Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Proteger de las plagas los recursos vegetales del mundo

NIMF 27
ANEXO 5

ESP

PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS 27

PD 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa en frutas

Producido por la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

Este protocolo de diagnóstico fue adoptado por el Comité de Normas, en nombre de la Comisión de Medidas Fitosanitarias en agosto de 2014.

El anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27.

NIMF 27
Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas

PD 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa en frutas

Adoptado en 2014; publicado en 2016

ÍNDICE

1. Información sobre la plaga 2
2. Información taxonómica 3
3. Detección 3
3.1 Síntomas en los frutos 3
3.2 Síntomas en las hojas y las ramas 5
3.3 Comparación de los síntomas de la mancha negra de los cítricos con los causados por otros organismos o factores abióticos 5
4. Identificación 5
4.1 Método A: Aislamiento y cultivo de *P. citricarpa* 6
4.1.1 Medios de cultivo 7
4.1.2 Características del cultivo 7
4.1.3 Morfología 7
4.1.4 Comparación de las características morfológicas y de cultivo de *P. citricarpa* con las de otras especies semejantes de *Phyllosticta* 8
4.2 Método B: Análisis moleculares 9
4.2.1 Identificación de *P. citricarpa* por PCR convencional 9
4.2.1.1 Información general 9
4.2.1.2 Métodos 10
4.2.1.3 Información esencial sobre el procedimiento 11
4.2.2 Identificación de *P. citricarpa* mediante PCR en tiempo real 11
4.2.2.1 Información general 12
4.2.2.2 Métodos 12
4.2.2.3 Información esencial sobre el procedimiento 13
4.2.3 Identificación de *P. citricarpa* mediante secuenciación de los ITS 13
4.2.3.1 Información general 13
4.2.3.2 Métodos 14
4.2.3.3 Información esencial sobre el procedimiento 14
5. Registros 15
6. Puntos de contacto para obtener información adicional 15
7. Agradecimientos 15
8. Referencias 16
9. Figuras 19

1. Información sobre la plaga

Phyllosticta citricarpa (McAlpine) Aa, agente causal de la enfermedad "mancha negra de los cítricos", es un hongo que produce manchas en las hojas y lesiones en los frutos, que afecta a *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella* y sus híbridos. Salvo *Citrus aurantium* y sus híbridos y *Citrus latifolia*, todas las especies de *Citrus* cultivadas comercialmente son susceptibles (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002; Kotzé, 2000). *Citrus limon* es particularmente susceptible, por lo que suele ser la primera especie de *Citrus* que muestra síntomas de la enfermedad cuando se ha introducido el patógeno en una nueva área (Kotzé, 2000).

La mancha negra de los cítricos se registró por primera vez en Australia en 1895 en *Citrus sinensis* (Benson, 1895). Ahora está presente en algunas áreas productoras de cítricos de África, Asia, Australia y América del Norte y del Sur (CABI, 2011; NAPPO, 2010; Schubert *et al.*, 2012). No se ha notificado la presencia del organismo en Europa, América Central o la región del Caribe (CABI, 2011; CABI/EPPO, 1998; EPPO/CABI, 1997; NAPPO, 2010).

P. citricarpa tiene impacto económico debido sobre todo a las lesiones externas que provoca, lo que hace que la fruta cítrica no sea apta para el mercado en fresco (Spósito, 2003). Las infecciones severas pueden dar lugar a la caída prematura de los frutos (Kotzé, 2000). En los años favorables para el desarrollo de la plaga y cuando los frutos se mantienen en el árbol después de alcanzar el pico de madurez se producen algunas pérdidas debidas a su caída (CABI, 2011). Además, los frutos con infección latente (asintomática) en el momento de la cosecha pueden desarrollar síntomas durante el transporte o el almacenamiento (Kotzé, 1996).

En la epidemiología de la mancha negra de los cítricos influyen la disponibilidad de inóculo, la presencia de condiciones ambientales favorables para la infección (es decir, condiciones de calor, humedad y entorno mojado), el ciclo de crecimiento del árbol y la edad de los frutos y las hojas en relación con su susceptibilidad a la infección (Kotzé, 1981, 2000). En las áreas donde la lluvia se limita a una sola estación, la principal fuente de inóculo son los pseudotecios con ascosporas, que se producen exclusivamente en la hojarasca. Donde la lluvia no se limita a una sola estación, cuando frutos fuera de temporada con lesiones permanecen en los árboles después de la floración y el cuajado de frutos o cuando se produce una floración sucesiva e irregular en las especies y variedades cultivadas de cítricos, también son importantes como fuente de inóculo los picnidios con conidios de *P. citricarpa* (Kotzé, 1981; Spósito *et al*., 2008, 2011).

La formación de pseudotecios se produce 40–180 días después de la caída de la hoja, dependiendo de la frecuencia de humedecimiento y secado, así como de las temperaturas predominantes (Kotzé, 1981). En algunos países las hojas de los cítricos caen a lo largo de todo el año y en otros en una estación determinada, y esto afecta la disponibilidad de inóculo. La temperatura óptima para la formación de pseudotecios es de 21–28 ºC; por debajo de 7 ºC y por encima de 35 ºC no se forman (Lee y Huang, 1973). Las ascosporas se liberan durante las precipitaciones y ocasionalmente durante el riego, o cuando hay un rocío intenso (Kiely, 1949a; Kotzé, 2000). La liberación de ascosporas se encuentra estrechamente influenciada por el régimen de lluvias (Kotzé, 1981). Las ascosporas salen despedidas con fuerza hasta una altura de 1,2 cm por encima de los pseudotecios y las corrientes de aire las transportan a grandes distancias a través de la cubierta vegetal (Kiely, 1949a). El período crítico para la infección comienza con el cuajado del fruto y dura 4-6 meses, pero los primeros síntomas en los frutos no aparecen hasta más de seis meses después del cuajado de frutos (Baldassari *et al.*, 2006). En el Brasil, los frutos de las variedades "Valencia" y "Natal" de *C. sinensis* son susceptibles por lo menos hasta 24 semanas después de la caída del 75 % de los pétalos, cuando tienen un diámetro de 5-6 cm (Baldassari *et al.*, 2006).

Después de la infección, el hongo permanece en estado quiescente hasta que el fruto ha crecido totalmente o madurado, manifestándose los síntomas muchos meses después de haberse producido la infección (Kotzé, 2000). Las hojas permanecen susceptibles a la infección desde el desarrollo hasta los 10 meses de edad (Truter *et al.*, 2007).

Se producen picnidios con conidios en los frutos, las hojas, las ramas muertas, los pedicelos de los frutos y, en abundancia, en la hojarasca (Kotzé, 2000). Pueden ser dispersados por salpicaduras sobre la cubierta vegetal o ser arrastrados por lavado desde los frutos infectados que quedan en el árbol a frutos más jóvenes y a las hojas que están todavía en etapa susceptible (Agostini *et al.*, 2006; Spósito *et al.*, 2008). *P. citricarpa* tiene asimismo un estado asexual microconidial, que se ha descrito en el género *Leptodothiorella* (Kiely, 1949a). Este estado microconidial, también conocido como estado "espermogonial" (Kiely, 1949a), suele aparecer en las hojas caídas antes de la formación de pseudotecios. Sin embargo, sigue sin estar clara la función de los microconidios en la biología de *P. citricarpa*.

El desarrollo de síntomas en los frutos maduros se ve favorecido por el aumento de la temperatura, la intensidad luminosa elevada, la sequía y el escaso vigor del árbol. Los árboles más viejos suelen tener más mancha negra de los cítricos que los más jóvenes (Kotzé, 2000). Se asume que la dispersión de *P. citricarpa* a nuevas áreas se ha dado a través de las plantas de vivero u otro material de plantación infectado y no a través de fruta cítrica (Kotzé, 2000; Timmer, 2004).

Hay que señalar que en fruta cítrica asintomática o fruta con manchas muy pequeñas (<2 mm de diámetro) sin picnidios puede estar presente el endofito no patógeno *Phyllosticta capitalensis* Henn (antes denominado incorrectamente *Guignardia mangiferae* A.J. Roy) (Glienke *et al.*, 2011), registrado en numerosas familias de plantas. Baayen *et al*. (2002) han descrito las características culturales, morfológicas y moleculares que diferencian a *P. capitalensis* (2002) de *P. citricarpa*. Además, los síntomas de *P. citricarpa* se pueden confundir con los producidos por *Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous y Gruyter, patógeno descrito recientemente que hasta el momento solo se ha encontrado en *Citrus maxima* (Wang *et al*., 2012; Wulandari *et al*., 2009). Se desconoce la patogenicidad de *P. citriasiana* para otras especies de *Citrus*. Wulandari *et al*. (2009) han descrito las características culturales, morfológicas y moleculares que diferencian a *P. citriasiana* de *P. citricarpa*, la especie patógena para los cítricos. Recientemente se han descrito dos especies de *Phyllosticta* asociadas con *Citrus* spp. *Phyllosticta citrichinaensis* produce pequeñas manchas pardas hundidas con los bordes de color pardo oscuro y halos de color verde oliva en hojas de pomelo. El patógeno también induce la aparición de pequeñas manchas de color entre pardo y negro semejantes a la melanosis en frutos de mandarinos y naranjos (Wang *et al*., 2012). En el Brasil se ha detectado la presencia de *P. citribraziliensis* como endofito en hojas sanas de *Citrus* spp. (Glienke *et al*., 2011).

2. Información taxonómica

Nombre:	*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa, 1973
Sinónimos:	*Phoma citricarpa* McAlpine, 1899
	Guignardia citricarpa Kiely, 1948
	Phyllostictina citricarpa (McAlpine) Petr., 1953
	Leptodothiorella sp. (spermatial state)
Posición taxonómica:	Eukaryota, Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Botryosphaeriales, Botryosphaeriaceae
Nombres comunes:	Mancha negra de los cítricos (véanse en CABI [2011] para nombres comunes en otros idiomas)
Referencia:	MycoBank 320327

3. Detección

P. citricarpa puede estar potencialmente presente en frutos, pedicelos, hojas y ramas de *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella* y sus híbridos (CABI, 2011).

3.1 Síntomas en los frutos

En los frutos aparecen varios síntomas (por ejemplo manchas duras, manchas moteadas, falsa melanosis, manchas virulentas), dependiendo de la temperatura y la madurez del fruto (Kotzé, 2000).

Es poco probable que pueda confirmarse con exactitud exclusivamente con un examen visual la presencia de *P. citricarpa* en los frutos, ya que el aspecto de los síntomas es variable y se pueden confundir fácilmente con los provocados por otros patógenos de los cítricos o por daños mecánicos, de frío o de insectos (Kotzé, 2000; Snowdon, 1990; L. Díaz, comunicación personal). Los cuatro síntomas siguientes están ampliamente reconocidos tal como los describe Kiely (1949a, 1949b, 1960).

Mancha dura. Es el síntoma más típico de la mancha negra de los cítricos y consiste en lesiones superficiales de 3-10 mm de diámetro, con el centro entre gris y bronceado y los bordes de color entre pardo oscuro y negro (Figura 1A). En las etapas avanzadas de desarrollo del síntoma, el centro de las lesiones adquiere la forma de cráter. Las lesiones individuales de manchas duras pueden permanecer pequeñas o bien unirse para formar lesiones de mayor tamaño. Alrededor de estas lesiones puede aparecer un halo amarillo cuando el fruto es verde o un halo verde cuando el fruto es amarillo o anaranjado. En el centro de estas manchas se producen con bastante frecuencia picnidios (Figura 1a), que se pueden detectar utilizando una lupa o un microscopio de disección. Las manchas duras suelen aparecer cuando el fruto comienza a madurar, incluso antes del cambio de color, y en la parte más expuesta a la luz solar (Kotzé, 1981, 2000). En muchos casos, la mancha negra de los cítricos puede identificarse fácilmente por la presencia de lesiones de manchas duras con picnidios.

Mancha moteada. Son manchas grises, bronceadas, rojizas o incoloras, de 1–3 mm de diámetro, ligeramente hundidas en el centro y sin halo alrededor (Figura 1B). Las manchas cambian a color pardo con la edad y casi nunca tienen picnidios (Figura 1b). Las manchas moteadas casi siempre aparecen cuando el fruto ha cambiado de color y también se pueden formar como manchas satélite alrededor de las lesiones de manchas duras (Bonants *et al.*, 2003) (Figura 1C). Las manchas moteadas aisladas se pueden unir para formar lesiones de mayor tamaño que se convierten en manchas virulentas (Figura 2C), especialmente durante el almacenamiento de la fruta (Kotzé, 1981, 2000).

Falsa melanosis o *mancha punteada*. Suele aparecer en los frutos verdes en forma de pequeñas protuberancias de color entre pardo oscuro y negro, a menudo rodeadas de puntos oscuros (FUNDECITRUS, 2005) (Figuras 2A, 2a, 2B). Las lesiones no tienen picnidios y se pueden unir a medida que avanza la estación (CABI, 2011). Estos síntomas se observan en las áreas de cultivo de cítricos en las que ha estado presente *P. citricarpa* durante mucho tiempo (FUNDECITRUS, 2005).

Mancha virulenta, mancha extendida o mancha galopante. Son lesiones irregulares hundidas, de color entre rojo y pardo o incoloras, que aparecen en los frutos maduros muy infectados hacia el final de la estación (Figura 2C). En condiciones de humedad elevada se desarrollan con el tiempo en estas lesiones numerosos picnidios (Kotzé, 2000). Las manchas virulentas crecen con rapidez, cubriendo dos tercios de la superficie del fruto en cuatro o cinco días. Es el síntoma más dañino, puesto que a diferencia de los otros penetra profundamente en el mesocarpio (albedo), atravesando en ocasiones todo el grosor de la cáscara y provocando la caída prematura del fruto y serias pérdidas post-cosecha (Kotzé, 1981).

También se ha informado la aparición en frutos cítricos de otros dos síntomas que se describen a continuación, aunque no son frecuentes.

Mancha reticulada. Lesiones amarillas superficiales con el centro de amarillo oscuro a pardo, textura lisa y bordes no definidos (Aguilar-Vildoso *et al*., 2002) (Figura 2D). Este síntoma aparece en los frutos verdes y puede cubrir gran parte de su superficie (Goes, 2001). Las lesiones carecen de picnidios y con frecuencia aparecen como una red parda sobre una superficie amarilla. Los frutos que muestran manchas reticuladas se presentan agrupados en la copa del árbol (M. Spósito, comunicación personal).

Mancha agrietada. Lesiones superficiales ligeramente elevadas de color entre pardo oscuro y negro, de tamaño variable, con una superficie agrietada y bordes irregulares (Goes *et al*., 2000) (Figura 2E). Las lesiones carecen de picnidios y aparecen en frutos de más de seis meses. Este síntoma se ha asociado con la presencia de *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead (FUNDECITRUS, 2005; Spósito, 2003).

Hay que señalar que el mismo fruto puede mostrar más de uno de los síntomas descritos o etapas intermedias entre ellos (Figura 1C, 1c).

En algunas áreas con una presión elevada de inóculo, también pueden aparecer síntomas en los frutos pequeños, el cáliz y los pedúnculos. Los síntomas en el cáliz son lesiones de color entre rojo y pardo oscuro semejantes a las manchas moteadas. En los frutos pequeños y los pedúnculos, los síntomas aparecen como pequeñas manchas negras (Aguilar-Vildoso *et al*., 2002). Dichos síntomas en los frutos pequeños, el cáliz y los pedúnculos se han descrito solamente en el Brasil.

3.2 Síntomas en las hojas y las ramas

La mancha negra de los cítricos suele estar presente en las hojas como infección quiescente sin síntomas visibles (Sutton y Waterston, 1966). Si aparecen síntomas, comienzan como manchas pequeñas visibles en las dos caras de la hoja. Las manchas, que pueden aumentar de tamaño hasta los 3 mm de diámetro, son circulares, con el centro que adquiere un color gris o pardo claro rodeado de un borde pardo oscuro o negro y un halo amarillo (Kotzé, 2000) (Figura 3A). Puede haber ocasionalmente picnidios en el centro de las lesiones en la cara adaxial de la hoja.

También pueden aparecer lesiones similares a las de las hojas en las ramas pequeñas, más comúnmente en *C. limon* que en otras especies de cítricos (M. Truter, comunicación personal). Los síntomas son pequeñas lesiones (0,5-2 mm de diámetro) redondas ligeramente hundidas, con bordes de pardos a negros y el centro de gris a pardo claro (Figura 3B). Puede haber ocasionalmente picnidios en el centro de las lesiones.

3.3 Comparación de los síntomas de la mancha negra de los cítricos con los causados por otros organismos o factores abióticos

El aspecto de los síntomas que aparecen en los frutos es variable y a menudo se asemeja a los causados por otros patógenos de los cítricos (como *P. citriasiana*, *P. citrichinaensis*, *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella citri*, *Alternaria alternata pv. citri*, *Septoria* spp., *Colletotrichum* spp.) o por insectos, daños mecánicos o de frío, en particular en el caso de la mancha moteada (Bonants *et al.*, 2003; Snowdon, 1990; Wang *et al.*, 2012; Wulandari *et al*., 2009; L. Díaz, comunicación personal).

Debido a que los síntomas causados por *P. citricarpa* en los frutos cítricos son semejantes a los causados por otros patógenos, solamente puede hacerse un diagnóstico confiable utilizando los métodos que se describen a continuación.

4. Identificación

En este protocolo se describe la detección e identificación de *P. citricarpa* en fruta cítrica sintomática. Se debería inspeccionar la fruta cítrica para detectar cualquier síntoma típico de mancha negra de los cítricos (véase el apartado 3). Si se observan síntomas sospechosos en forma de manchas o lesiones, se examinan con una lupa o un microscopio de disección para detectar la presencia de picnidios. Si en las manchas duras se observan picnidios tal como se describe en el apartado 3.1 y las características morfológicas de los picnidios y conidios corresponden a la descripción del apartado 4.1.3, puede haber presencia de *P citricarpa*. Sin embargo, dado que los picnidios y los conidios de *P. citricarpa* son muy semejantes a los de *P. citriasiana*, patógeno descrito recientemente en *C. maxima* (Wulandari *et al.*, 2009), la identidad de *P. citricarpa* se puede confirmar con seguridad mediante los métodos de diagnóstico que se describen más adelante (Figura 4). El método de diagnóstico A (aislamiento y cultivo) se utiliza para la identificación de *P. citricarpa* en el fruto, pero también se puede aplicar a las hojas, las ramas y los pedicelos, mientras que el método B (análisis molecular) solo se aplica al fruto cítrico.

Si después de la aplicación del método A las características culturales de las colonias cultivadas en agar-decocción de cerezas (CHA por sus siglas en inglés) y agar-harina de avena (OA por sus siglas en inglés) no son compatibles con las de *P. citricarpa* (véase el apartado 4.1.4, requisitos i), ii), iii) y iv)), el material vegetal se considera libre de *P. citricarpa.* En cultivos semejantes a los de *P. citricarpa* que

no produzcan picnidios maduros en 14 días, se recomienda la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y la secuenciación de los espaciadores de transcripción interna (ITS) (véase el apartado 4.2.1) o la PCR en tiempo real (véase el apartado 4.2.2). Sin embargo, el aislamiento y cultivo del organismo en los medios adecuados seguido de una prueba molecular directa de los cultivos es un procedimiento que requiere mucho tiempo y por lo tanto resulta inconveniente cuando es urgente realizar el diagnóstico en los envíos.

Para la detección e identificación de *P. citricarpa* en frutos cítricos hay dos métodos disponibles de PCR (convencional y en tiempo real, véanse los apartados 4.2.1 y 4.2.2). Sin embargo, en pruebas rutinarias de frutos de *C. maxima* con síntomas típicos se ha observado recientemente que con el método de PCR en tiempo real elaborado por Gent-Pelzer *et al.* (2007) no se obtiene amplificación (Meffert, comunicación personal). El motivo es que en *C. maxima* los síntomas semejantes a los de la mancha negra de los cítricos son provocados por *P. citriasiana,* especie descrita recientemente estrechamente relacionada con *P. citricarpa* (Wulandari *et al*., 2009). Dado que no está claro si *P. citricarpa* puede provocar los síntomas típicos en *C. maxima,* los frutos de esta especie de *Citrus* con síntomas semejantes a los de la mancha negra de los cítricos también deberían ser sometidos a prueba para determinar la presencia de *P. citricarpa.*

El método de PCR en tiempo real elaborado por Gent-Pelzer *et al*. (2007) (véase el apartado 4.2.2) se puede utilizar para un diagnóstico positivo de *P. citricarpa,* puesto que solo se obtendrá un resultado positivo en presencia de *P. citricarpa* y no en el caso de *P. citriasiana* o *P. capitalensis*. El método de PCR convencional (descrito en el apartado 4.2.1) producirá una amplificación en presencia de *P. citricarpa* o *P. citriasiana*. En este caso, después de una señal positiva se debería recurrir al aislamiento y cultivo (véase el apartado 4.1), la PCR en tiempo real (véase el apartado 4.2.2) o la secuenciación de los ITS (véase el apartado 4.2.1) para distinguir entre las dos especies. En estos análisis moleculares no hay datos disponibles sobre las reacciones de *P. citrichinaensis* de China, descrita recientemente.

Hay que señalar que ocasionalmente pueden encontrarse acérvulos del hongo endofítico común *Colletotrichum* spp. con un aspecto similar a los picnidios de *P. citricarpa.* Sin embargo, es posible diferenciar *Colletotrichum* spp. por la presencia de setas en sus acérvulos, la producción de masas de conidios de color rosa o salmón en la superficie de las lesiones en condiciones de humedad y la morfología de sus conidios (Kotzé, 2000).

En el presente protocolo, los métodos (incluidas las referencias a los nombres comerciales) se describen tal y como se han publicado, puesto que en ellos se define el nivel original de especificidad alcanzado. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos pueden ajustarse a la norma de cada laboratorio, siempre que estén debidamente validados.

4.1 Método A: Aislamiento y cultivo de *P. citricarpa*

Las lesiones de la fruta se extraen con un perforador de corcho o un escalpelo, se sumergen en etanol al 70 % durante 30 segundos, se desinfestan las superficies con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % durante 2 minutos, se enjuagan dos veces con agua destilada estéril y se secan con papel secante (Peres *et al.,* 2007). Para aumentar la frecuencia del aislamiento, la extracción de las lesiones se debe efectuar con cuidado y eliminar el tejido asintomático antes de la siembra en placa (N.A. Peres, comunicación personal). A continuación, las lesiones se colocan de manera aséptica en placas de Petri (9 cm de diámetro) con CHA o papa-dextrosa-agar (PDA) (véase el apartado 4.1.1) o PDA con la adición de 50 µg/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (OEPP/EPPO, 2003). Si se utiliza PDA y se forman cultivos oscuros de crecimiento lento parecidos a los de *P. citricarpa,* se transfieren a placas de CHA para comprobar la velocidad de crecimiento de las colonias y a placas de OA (véase el apartado 4.1.1) para evaluar la producción de pigmento amarillo. Al mismo tiempo, los cultivos obtenidos en el medio de PDA se deberían colocar bajo luz de ultravioleta cercano (UVC) a 22 ºC para facilitar la inducción de formación de picnidios. Los cultivos que i) crecen lentamente en CHA (véase el apartado 4.1.2); ii) producen los picnidios y conidios característicos de *P. citricarpa* (véase el apartado 4.1.2); y iii) producen un pigmento amarillo en OA – aunque no todos los aislamientos de

P. citricarpa producen este pigmento en OA (Baayen *et al*., 2002) – se identifican como pertenecientes a *P. citricarpa*.

El método tiene los siguientes inconvenientes: a) *P. citricarpa* es un hongo de crecimiento bastante lento y con frecuencia su cultivo se ve invadido por otros hongos (por ejemplo, *C. gloeosporioides*) (Peres *et al*., 2007), porque ninguno de los medios de cultivo utilizados es selectivo para *P. citricarpa*, y b) es un método que requiere bastante tiempo, ya que se necesitan de 7 a 14 días para la producción de picnidios.

4.1.1 Medios de cultivo

Agar-decocción de cerezas (CHA). El jugo de cerezas se obtiene hirviendo 1 kg de cerezas, sin hueso ni peciolo, en 1 litro de agua del grifo durante aproximadamente dos horas. El extracto se filtra por una gasa, se introduce en botellas, se esteriliza durante 30 minutos a 110 ºC (pH 4,5) y se conserva hasta el uso. En una botella con 0,8 litros de agua destilada, se añaden 20 g de agar técnico n.º 3 y la mezcla se esteriliza durante 15 minutos a 121 ºC. Inmediatamente después de la esterilización, se incorporan 0,2 litros del extracto de cereza esterilizado, se mezcla bien y se esteriliza durante 5 minutos a 102 ºC (Gams *et al*., 1998).

Agar-harina de avena (OA). El OA está disponible comercialmente. También se puede preparar utilizando el siguiente método: Se colocan 30 g de copos de avena en una gasa y se suspende en una olla con agua del grifo. Después de cocer a fuego lento durante unas 2 horas, los copos se exprimen, se filtran por una gasa y el extracto se esteriliza durante 15 minutos a 121 ºC. En una botella con 1 litro de extracto de harina de avena, se añaden 20 g de agar técnico nº 3 y la mezcla se esteriliza durante 15 minutos a 121 ºC (Gams *et al*., 1998).

Papa-dextrosa-agar (PDA). El PDA está disponible comercialmente. También se puede preparar siguiendo el método descrito por Hawksworth *et al*. (1995).

4.1.2 Características del cultivo

Las colonias de *P. citricarpa* tienen un crecimiento lento en CHA; su diámetro medio es de 25–30 mm después de 7 días a 22 ºC en la oscuridad (Baayen *et al*., 2002). En PDA, las colonias tienen bordes irregulares rodeados por una zona translúcida de micelio sumergido incoloro (Figura 5A). El centro de la colonia es oscuro, con un micelio aéreo de color entre gris y verde claro, a menudo con numerosos penachos pequeños. El reverso de la colonia tiene el centro muy oscuro y está rodeado de áreas de color sepia grisáceo y castaño claro (Baayen *et al*., 2002). Después de 7–8 días comienzan a formarse estromas y se suelen producir picnidios maduros con conidios a los 10–14 días (Figura 5B). En OA, después de 14 días a 25 ºC en la oscuridad, las colonias son planas, extendidas, de color gris oliváceo que pasa a gris oliváceo pálido hacia el borde, con micelio aéreo escaso a moderado (Glienke *et al*., 2011). En OA se produce a menudo un pigmento amarillo característico que se dispersa en el medio alrededor de la colonia (Figura 6D, fila superior), aunque no todos los aislamientos de *P. citricarpa* los producen (Baayen *et al.*, 2002). La producción de este pigmento amarillo en CHA y PDA es escasa.

4.1.3 Morfología

Los datos publicados sobre la morfología de *P. citricarpa* varían considerablemente, en parte debido a la confusión acerca de la identidad de las distintas especies de *Phyllosticta* asociadas con *Citrus* (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al*., 2011; Wang *et al*., 2012; Wulandari *et al.*, 2009). Las siguientes características morfológicas y morfométricas se refieren a las fructificaciones y esporas de *P. citricarpa* que se producen fundamentalmente en cultivo; se basan en los datos de Sutton y Waterston (1966) y van der Aa (1973), revisados y modificados por Baayen *et al*. (2002).

Ascocarpos. Se forman pseudotecios en la hojarasca y en cultivo (De Holanda Nozaki, 2007), pero no se encuentran en ningún otro material vegetal (por ejemplo en las hojas adheridas, o en los frutos). Son solitarios o agregados, de globosos a piriformes, inmersos, de color entre pardo oscuro y negro, de 125–360 µm, con un solo ostiolo entre papilado y rostrado, y su superficie está cubierta con frecuencia con excrecencias irregulares de hifas. La capa externa de la pared se compone de células angulares con

paredes gruesas de color pardo, mientras que la capa interna tiene las células de angulares a globosas con paredes incoloras más finas.

Ascas. Fasciculadas, doblemente tunicadas, clavadas, con ocho esporas de ápice redondeado. Sus dimensiones antes de la ruptura de la pared externa son de 40–65 µm × 12–15 µm y antes de la dehiscencia se convierten en cilíndrico-clavadas y alcanzan hasta los 120–150 µm de longitud.

Ascosporas. Cortas, sin septos, hialinas, cilíndricas, engrosadas en el centro, ligeramente curvadas, de 12–16 µm × 4.5–6.5 µm, heteropolares con extremos obtusos desiguales. El extremo superior más pequeño tiene un apéndice semejante a un casquete mucoide no celular truncado de 1–2 µm de longitud y el extremo inferior tiene un apéndice agudo o ramificado de 3–6 µm de largo.

Picnidios. Se producen en el fruto, las hojas adheridas, las ramas muertas y la hojarasca, así como en cultivo. Son solitarios y en ocasiones agregados, globosos, inmersos, de color entre pardo claro y oscuro, y de 70–330 µm de diámetro. La pared picnidial está conformada por cuatro capas de células, las externas esclerosadas y las internas pseudoparenquimatosas, con ostiolo más oscuro, ligeramente papilado, circular y de 10–15 µm de diámetro.

Conidios. De obovados a elípticos, hialinos, sin septos, multigutulados, de 9,4-12,7 µm × (5,0-8,5) µm, con un apéndice subulado incoloro y una cubierta gelatinosa incolora apenas visible de <1,5 µm de grosor (Figuras 5C, 5D, 6A). Se forman como blastosporas a partir de conidióforos unicelulares cilíndricos hialinos de hasta 9 µm de longitud.

Estado espermacial. Descrito en el género morfológico *Leptodothiorella*, se produce tanto en hospedantes como en cultivo puro. Los espermacios tienen forma de pesas, raramente cilíndricos, rectos o ligeramente curvados, de 5-8 µm × 0,5-1 µm.

4.1.4 Comparación de las características morfológicas y de cultivo de *P. citricarpa* con las de otras especies semejantes de *Phyllosticta*

Los cultivos de *P. citricarpa* son muy semejantes a los de *P. citriasiana* (Wulandari *et al.*, 2009) y a los de *P. capitalensis* (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al*., 2011), siendo esta última endofítica y no patógena para *Citrus*.

La identificación de colonias de *P. citricarpa* es posible mediante a la combinación de las siguientes características:

(1) el crecimiento de las colonias en CHA (aunque los rangos se pueden superponer);

(2) el grosor de la cubierta mucoide que rodea los conidios (Figuras 5C, 5D, 6A, 6B, 6C);

(3) la longitud del apéndice conidial;

(4) la presencia de pigmento amarillo en OA, aunque no todos los aislamientos de *P. citricarpa* producen un pigmento amarillo (Baayen *et al*., 2002; Wulandari *et al*., 2009).

El Cuadro 1 contiene información detallada sobre las características distintivas de *P. citricarpa* y sus especies afines. Además, *P. citrichinaensis* se puede distinguir de *P. citricarpa* por su apéndice conidial más largo, de 14-26 µm (Wang *et al*., 2012).

Cuadro 1. Principales características morfológicas y culturales de *Phyllosticta citricarpa*, *Phyllosticta citriasiana* y *Phyllosticta capitalensis* (Baayen *et al*., 2002; Wulandari *et al*., 2009)

Característica	*P. citricarpa*	*P. citriasiana*	*P. capitalensis*
Tamaño medio de los conidios (µm)	10-12 × 6-7,5	12-14 × 6-7	11-12 × 6,5-7,5
Ancho de la cubierta mucoide (µm)	<1,5	1	1,5-2,5 (-3)
Longitud del apéndice apical (µm)	4-6 (-10)	7-10 (-14)	4-6 (-10)
Tamaño medio de las ascosporas (µm)	12-16 × 4,5-6,5	Se desconoce	15-17,5 × 6,5-7,5
Tamaño medio de los espermacios (µm)	5-8 × 0,5-1	3-5 × 1-2	7-10 × 1,8-2,5
Diámetro medio de las colonias (mm)*	25-30	18-20	>40
Temperatura máxima de crecimiento (ºC)	30-36	30-33	30-36
Producción de pigmento amarillo en un medio de agar-harina de avena (OA)	Sí†	No	No

* En un medio de agar-decocción de cerezas (CHA) después de 7 días a 22 °C en la oscuridad.

† Hay que señalar que no todos los aislamientos de *P. citricarpa* producen un pigmento amarillo.

4.2 Método B: Análisis moleculares

Se han diseñado distintos métodos moleculares para la identificación de *P. citricarpa* directamente en cultivos puros y en las lesiones de los frutos (Bonants *et al*., 2003; Gent-Pelzer *et al.*, 2007; Meyer *et al*., 2006, 2012; Peres *et al*., 2007; Stringari *et al*., 2009). Para la identificación de *P. citricarpa* se describen dos métodos: análisis de PCR convencional, diseñado por Peres *et al.* (2007), y análisis de PCR en tiempo real, diseñado por Gent-Pelzer *et al.* (2007). Hay que señalar que el uso de la PCR en tiempo real generará una señal positiva a partir de una sola lesión de mancha negra en el fruto, mientras que en algunos casos los resultados de la PCR convencional pueden no ser concluyentes. También se señala que no hay datos disponibles sobre reacciones positivas en los análisis moleculares de *P. citrichinaensis* descritos recientemente en frutos en China.

4.2.1 Identificación de *P. citricarpa* por PCR convencional

La especificidad (especificidad analítica) se evaluó en un estudio con 36 aislamientos de *P. citricarpa*, 13 aislamientos de *P. capitalensis* y aislamientos de plagas comunes de los cítricos, como *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella citri* y *Penicillium digitatum*. Solo *P. citricarpa* dio una reacción positiva. La sensibilidad (sensibilidad analítica; límite de detección) es de 1 pg de ADN/µl (Peres *et al.*, 2007). En este método se amplifica el ADN de *P. citricarpa* o bien de *P. citriasiana*. Hay tres métodos para distinguir las dos especies después de la aplicación de la PCR convencional: aislamiento y cultivo (véase el apartado 4.1), análisis de PCR en tiempo real (véase el apartado 4.2.2) y secuenciación de los espaciadores de transcripción interna (ITS) (véase el apartado 4.2.3).

4.2.1.1 Información general

El protocolo fue diseñado por Peres *et al.* (2007). La fuente de ácido nucleico es el micelio o las lesiones diseccionadas del fruto. El análisis está concebido para amplificar parte de la región de los ITS a fin de producir un amplicón de 300 pares de bases (pb). Los oligonucleótidos cebadores utilizados son:

Cebador directo: GCN (5'-CTG AAA GGT GAT GGA AGG GAG G -3')

Cebador inverso: GCMR (5'-CAT TAC TTA TCG CAT TTC GCT GC -3').

Para la amplificación de la PCR se utiliza MasterMix 2,5× de Eppendorf®1[1], que contiene ADN polimerasa Taq y tampón de reacción con Mg^{2}+ y nucleótidos. Para preparar las mezclas de reacción se utiliza agua de grado molecular (MGW): dicha agua debería estar purificada (desionizada o destilada), estéril (mediante autoclave o filtración por poros de 0,45 µm) y sin nucleasas. La amplificación se realiza en un termociclador tipo Peltier con tapa caliente.

4.2.1.2 Métodos

Extracción y purificación de ácido nucleico

El ADN se extrae de cultivos de hongos que han crecido durante siete días en un caldo de papa y dextrosa o de lesiones aisladas de los frutos. En el segundo caso se disecciona y extrae el tejido sintomático, eliminando en la medida de lo posible todo el mesocarpio (albedo) y la corteza exterior.

La extracción del ADN a partir del micelio se realiza utilizando kits de extracción de ADN disponibles en el mercado (por ejemplo, DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, QuickPick SML Plant DNA (Bio-Nobile), robot de aislamiento KingFisher® (Thermo)) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la extracción de ADN a partir de lesiones aisladas de los frutos, se puede utilizar el protocolo de extracción de ADN mediante lisis alcalina (Klimyuk *et al*., 1993) que se indica a continuación, seguido de purificación utilizando un método de varilla, que ha demostrado ser el más eficaz (Peres *et al*., 2007).

Método de extracción de ADN mediante lisis alcalina. Se coloca tejido sintomático del fruto en microtubos estériles de 2 ml con 40 µl de NaOH 0,25 M y se incuba en un baño de agua hirviendo (100 ºC) durante 30 segundos (período crítico). El contenido de los tubos se neutraliza mediante la adición de 40 µl de HCl 0,25 M, 20 µl de Tris-HCl 0,5 M y Nonidet P-40 a pH 8,0 y 0,25 % (v/v), y los tubos se colocan de nuevo en el baño de agua hirviendo durante 2 minutos. El material obtenido se puede purificar directamente aplicando el método de la varilla (véase infra) o almacenar a 4 ºC durante varias semanas. Antes de la purificación posterior al almacenaje, las muestras se incuban en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos.

Método de varilla para purificación de ADN. Después de la lisis alcalina (véase supra) se añaden 150 µl de etanol al 100 % y un pequeño fragmento de placa de celulosa para cromatografía de capa fina (varilla) a los microtubos de 2 ml. Los tubos se colocan de lado sobre hielo y se agitan durante 30 minutos. Se aspira el líquido y se añaden 500 µl de tampón de lavado ((Tris ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)-Na2 e hipoclorito de sodio (NaClO, pH 7,0) 10× y etanol al 95 %) diluido al 25 % y los tubos se invierten para mezclar el contenido. El lavado se repite dos veces. Las varillas se introducen en nuevos tubos y se secan en condiciones de vacío. Los tubos se colocan luego de lado y se añaden 50 µl de tampón Tris-EDTA a cada tubo. Después de incubarlos durante 5 minutos, los tubos se centrifugan 10 segundos, se retiran y desechan las varillas y se recupera el ADN. El ADN purificado se puede utilizar de manera inmediata o conservar a 4 ºC durante una noche o a -20 ºC para períodos más prolongados.

Otra posibilidad es extraer el ADN de las lesiones del fruto mediante kits de extracción de ADN disponibles en el mercado siguiendo las instrucciones del fabricante.

[1] La utilización en este protocolo de diagnóstico de la marca Eppendorf® para la amplificación de la PCR no implica su aprobación ni la exclusión de otras marcas que también puedan ser adecuadas. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que se obtienen los mismos resultados.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla patrón (concentración para cada reacción de 20 µl) se compone de los reactivos siguientes:

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Agua de grado molecular (MGW)	n/d	0,4	n/d
MasterMix 2,5× de Eppendorf®1 (polimerasa Taq de ADN, 0,06 U/µl)	2,5×	8,0	1× (Taq 0,024 U/µl)
Tampón de reacción Taq 2,5× (Mg^{2+} 4 mM, 500 µM de cada dNTP)	2,5×	8,0	1× (Mg^{2+} 1,6 mM, 200 µM de cada dNTP)
Cebador GCN	10 µM	0,8	0,4 µM
Cebador GCMR	10 µM	0,8	0,4 µM
Total parcial	-	18,0	-
ADN	-	2,0	-
Total	-	20,0	-

Los parámetros de ciclado de la PCR son: desnaturalización a 94 ºC durante 2 minutos; 39 ciclos a 94 ºC durante 30 segundos, a 64 ºC durante 30 segundos y a 72 ºC durante 1 minuto; y extensión a 72 ºC durante 10 minutos. Un producto de la PCR de 300 pb indica la presencia de ADN de *P. citricarpa*.

4.2.1.3 Información esencial sobre el procedimiento

Después de la amplificación, se combinan 10 µl de la mezcla de reacción con 2 µl de tampón de carga de ADN 6× (Promega) y se carga junto con un marcador de peso molecular (escala de ADN de 100 pb) en un gel de agarosa al 1,5 %, se separa por electroforesis, se tiñe con bromuro de etidio u otro reactivo alternativo y se observa y fotografía bajo luz UV (Sambrook *et al*., 1989).

Para garantizar el éxito de la amplificación se debe incluir ADN de una cepa de referencia de *P. citricarpa* (control positivo) como muestra adicional. También se ha de realizar la amplificación de la PCR en una muestra en la que el extracto de ADN de *P. citricarpa* se ha sustituido por el extracto de ADN de otra especie afín o en una muestra de exocarpo sano (control negativo). Para detectar la posible contaminación del reactivo y la aparición de falsos positivos, se debe sustituir una muestra por agua (control de la reacción). Es aconsejable incluir un control interno de amplificación (CIA) para verificar la inhibición.

4.2.2 Identificación de *P. citricarpa* mediante PCR en tiempo real

Se evaluó la especificidad (especificidad analítica) con la cepa de referencia CBS 111.20 de *P. citricarpa* (representativa del grupo I de secuencia de ITS para 10 aislamientos de *P. citricarpa*; Baayen *et al*., 2002), la cepa de referencia GC14 de *P. capitalensis* (representativa del grupo II de secuencia de ITS para 22 aislamientos de *P. capitalensis*; Baayen *et al*., 2002), otras 12 plagas de los cítricos (*Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Colletotrichum* spp.), *Phyllosticta artocarpina* y *Guignardia bidwellii*. Solamente *P. citricarpa* dio una reacción positiva. La sensibilidad (sensibilidad analítica; límite de detección) es de 10 fg de ADN por reacción y la sensibilidad del diagnóstico es del 100 % (Gent-Pelzer *et al.*, 2007).

4.2.2.1 Información general

El protocolo fue diseñado por Gent-Pelzer *et al*. (2007). La fuente de ácido nucleico es el micelio o las lesiones diseccionadas del fruto. El análisis está concebido para amplificar parte de la región de ITS produciendo un amplicón de 69 pb. Los oligonucleótidos cebadores utilizados son:

Cebador directo: GcF1 (5'-GGT GAT GGA AGG GAG GCC T-3')

Cebador inverso: GcR1 (5'-GCA ACA TGG TAG ATA CAC AAG GGT-3').

La sonda de hidrólisis GcP1 (5'-AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT TCA-3') está marcada en el extremo 5' con el colorante fluorescente indicador FAM (6-carboxifluoresceína) y modificada en el extremo 3' con el colorante TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) o Eclipse® Dark Quencher (Eurogentec).

Para la amplificación de la PCR se utiliza la mezcla patrón Premix Ex Taq 2× (Takara)[2], que contiene polimerasa Taq y un tampón de reacción con $MgCl_2$ y nucleótidos. A la mezcla patrón Premix Ex Taq se le añade colorante de referencia ROX (concentración 50×, Takara). En la preparación de mezclas de reacción se utiliza agua de grado molecular, que debe estar purificada (desionizada o destilada), esterilizada (mediante autoclave o filtración por un poro de 0,45 µm) y sin nucleasas. En el caso de la PCR en tiempo real, la amplificación se realiza utilizando un termociclador.

4.2.2.2 Métodos

Extracción y purificación de ácido nucleico

Se extrae ADN de muestras de micelio (0,5 cm de diámetro) tomadas de los bordes de una colonia cultivada en CHA (véase el apartado 4.1.1) a 22 ºC en la oscuridad o de lesiones del fruto. Las lesiones se diseccionan de la cáscara, eliminando en la medida de lo posible todo el albedo circundante y el tejido de la cáscara. Las muestras de micelio o las lesiones se cortan en pequeños trozos y se colocan en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con un tapón plano y ajuste de seguridad, en el que se coloca una esfera de acero inoxidable (3,2 mm de diámetro) y 125 µl de tampón de extracción (tampón fosfato salino 0,02 M (PBS), Tween 20 al 0,5 %, polivinilpirrolidona (PVP) al 2 %, albúmina de suero bovino al 0,2 %). El tubo se coloca en un agitador de esferas (bead beater) y se mantiene durante 80 segundos a 5 000 r.p.m. La mezcla se centrifuga durante 5 segundos a velocidad máxima (16 100 *g*) en una microcentrífuga y para la extracción del ADN se utilizan 75 µl del sobrenadante obtenido. El ADN se puede extraer con kits de extracción disponibles en el mercado, siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la solución de ADN es de 50 µl. El ADN se purifica de nuevo en columnas de centrífuga que se han rellenado con PVP. Las columnas se preparan rellenando columnas de separación Axygen Multi-Spin (Dispolab) con polivinilpolipirrolidona (PVPP) de 0,5 cm, que se coloca en un tubo de reacción vacío y se lava dos veces con 250 µl de MGW, centrifugando la columna durante 5 minutos a 4 000 *g*. La suspensión de ADN se pasa a una columna de PVPP y se centrifuga durante 5 minutos a 4 000 *g*. La fracción no retenida se utiliza como material para el análisis de PCR. El ADN purificado se puede utilizar de manera inmediata o conservar a 4 ºC durante una noche o a -20 ºC para períodos más prolongados. La PVP se utiliza en el tampón de extracción como componente soluble. La PVPP es PVP reticulada y se utiliza como material de filtración insoluble.

[2] La utilización en este protocolo de diagnóstico de la marca Takara para la mezcla patrón Premix Ex Taq 2× no implica su aprobación ni la exclusión de otras marcas que también puedan ser adecuadas. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que se obtienen los mismos resultados.

Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla patrón (concentración para cada reacción de 30 µl) se compone de los reactivos siguientes:

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Agua de grado molecular (MGW)	n/d	13,1	n/d
Mezcla patrón Premix Ex Taq 2× (Takara)[2]	2×	15,0	1×
Cebador GcF1	50 µM	0,15	0,25 µM
Cebador GcR1	50 µM	0,15	0,25 µM
Sonda GcP1	5 µM	0,6	0,10 µM
Total parcial	-	29,0	-
ADN	-	1,0	-
Total	-	30,0	-

Se pueden añadir, si procede, 0,6 µl del colorante de referencia ROX 50×; en ese caso se utilizan 12,5 µl de agua de grado para PCR.

Los parámetros de ciclado de la PCR son 95 ºC durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 ºC durante 15 segundos, y 60 ºC durante 1 minuto. El límite de 40 ciclos se obtuvo utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7700 o 7900 (Applied Biosystems) y usando los materiales y reactivos antes descritos. Hay que señalar que:

- la curva de amplificación debería ser exponencial
- una muestra se considera positiva si produce un valor del ciclo umbral (Ct) <40, siempre que los controles de contaminación sean negativos
- una muestra se considera negativa si produce un valor del Ct ≥40, siempre que los controles del análisis y de la inhibición de la extracción sean positivos.

El valor límite del ciclo se debe verificar en cada laboratorio al realizar la prueba por primera vez.

4.2.2.3 Información esencial sobre el procedimiento

Para garantizar el éxito de la amplificación se debe incluir ADN de una cepa de referencia de *P. citricarpa* (control positivo) como muestra adicional. La amplificación de la PCR se debe realizar también sobre una muestra en la que el extracto de ADN de *P. citricarpa* se ha sustituido por el extracto de ADN de otra especie afín (por ejemplo, *C. citriasiana*) o en una muestra de exocarpo sano (control negativo). Para detectar una posible contaminación del reactivo y la aparición de falsos positivos, se debe sustituir una muestra por agua (control de la reacción).

A fin de comprobar la aparición de falsos negativos en las reacciones a causa de la inhibición de la reacción de amplificación, se pueden añadir a las mezclas de reacción 12,5 fg de un CIA, un cebador directo del CIA 75 nM (5'-TGG CCC TGT CCT TTT ACC AG-3'), un cebador inverso del CIA 75 nM (5'-TTT TCG TTG GGA TCT TTC GAA-3'), y una sonda de hidrólisis MGB del CIA 50 nM (5'-ACA CAA TCT GCC-3') marcada con el colorante fluorescente indicador VIC™ (Eurogentec) y el colorante amortiguador Eclipse® Dark Quencher (Eurogentec).

4.2.3 Identificación de *P. citricarpa* mediante secuenciación de los ITS

4.2.3.1 Información general

La identidad de las muestras positivas obtenidas en la PCR convencional se puede confirmar mediante secuenciación (Baayen *et al*., 2002). A continuación se describe el método para la secuenciación de las regiones 1 y 2 del ARN ribosómico del hongo.

Los oligonucleótidos cebadores utilizados son:

Cebador directo: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

Cebador inverso: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al*., 1990).

4.2.3.2 Métodos

Extracción y purificación de ácido nucleico

El ADN se debe extraer de una muestra de 1 cm^2 tomada de un cultivo puro del aislamiento de prueba. Se utiliza un kit de extracción de ADN apropiado o se extrae siguiendo un método más tradicional, como el descrito en Hughes *et al*. (2000). El ADN extraído se debe conservar a 4 ºC para su uso inmediato o a -20 ºC si la prueba no se va a realizar el mismo día.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El volumen total de la reacción para cada PCR es de 50 µl y está formado por los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración de trabajo	Volumen por reacción (µl)	Concentración final
Agua de grado molecular (MGW)	n/d	37,5	n/d
Tampón de reacción de la PCR 10× (+15 mM $MgCl_2$) (Roche)[3]	2×	5,0	1× (Taq 0,024 U/µl)
dNTP	10 mM (cada una)	4,0	0,8 mM (cada una)
Cebador ITS1	10 µM	0,6	0,12 µM
Cebador ITS4	10 µM	0,6	0,12 µM
ADN polimerasa Taq (Roche)[3]	5 U/µl	0,3	0,03 U/µl
Total parcial	-	48,0	-
ADN	-	2,0	-
Total	-	50,0	-

Los parámetros de ciclado de la PCR son 94 ºC durante 30 segundos; 40 ciclos de 94 ºC durante 15 segundos, 55 ºC durante 60 segundos y 72 ºC durante 30 segundos; y 72 ºC durante 5 minutos. El tamaño del amplicón es de 550 pb (Baayen *et al*., 2002).

Secuenciación de los amplicones

La mezcla amplificada (5 µl de ella) se hace pasar por un gel de agarosa al 1,5 % para verificar las reacciones positivas de la prueba. Los 45 µl restantes de las reacciones positivas de la prueba se purifican utilizando un kit de purificación de la PCR adecuado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realiza la secuenciación con el cebador directo ITS1 y el cebador inverso ITS4.

4.2.3.3 Información esencial sobre el procedimiento

Amplificación y análisis

El ADN extraído se debería descongelar, en caso necesario. Se debería preparar suficiente mezcla de reacción para analizar por lo menos una muestra del aislamiento desconocido, un control positivo que contenga ADN amplificable y un control negativo con agua en lugar de ADN. Las muestras se analizan por resolución en un gel de agarosa al 1,5 %. Las secuencias de consenso para las muestras del análisis (excluidas las secuencias de los cebadores) se comparan con una cepa confirmada para el

[3] La utilización en este protocolo de diagnóstico de la marca Roche para el tampón de reacción de la PCR y la ADN polimerasa Taq no implica su aprobación ni la exclusión de otras marcas que también puedan ser adecuadas. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que se obtienen los mismos resultados.

ex-epitipo de *P. citricarpa* CBS 127454 (número de registro de GenBank: JF343583) en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). El nivel de identificación debería estar entre 99 % y 100 %.

5. Registros

Se deben mantener los registros y las evidencias detallados en la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En los casos en los que las partes contratantes puedan verse afectadas negativamente por los resultados del diagnóstico, los registros y las evidencias de los resultados (en particular los cultivos, las placas, las fotografías de las estructuras fúngicas, las fotografías de los síntomas y signos, las fotografías de los extractos de ADN y los geles de separación) se deberían conservar durante un año por lo menos.

6. Puntos de contacto para obtener información adicional

Se puede obtener información adicional sobre *P. citricarpa* y los métodos para su detección e identificación en las siguientes fuentes (por orden alfabético):

ARC-Plant Protection Research Institute, Biosystematics Division: Mycology, Private Bag x134, Queenswood 0121, Sudáfrica (Dra. Mariette Truter; tel.: +27 12 8088281; fax: +27128088297; correo electrónico: truterm@arc.agric.za).

Plant Research International, PO Box 26, 6700 AA Wageningen, Países Bajos (Dr. Peter J.M. Bonants; tel.: +31 31 7480648; fax +31 31 7418094; correo electrónico: peter.bonants@wur.nl).

Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil (Dr. Marcel B. Spósito; tel.: +55 19 34294190 ext. 4190; fax +55 19 34294414; correo electrónico: mbsposito@usp.br).

University of Florida, Citrus Research and Education Center (CREC), 700 Experiment Station Rd, Lake Alfred, FL 33850, Estados Unidos (Dr. Lavern W. Timmer; tel.: +1 863 9561151; fax: +18639564631; correo electrónico: lwtimmer@ufl.edu).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) a través de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El presente protocolo fue redactado inicialmente por:

Irene Vloutoglou, Benaki Phytopathological Institute, 8, St Delta St, GR-145 61 Kifissia, Atenas, Grecia (tel.: +30 210 8180231; fax: +302108077506; correo electrónico: i.vloutoglou@bpi.gr).

Dr. Johan Meffert, Plant Protection Service, 15, Geertjesweg, 6706 EA Wageningen, Países Bajos (tel.: +31 417 496837; fax: +31 317 421701; correo electrónico: j.p.meffert@minlnv.nl).

Dr. Luis E. Díaz, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Departamento de Micología, Av. Millán 4703, CP 12900, Montevideo, Uruguay (tel.: +598 2 3043992; fax: +59823043992; correo electrónico: ldiaz@mgap.gub.uy).

8. Referencias

La presente norma refiere a las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF). Las NIMF se encuentran disponibles en el Portal Fitosanitario Internacional (PFI) en https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms.

Aa, H.A. van der. 1973. Studies in *Phyllosticta* I. S*tudies in Mycology*, 5: 1-110.

Agostini, J.P., Peres, N.A., Mackenzie, S.J., Adaskaveg, J.E. & Timmer, L.W. 2006. Effect of fungicides and storage conditions on postharvest development of citrus black spot and survival of *Guignardia citricarpa* in fruit tissues. *Plant Disease*, 90: 1419-1424.

Aguilar-Vildoso, C., Baldini, J., Feichtenberger, E., de Goes, A. & Spósito, M. 2002. *Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos Citros*. Brasilia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimiento, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Projeto CE-MERCOSUL ALA 93/143. 59 páginas.

Baayen, R.P., Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carroll, G.C., van der Aa, H.A., de Weerdt, M., van Brouwershaven, I.R., Schutte, G.C., Maccheroni Jr, W., Glienke de Blanco, C. & Azevedo, J.L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92: 464-477.

Baldassari, R.B., Reis, R.F. & de Goes, A. 2006. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. *Fitopatologia Brasiliera*, 31: 337-341.

Benson, A.H. 1895. Some fruit pests: Black spot of the orange. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 6: 249-251.

Bonants, P.J.M., Carroll, G.C., de Weerdt, M., van Brouwershaven, I.R. & Baayen, R.P. 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the Citrus Black Spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 503-513.

CABI. 2011. *Guignardia citricarpa. Crop Protection Compendium*, 2011 edn. Wallingford, Reino Unido, CAB International. Disponible en http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=26154&loadmodule=datasheet&page=481&site=144 (última consulta: 19 de agosto de 2014).

CABI/EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 1998. *Guignardia citricarpa*. *Distribution maps of quarantine pests for Europe*, no. 204. Wallingford, Reino Unido, CAB International.

De Holanda Nozaki, M. 2007. Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* EM *Citrus* spp. Tesis doctoral, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil. 85 páginas.

EPPO/CABI. 1997. *Guignardia citricarpa. En* I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn, pp. 773–781. Wallingford, Reino Unido, CAB International. 1440 páginas.

FUNDECITRUS. 2005. Manual de Pinta Preta. Brazil, Araraquara: Brasil, Fundo de Defesa da Citricultura. 10 pp. (Boletim Técnico).

Gams, W., Hoekstra, E.S. & Aptroot, A. 1998. CBS course of mycology, 4th edn. Baarn/Delft, Países Bajos, Centraal Bureau voor Schimmelcultures. 165 páginas.

Gent-Pelzer, M.P.E. van, van Brouwershaven, I.R., Kox, L.F.F. & Bonants, P.J.M. 2007. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citrus fruit. Journal of Phytopathology, 155: 357-363.

Glienke, C., Pereira, O.L., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunnington, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia*, 26: 47-56.

Goes, A. de, Baldassari, R.B., Feichtenberger, E., Aguilar-Vildoso, C.I. & Spósito, M.B. 2000. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. En Abstracts of the 9th Congress of the International Society of Citriculture, pág. 145. Orlando, FL, Estados Unidos, University of Florida.

Goes, A. de. 2001. Mancha preta dos Citros: Situação atual e perspectivas futuras. Ciência e Prática, Bebedouro, 20 de diciembre de 2001, págs 5-7.

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. & Pegler, D.N. 1995. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 8ª ed. Wallingford, Reino Unido, CAB International. 650 páginas.

Hughes, K.J.D., Inman, A.J. & Cooke, D.E.L. 2000. Comparative testing of nested PCR-based methods with bait-plant tests for detecting *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* in infected strawberry roots from fruit crops in the UK. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 30: 533-538.

Kiely, T.B. 1949a. Preliminary studies on Guignardia citricarpa n. sp., the ascigerous stage of Phoma citricarpa McAlp., and its relation to black spot of citrus. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 73: 249-292.

Kiely, T.B. 1949b. Black spot of citrus. The Agricultural Gazette of New South Wales, 60: 17-20.

Kiely, T.B. 1960. Speckled blotch of citrus. The Agricultural Gazette of New South Wales, 71: 474-476.

Klimyuk, V.I., Carroll, B.J., Thomas, C.M. & Jones, J.D. 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis: technical advance. Plant Journal, 3: 493-494.

Kotzé, J.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. Plant Disease, 65: 945-950.

Kotzé, J.M. 1996. History and epidemiology of citrus black spot in South Africa. *En* International Society of Citriculture. *Proceedings of the 8th International Citrus Congress* (Sun City, Sudáfrica, 1966), págs.1296–1299. Orlando, FL, Estados Unidos, ISC.

Kotzé, J.M. 2000. Black spot. *En* L.W. Timmer, S.M. Garnsey & J.H. Graham, eds. *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd edn, págs. 23–25. Saint Paul, MN, Estados Unidos, APS Press. 128 páginas.

Lee, Y.S. & Huang, C.S. 1973. Effect of climatic factors on the development and discharge of ascospores of the citrus black spot fungus. *Journal of Taiwan Agricultural Research*, 22: 135-144.

Meyer, L., Sanders, G.M., Jacobs, R. & Korsten, L. 2006. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Disease*, 90: 97-101.

Meyer, L., Jacobs, R., Kotzé, J.M., Truter, M. & Korsten, L. 2012. Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. *South African Journal of Science*, 108.

NAPPO (Organización Norteamericana de Protección a las Plantas). 2010. Phytosanitary Alert System: Confirmation of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Florida, United States. NAPPO. Se puede consultar en http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=421 (consultado el 26/09/2011).

OEPP/EPPO 2003. Diagnostic protocols for regulated pests: *Guignardia citricarpa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 33: 271-280.

Peres, N.A., Harakava, R., Caroll, G.C., Adaskaveg, J.E. & Timmer, L.W. 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Disease*, 91: 525-531.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schubert, T.S., Dewdney, M.M., Peres, N.A., Palm, M.E., Jeyaprakash, A., Sutton, B., Mondal, S.N., Wang, N.-Y., Rascoe, J. & Picton, D.D. 2012. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. *Plant Disease*, 96: 1225.

Snowdon, A.L. 1990. Black spot. *En* A.L. Snowdon, ed. 2014-08-19, *Vol. I. General Introduction and fruits*, págs. 62–63. Londres, Reino Unido, Wolfe Scientific Ltd. 302 páginas.

Spósito, M.B. 2003. Dinâmica temporal e especial da mancha preta (*Guignardia citricarp*a) e quantifição dos danos causados à cultura dos citros. Tesis doctoral, Universidade de São Paulo, Brasil. 112 páginas.

Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A. & Hau, B. 2008. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. *Plant Pathology*, 57: 103-108.

Spósito, M.B., Amorim, L., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Felippe, M.R. & Czermainski, A.B.C. 2011. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. *Crop Protection*, 30: 1546-1552.

Stringari, D., Glienke, C., Christo, D., Maccheroni Jr, W. & Azevedo, J.L. 2009. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52: 1063-1073.

Sutton, B.C. & Waterston, J.M. 1966. *Guignardia citricarpa.* CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 85. Wallingford (Reino Unido), CAB International.

Timmer, L.W. 2004. Evaluating the risks of introduction of citrus black spot into the U.S. En *2004 Annual Report*, págs. 36–38. Visalia, CA, Estados Unidos, California Citrus Research Board.

Truter, M., Labuschagne, P.M., Kotzé, J.M., Meyer, L. & Korsten, L. 2007. Failure of *Phyllosticta citricarpa* pycnidiospores to infect Eureka lemon leaf litter. Australasian Plant Pathology, 36: 87-93.

Wang, X., Chen, G., Huang, F., Zhang, J., Hyde, K.D. & Li, H. 2012. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity*, 52: 209-224.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, eds. *PCR protocols:* A guide to methods and applications, págs. 315–322. San Diego, CA, Academic Press. 482 páginas.

Wulandari, N.F., To-anun, C., Hyde, K.D., Duong, L.M., de Gruyter, J., Meffert, J.P., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity*, 34: 23-39. Se puede consultar en http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-2.pdf (consultado el 19/8/2014).

9. Figuras

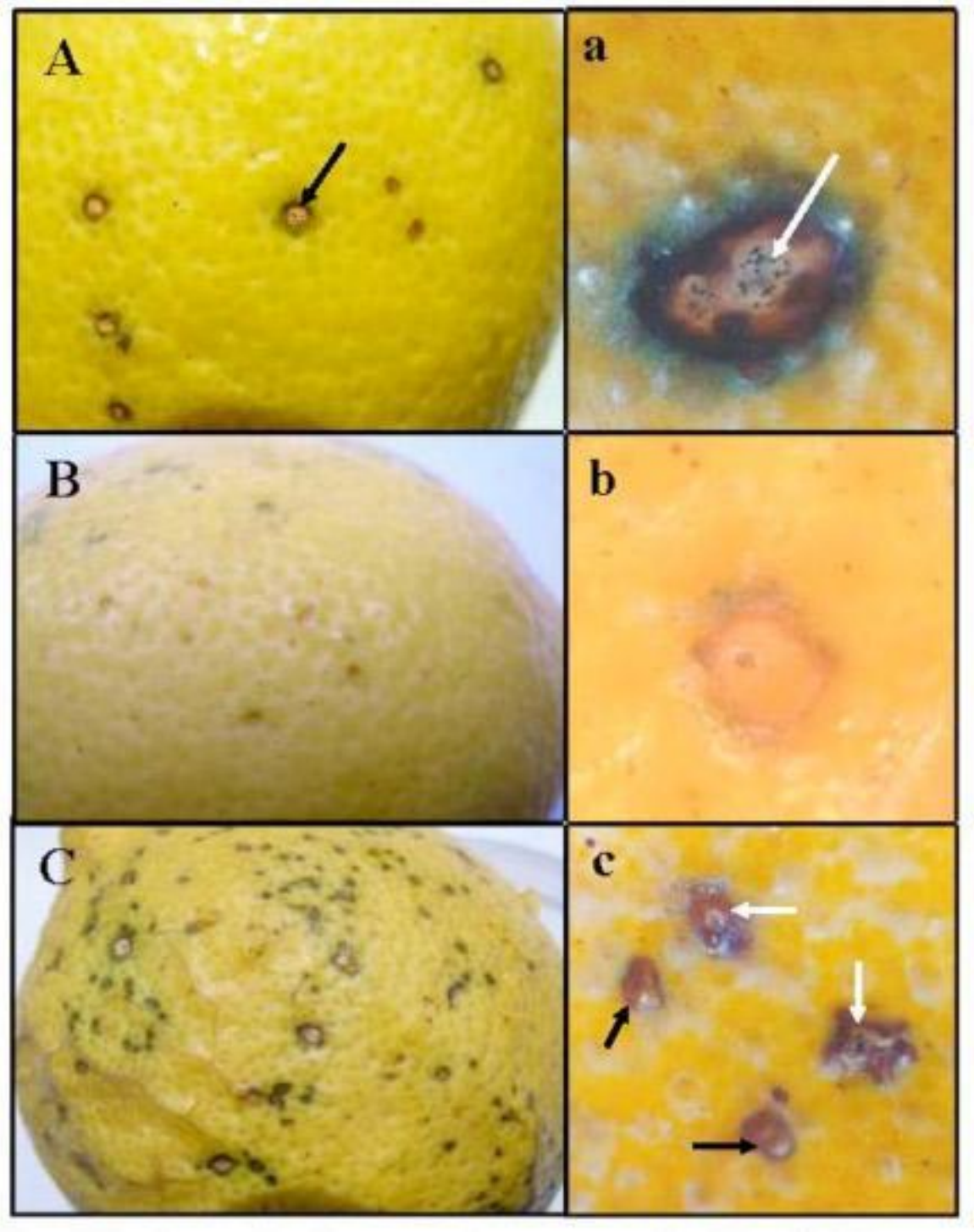

Figura 1. Síntomas de mancha dura y mancha moteada producidos por *Phyllosticta citricarpa* en frutos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y limón (*Citrus limon*): A, a) lesiones de mancha dura en naranja dulce, con la presencia en las lesiones más grandes de picnidios del anamorfo *Phyllosticta citricarpa* (flechas); B) lesiones de mancha moteada en limón; b) lesiones de mancha moteada en naranja dulce (las lesiones están ligeramente hundidas en el centro y no tienen picnidios); C) lesiones de mancha dura y moteada en limón; c) lesiones de mancha moteada (flechas negras) y etapa intermedia entre las lesiones de mancha moteada y dura con picnidios (flechas blancas) en naranja dulce.

Fotografías cedidas por E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brasil.

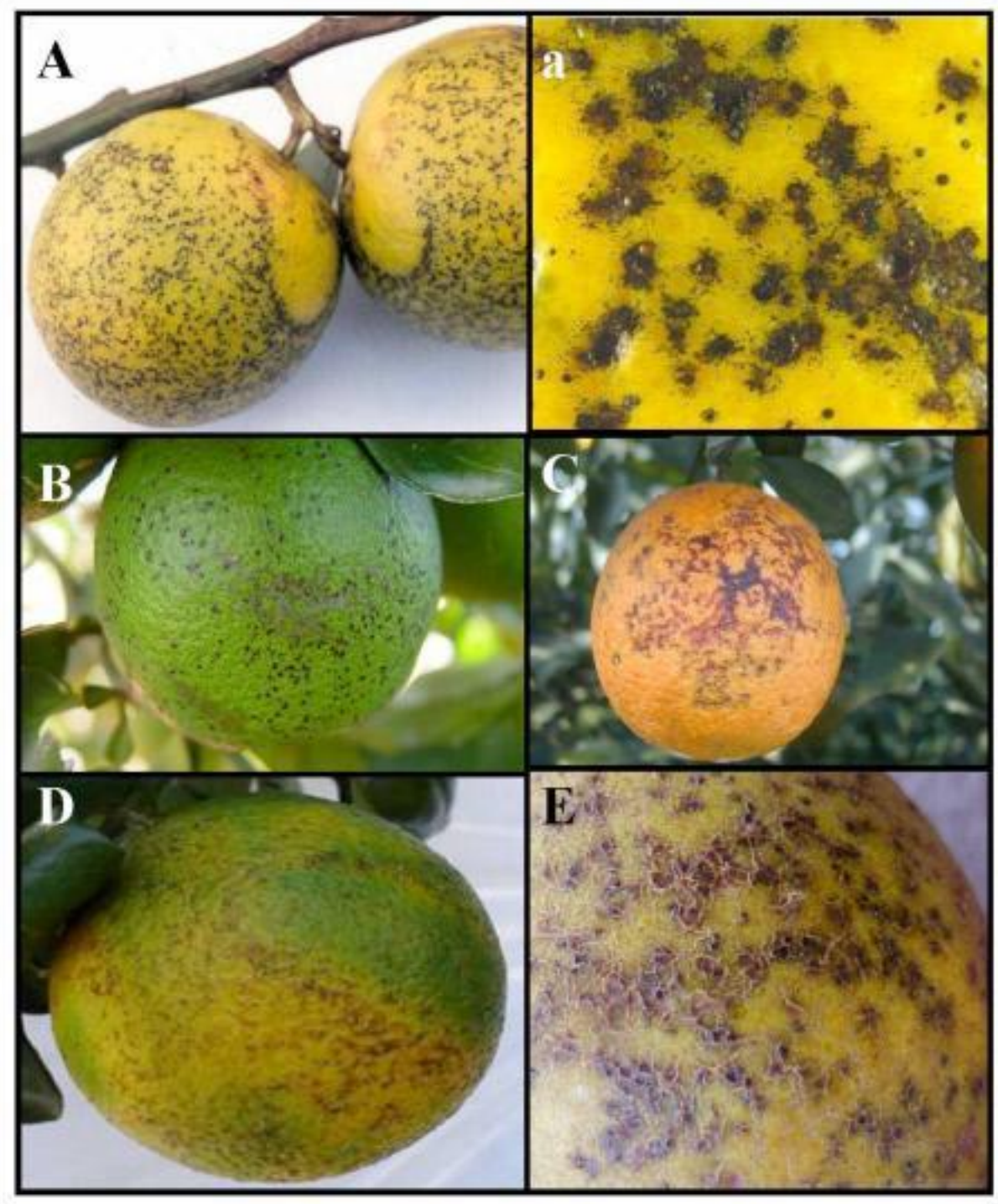

Figura 2. Síntomas de falsa melanosis, mancha virulenta, mancha reticulada y mancha agrietada producidos por *Phyllosticta citricarpa* en frutos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y limón (*Citrus limon*): A) lesiones de falsa melanosis en naranja dulce madura; a) lesiones de falsa melanosis rodeadas de puntos oscuros en naranja dulce madura; B) lesiones de falsa melanosis en una naranja dulce verde; C) lesiones de mancha virulenta en naranja dulce (las lesiones están hundidas y penetran profundamente en el albedo); D) síntomas de mancha reticulada en una naranja dulce verde; E) lesiones de mancha agrietada en naranja dulce (las lesiones están ligeramente elevadas, agrietadas, con bordes irregulares y sin picnidios).

Fotografías cedidas por FUNDECITRUS (A, B, C, D, E) y E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brasil (a).

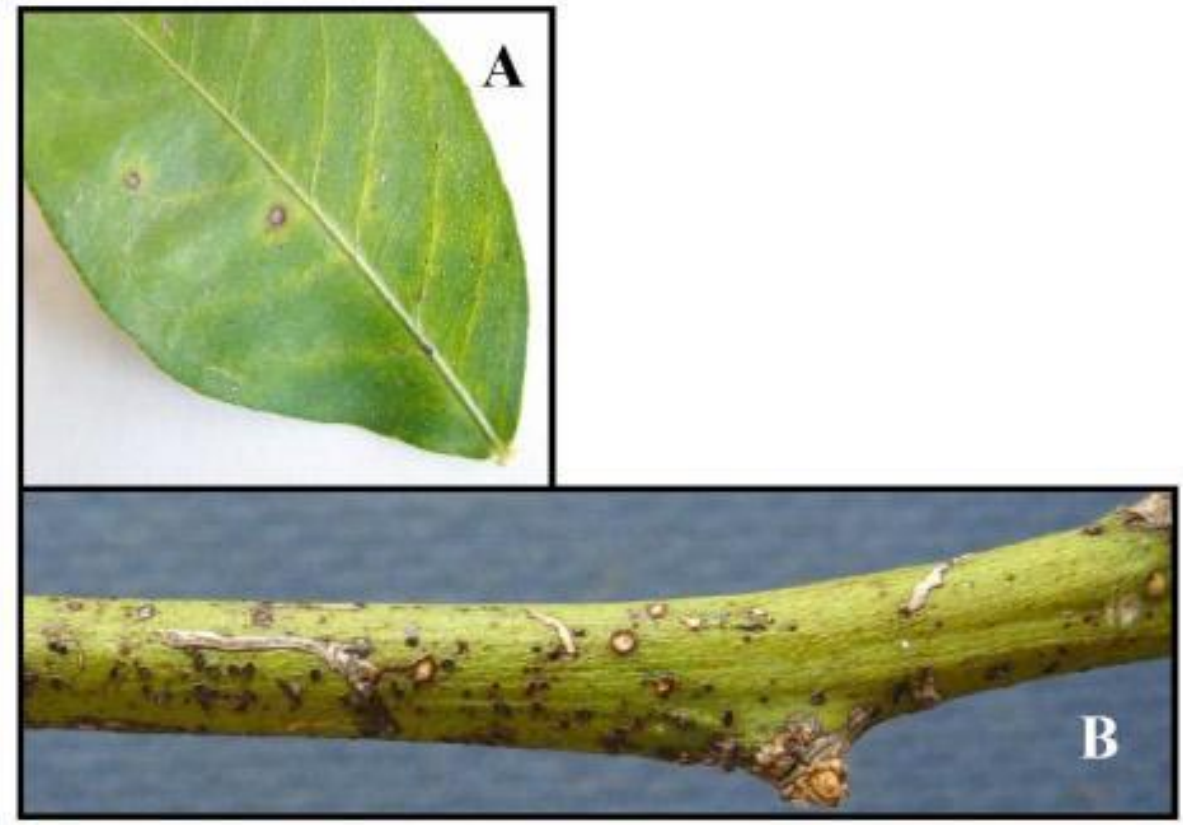

Figura 3. Síntomas de mancha negra de los cítricos producidos por *Phyllosticta citricarpa* en hojas (A) y ramas (B) de limonero *(Citrus limon*).

Fotografías cedidas por E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brasil (A) y M. Truter, Plant Protection Research Institute, Agricultural Research Council, Pretoria, Sudáfrica (B).

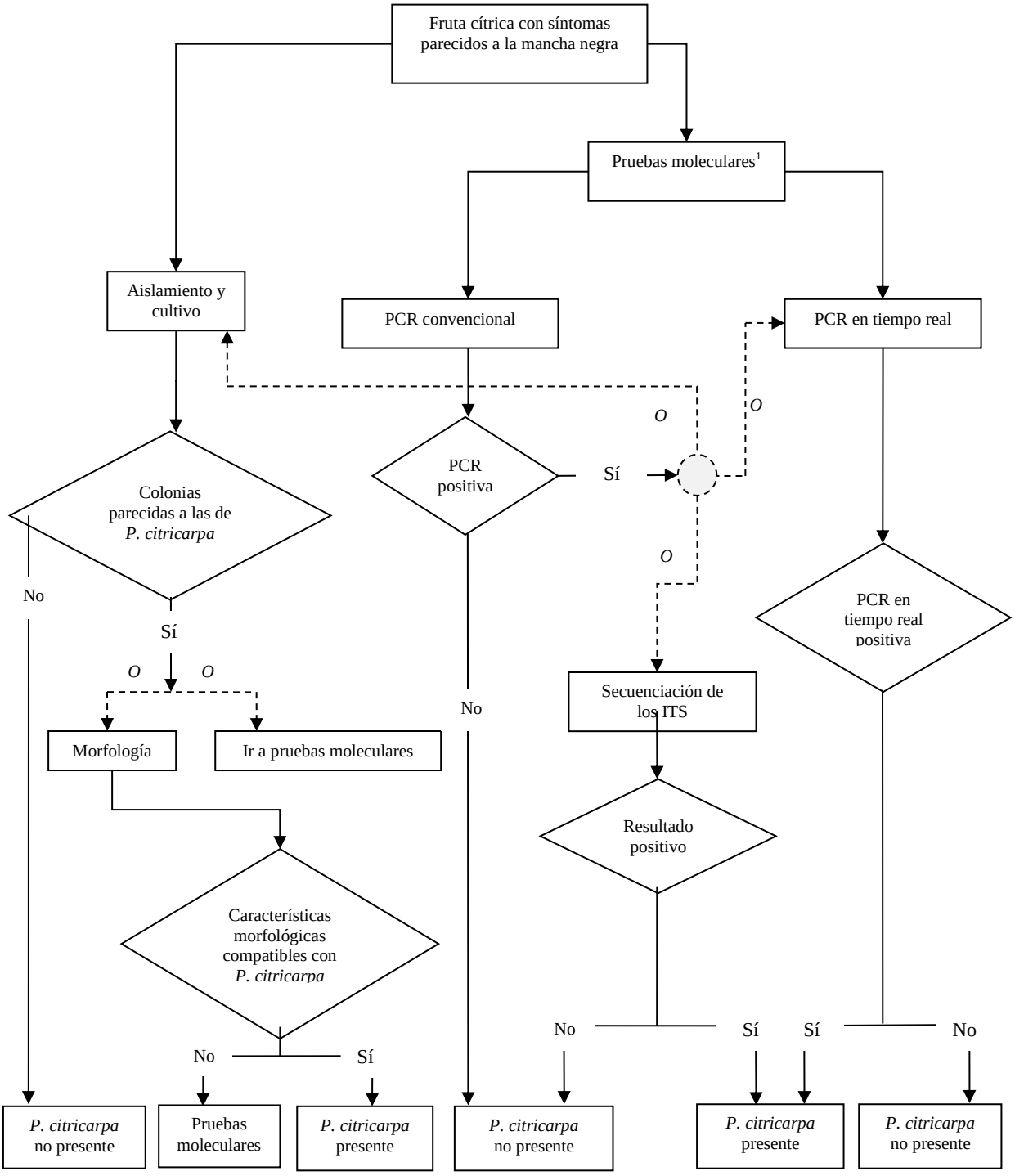

Figura 4. Diagrama de flujo para el diagnóstico de *Phyllosticta citricarpa* en fruta cítrica.

[1]Los análisis moleculares se han validado para la identificación del organismo en cultivos puros y en las lesiones de los frutos, pero no en otros materiales vegetales (por ejemplo hojas o ramas). ITS, espaciador de transcripción interna; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

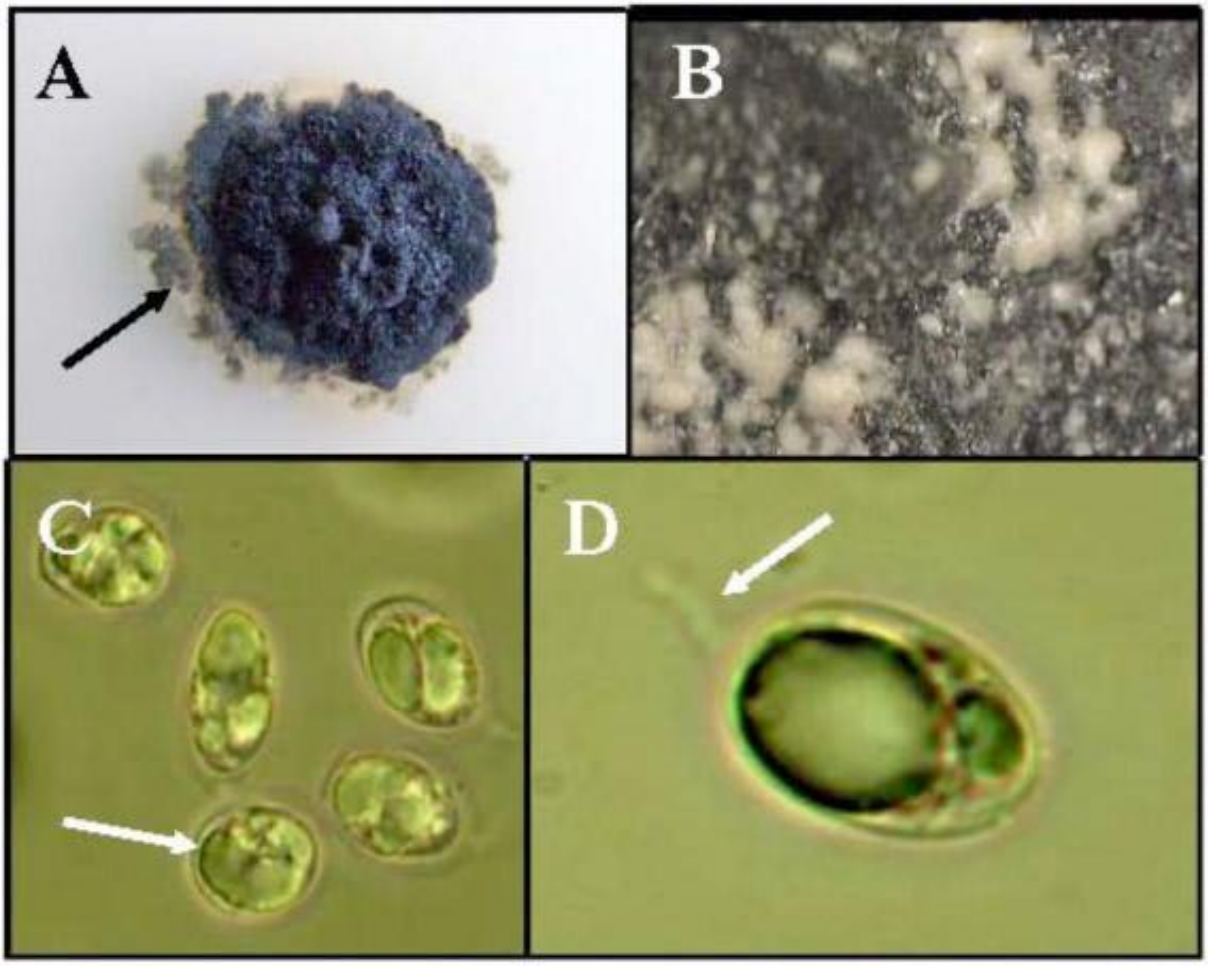

Figura 5. Características de las colonias y morfología de los conidios de *Phyllosticta citricarpa*: A) colonia con borde irregular rodeada de una zona translúcida de micelio sumergido incoloro (flechas) después de 30 días de crecimiento en papa-dextrosa-agar (pH 5,5) a 25 ºC y con un fotoperíodo de 12 horas; B) mucílago conidial exudando de los picnidios maduros; C, D) conidios con una cubierta mucoide fina (C, flecha) y un apéndice subulado incoloro (D, flecha, aumento de 1 000× con aceite de inmersión).

Fotografías cedidas por L.E. Díaz, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay.

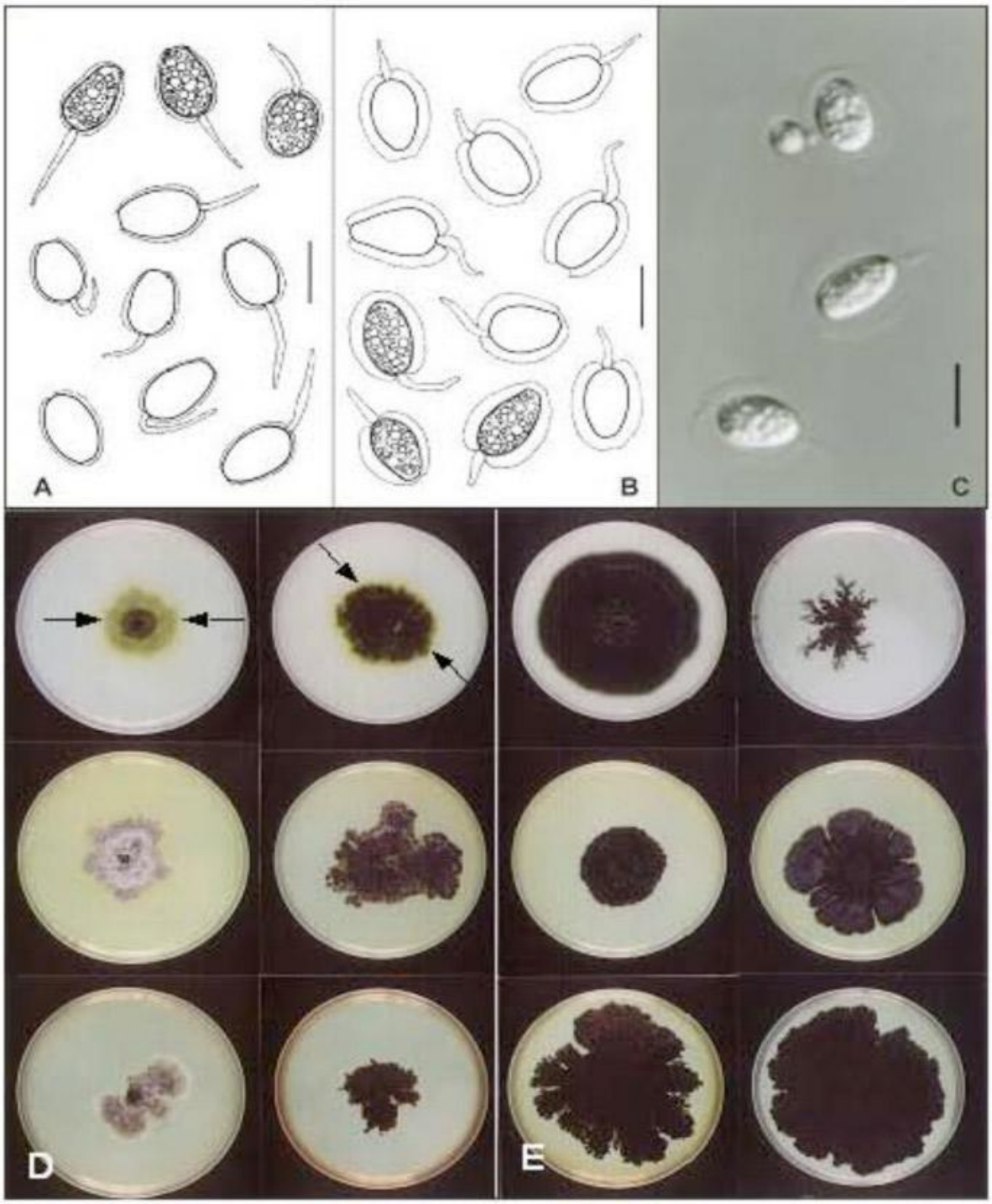

Figura 6. Morfología de los conidios y características culturales de *Phyllosticta citricarpa* y *Phyllosticta capitalensis*: A) conidios de *P. citricarpa* con una cubierta mucoide fina (<1,5 µm); B, C) conidios de *P. capitalensis* con una cubierta mucoide gruesa (>1,5 µm) (barra de escala = 10 µm) (la fotografía C se tomó en un microscopio óptico con contraste de interferencia diferencial); D, E) colonias de *P. citricarpa* (D) y *P. capitalensis* (E) después de siete días de crecimiento en agar-harina de avena (fila superior), agar-extracto de malta (fila media) y agar-decocción de cerezas (fila inferior) (obsérvese la producción de un pigmento amarillo alrededor de la colonia de *P. citricarpa* cultivada en agar-harina de avena (D, flechas) y la ausencia de este pigmento en los cultivos de *P. capitalensis* obtenidos en el mismo medio (E)).

Fotografías cedidas por G. Verkley, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Países Bajos (A, B, C) y W. van Lienden, Plant Protection Service, Wageningen, Países Bajos (D, E).

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

Esta historia de la publicación se refiere sólo a la versión española. Para la historia completa de la publicación, consulte la versión en inglés de la norma.

2006-03 La CMF-1 añadió este tópico al programa de trabajo Hongos y organismos similares a los hongos, 2006-006.

2004-11 El CN añadió el tema *Guignardia citricarpa* (2004-023).

2011-11 Aprobado por el CN para consulta a los miembros mediante decisión por medios electrónicos (2011_eSC_Nov_06).

2012-07 Consulta a los miembros.

2013-03 Se cambió el título por *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa en frutas (2004-023).

2013-07 El GTPD revisó el texto y lo remitió al CN a fin de que lo aprobara para su adopción (2013_eTPDP_Jun_01).

2013-10 Aprobación del CN por medios electrónicos para el período de notificación de 45 días (2013_eSC_Nov_13).

2014-12/01 Período de notificación del PD; se recibió una objeción formal.

2014-02/03 El GTPD revisó el texto en una reunión virtual.

2014 Aprobación del CN para el período de notificación de 45 días (2014_eSC_Nov_01).

2014-07/08 Período de notificación del PD.

2014-08 El CN adoptó el PD en nombre de la CMF.

NIMF 27. **Anexo 5** *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa en frutas (2014). Roma, CIPF, FAO.

2015-09 La Secretaría de la CIPF incorporó las enmiendas a tinta en conformidad con el procedimiento de revocación de las normas aprobado por la CMF-10 (2015).

2016-01 La secretaría de la CIPF hizo un cambio editorial menor.

2016-04 La CMF-11 ha tomado nota de los cambios editoriales efectuados en español por el grupo de examen de los idiomas.

Última actualización de la historia de la publicación: 2016-08.

CIPF

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad vegetal que tiene como objetivo proteger las plantas cultivadas y silvestres previniendo la introducción y propagación de plagas. Los viajes y el comercio internacional hoy son más abundantes que nunca antes. En el desplazamiento de personas y mercancías por todo el mundo, los acompañan organismos que representan riesgos para las plantas.

La organización

- Hay más de 180 partes contratantes de la CIPF
- Cada parte contratante tiene una organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) y un contacto oficial de la CIPF
- Nueve organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) obran para facilitar la aplicación de la CIPF en los países
- La CIPF se enlaza con las organizaciones internacionales pertinentes a fin de contribuir a la creación de capacidad regional y nacional
- La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proporciona la Secretaría de la CIPF

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia
Tel. +39 06 5705 4812 - Fax: +39 06 5705 4819
Correo electrónico: ippc@fao.org - Web: www.ippc.int