de lesiones fueron diferentes de las que se observaron en las plantas inoculadas por inyección. Los primeros síntomas se observaron a los siete días después de la inoculación. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en severidad entre los materiales de fresa inoculados por aspersión con *X. fragariae*.

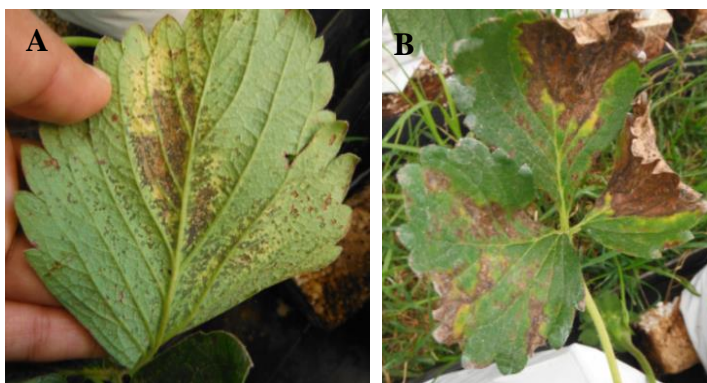


Figura 7. Síntomas inducidos mediante la inoculación de *Xanthomonas fragariae* por aspersión en genotipos de fresa. A) manchas angulares inicialmente acuosas que necrosaban con el tiempo B) lesiones necróticas con halo amarillo en ciertas zonas de avance de la lesión.

Los dos métodos de inoculación utilizados en la presente investigación fueron eficientes para infectar los genotipos de fresa. No obstante, con la inoculación por aspersión se observaron síntomas similares a los que ocurren de manera natural.

De manera experimental se tiene cierto control de la bacteria con tratamientos térmicos, esterilización de superficie, inmersión de plántulas en cloro + radiación UV-C y remoción de hojas y peciolas en plantas de vivero (Turechek y Peres, 2009; Turechek *et al.*, 2013). El mejoramiento genético como un método más de manejo de esta enfermedad es una herramienta valiosa que requiere de la evaluación y selección constante de genotipos con características agronómicas deseables así como la valoración de la resistencia o tolerancia a la bacteria. Con base en esto último, es necesario continuar las evaluaciones de los materiales de fresa con el propósito de obtener genotipos mejor adaptados a este patosistema con *X. fragariae*, lo que proporcionará una alternativa de manejo eficiente de la enfermedad. En México se ha trabajado muy poco en el desarrollo de técnicas de selección de materiales de fresa resistentes o con cierto grado de tolerancia a la mancha angular de la hoja debido a su reciente introducción en el país. En el presente estudio se evaluaron dos formas de inoculación de *X. fragariae* que en otros trabajos se reportan de manera separada. Si bien en ambos casos hubo infección, el período de incubación con la inoculación por inyección fue menor por lo que puede ser más conveniente en programas de selección al reducir el tiempo de evaluación de los materiales genéticos.

CONCLUSIONES

El análisis filogenético generado a partir de secuencias parciales de los genes *hrp* y *gyrB* no mostró variabilidad entre los 14 aislamientos de *X. fragariae* analizados provenientes de las localidades de Túpataro, Tangancícuaro, Jacona, Santiago (Michoacán), Ciudad. Guzmán, Tapalpa (Jalisco) y San Salvador el Seco (Puebla).

Los genotipos de fresa FragMa y FragLa mostraron valores bajos de severidad de los síntomas y este último tuvo además la menor área bajo la curva del progreso de la enfermedad pudiéndose indicar una menor susceptibilidad del mismo a la bacteria.

LITERAURA CITADA

Almeida, N. F., S. Yan, R. Cai, R. Clarke C, E. Morris C, W. Schaad N, L. Schuenzel E, H.

Lacy G, X. Sun, B. Jones J, A. Castillo J, T. Bull C, S. Leman, S. Guttman D, C.

Setubal J. and A. Vinatzer B. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology* 100:208-215.

Bestfleisch, M., K. Richter, A. Wensing N, Wünsche J, V. Hanke M, M. Höfer, E.

Schulte. and H. Flachowsky. 2015. Resistance and systemic dispersal of *Xanthomonas fragariae* in strawberry germplasm (*Fragaria* L.). *Plant Pathology* 64:71-80.

CABI/EPPO: 1998. *Xanthomonas fragariae*. – Distribution maps of Quarantine Pests for Europe No. 284. CAB International, Wallingford, UK.

Fernández-Pavía, S., G. Rodríguez-Alvarado E, Garay-Serrano. and R. Cárdenas-Navarro. 2014. First report of *Xanthomonas fragariae* causing angular leaf spot on strawberry plants in Mexico. *Plant Disease notes* 98:682.

- Grant, M. and J. Mansfield. 1999. Early events in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 2:312-319.
- Greenberg, J. T. and N. Yao. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6:201-211.
- Kennedy, B. W. and T.H. King. 1962. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology* 52:873-875.
- Koike, S. T., G. Zalom F, A. Phillips P, C. Toscano N, D. Gubler W, T. Browne G, B. Westerdahl B, A. Fennimore S. and F. Smith R. 2005. Guía para el manejo de las plagas: fresas. University of California. Publicación 3473.
- Koike, H. 1965. The aluminium-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* 55, 317-9. Citado por: Vandroemme, J., Baeyen, S., Van Vaerenbergh, J., De vos P., Maes, M. 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology* 57:438-444.
- Maas, J. L., Gouin B. C., Hartung J. S. and Hokanson S. C. 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *Hort Science* 35:128-131.
- Menge, D., M. Makobe, S. Shomari. and A Tiedemann V. 20013. Development and validation of a diagrammatic scale for estimation of cashew blight for epidemiological studies. *International Journal of Advanced Research* 1:26-38.
- Mora-Aguilera, G.; Rivas-Valencia P; Gongora-Canul C; Tovar-Soto A; Cristobal-Alejo J; Loeza-Kuk E; S Michereff, A Marinelli y Osada-Velazquez K. 2000. Sistemas computarizados en la epidemiología: 1. 2-LOG ver 1.0 y su aplicación en el diseño de escalas diagramáticas logarítmicas. XXIX Simp. Nal. De Parasit. Agric. 15-17 oct. Pto. Vall., Mex.

- Oliveira, F. M. L., E. Ampélio P, L. Leoni B, J. Lemos da S. and M Sobral de A. 2014. Diagramatic scale for blister spot in leaves of coffee tree. *African Journal of Agricultural Research* 10:2068-2075.
- Roberts, P. D., B. Jones J, K. Chandler C, E. Stall R. and D. Berger R. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* 80:1283-1288.
- Roberts, P. D., B. Jones J. and K. Chandler C. 1997. Disease progress, yield loss, and control of *Xanthomonas fragariae* on strawberry plants. *Plant Disease* 81:917-921.
- Sanzón G, D. y E. Zavaleta M. 2011. Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29: 154-164.
- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/>
- Stöger, A., D. Barionovi, A. Calzolari, R. Gozzi, W. Ruppitsch. and M. Scortichini. 2008. Genetic variability of *Xanthomonas fragariae* strains obtained from field outbreaks and culture collections as revealed by repetitive-sequence PCR and AFLP. *Journal of Plant Pathology* 90:469-473.
- Tamura, K., Peterson D, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei. and S. Kumar. 2011. Mega 5: Molecular Evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, doi:10.1093/molbev/msr121.

- Turechek, W. W. and A. Peres N. 2009. Heat Treatment effects on strawberry plant survival and angular leaf spot, caused by *Xanthomonas fragariae*, in nursery production. *Plant Disease* 93:299-308.
- Turechek, W. W., S. Wang, G. Tiwari. and N. A. Peres. 2013. Investigating alternative strategies for managing bacterial angular leaf spot in cranberry nursery production. *International Journal of Fruit Science* 13:234-245.
- Vlot, A. C., D. F. Klessig. and S. Park. 2008. Systemic acquired resistance the elusive signal (s). *Current opinion in Plant Biology* 11:436-422.
- Wyenandt, A. and P. Nitzsche. 2013. Angular leaf spot in fall transplanted-strawberries. Plant & Pest advisory. Rutgers, New Jersey Agricultural Experiment Station. <http://plant-pest-advisory.rutgers.edu/angular-leaf-spot-showing-up-in-fall-transplanted-strawberries/>
- Yin, H. C., L. Cao, M. Xie, Q. Chen, G. Qiu, J. Zhou, L. Wu, D. Wang. and X. Liu. 2008. Bacterial diversity based on 16S rRNA and *gyrB* genes at Yinshan mine, China. *Systematic and Applied Microbiology* 31:302-311.
- Young, J. M., C Park D. C, M. Shearman H. and E. Fargier. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31:366-377.