

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Xanthomonas fragariae* Y SU SEVERIDAD EN GENOTIPOS DE FRESA (*Fragaria* × *ananassa* Duch)

Xanthomonas fragariae GENETIC VARIABILITY AND ITS SEVERITY ON STRAWBERRY GENOTYPES (*Fragaria* × *ananassa* Duch)

Noemí Rivera-Zabala¹, Daniel L. Ochoa-Martínez¹, Reyna I. Rojas-Martínez¹, Douglas Rodríguez-Martínez², Sergio Aranda-Ocampo^{1*}, José M. Zapién-Macías²

¹Fitosanidad, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México. (saranda@colpos.mx). ²Investigación Aplicada-Driscoll's México. 45050. Avenida Moctezuma 144, Piso 1. Colonia Ciudad del Sol, Zapopan, Jalisco.

RESUMEN

Xanthomonas fragariae es el agente causal de la mancha angular de la hoja en fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch) y es un microorganismo sujeto a cuarentena para la movilización y transporte de material vegetal de propagación en varios países. En México, la información sobre la diversidad genética del patógeno y su severidad en variedades comerciales es desconocida. Este estudio tuvo como objetivo conocer la variabilidad genética de *X. fragariae* y evaluar su severidad en diferentes materiales genéticos de fresa. Para ello se realizó un análisis filogenético con secuencias parciales de los genes *hrp* y *gyrB* de 14 aislamientos de *X. fragariae* recolectados en localidades productoras de los estados de Michoacán, Jalisco y Puebla, México. El árbol filogenético mostró similitud de 99 % entre los aislamientos analizados. Con el propósito de contar con genotipos de fresa, con resistencia a *X. fragariae* para uso comercial y en programas de mejoramiento genético, se inoculó por inyección y aspersión una suspensión de *X. fragariae* en dos variedades comerciales y cinco genotipos y se evaluó la severidad de los síntomas mediante una escala diagramática. Los genotipos de fresa FragLa y FragMa tuvieron los valores menores de severidad. Este es el primer estudio sobre la variabilidad genética de *X. fragariae* y de su severidad en genotipos de fresa en México.

Palabras clave: *Xanthomonas fragariae*, *Fragaria* × *ananassa*, *hrp*, *gyrB*, escala diagramática de severidad.

ABSTRACT

Xanthomonas fragariae is the causative agent of the angular leaf spot of strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch). This microorganism is subject to quarantine for the mobilization and transport of propagation plant material in several countries. There is no information about the pathogen's genetic diversity and its severity on commercial varieties in Mexico. The objective of this study was to find out *X. fragariae*'s genetic variability and evaluate its severity on different strawberry genetic materials. To achieve this, a phylogenetic analysis was carried out with partial sequences of the *hrp* and *gyrB* genes from 14 *X. fragariae* isolates collected from production locations in the Mexican states of Michoacán, Jalisco, and Puebla. The phylogenetic tree showed 99 % similarity among the isolates analyzed. In order to obtain *X. fragariae*-resistant strawberry genotypes, for commercial use and in genetic improvement programs, a *X. fragariae* suspension was inoculated, injected and sprayed, in two commercial varieties and five genotypes. The symptom severity was evaluated using a diagrammatic scale. FragLa and FragMa strawberry genotypes showed the lowest severity values. This is the first study in Mexico about the *X. fragariae*'s genetic variability and its severity on strawberry genotypes.

Key words: *Xanthomonas fragariae*, *Fragaria* × *ananassa*, *hrp*, *gyrB*, diagrammatic severity scale.

INTRODUCTION

The angular leaf spot caused by *Xanthomonas fragariae* (Kennedy and King, 1962) is a disease that affects strawberry crops (*Fragaria* × *ananassa* Duch) reducing the yield, especially when the bacteria infects the

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2016. Aprobado: octubre, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 329-341. 2017.

INTRODUCCIÓN

La mancha angular de la hoja ocasionada por *Xanthomonas fragariae* (Kennedy y King, 1962) es una enfermedad del cultivo de la fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch) que reduce el rendimiento, principalmente cuando la bacteria infecta el cáliz (Wyenandt y Nitzsche, 2013), ocasiona su decoloración y la pérdida de su valor comercial (Roberts *et al.*, 1997). La infección bacteriana es sistémica y está sujeta a cuarentena en diversos países porque pueden ser asintomáticas, lo cual favorece el movimiento de material vegetativo infectado a largas distancias (CABI/EPPO, 2015; Koike *et al.*, 2005). En México, el cultivo de fresa tiene importancia socioeconómica y los principales estados productores son Michoacán, Baja California, Guanajuato y Jalisco (SIAP, 2014). *Xanthomonas fragariae* se reportó por primera vez en Michoacán en 2014 (Fernández-Pavía *et al.*, 2014). Pero no hay estudios sobre la variabilidad genética entre cepas de este patógeno en las zonas productoras de fresa en México. El conocimiento de la variabilidad genética de la bacteria o de su epidemiología puede aportar herramientas importantes para generar estrategias eficientes de manejo de la enfermedad.

El análisis filogenético de los genes *hrp* y *gyrB* se utiliza para conocer la variabilidad genética en otras especies del género *Xanthomonas* (Yin *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010), por lo cual el estudio de estos genes podría aportar información relevante sobre la variabilidad genética entre poblaciones de *X. fragariae* y su relación con la severidad de la enfermedad mancha angular de la hoja en diferentes genotipos de fresa. El conocimiento de la variabilidad genética es un elemento básico para determinar el impacto económico que pueden ocasionar diferentes poblaciones del patógeno en condiciones ambientales específicas del país y delimitar zonas de producción donde se detecten cepas con mayor severidad para evitar el cultivo de fresa; o bien, para establecer medidas de manejo o de movilización de material propagativo más estrictas.

Todas las variedades cultivadas de fresa son susceptibles a la infección por *X. fragariae*; sin embargo, algunas pueden mostrar menor grado de susceptibilidad, por lo que la búsqueda de estos

calyx (Wyenandt and Nitzsche, 2013) causing discolouration, and the loss of its commercial value (Roberts *et al.*, 1997). The bacterial infection is systemic and subject to quarantine in several countries, because it may be asymptomatic, which contributes to the long-distance movement of infected plant material (CABI/EPPO, 2015; Koike *et al.*, 2005). In Mexico, the strawberry cultivation has socioeconomic importance; most of the production takes place in the states of Michoacán, Baja California, Guanajuato, and Jalisco (SIAP, 2014). *Xanthomonas fragariae* was first reported in Michoacán in 2014 (Fernández-Pavía *et al.*, 2014). But there are no studies on the genetic variability among strains of this pathogen in strawberry production areas in Mexico. The knowledge of this bacteria's genetic variability or its epidemiology can provide important tools to generate efficient disease management strategies.

The phylogenetic analysis of *hrp* and *gyrB* genes is used to find out the genetic variability in other species of the *Xanthomonas* genus (Yin *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010). Therefore, studying these genes could provide relevant information about genetic variability among *X. fragariae* populations and its relation with the severity of the angular leaf spot disease on different strawberry genotypes. The knowledge of genetic variability is essential to determine the economic impact that different pathogen populations can have in specific environmental conditions in the country. Also, it can help to delimit production zones where strains with greater severity are detected (and where cultivating strawberries should be avoided) or to establish stricter management or mobilization measures when dealing with propagative material.

All cultivated strawberry varieties are susceptible to *X. fragariae* infection. However, some of them may possibly be less susceptible; therefore, searching for these materials is important to develop genetic improvement programs and to focus disease management with these materials, in areas that are major sources of the pathogen's inoculum. Therefore, the objective of this research was to find out the genetic variability of 14 *X. fragariae* isolates from regions in central Mexico and to evaluate their severity in two strawberry commercial varieties and five genotypes.

materiales es importante para desarrollar programas de mejoramiento genético y enfocar el manejo de la enfermedad con estos materiales en zonas con elevada fuente de inóculo del patógeno. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue conocer la variabilidad genética de 14 aislamientos de *X. fragariae* de regiones del centro de México y evaluar su severidad en dos variedades comerciales y cinco genotipos de fresa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y aislamiento de la bacteria

El tejido foliar de fresa se recolectó 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 lesiones acuosas delimitadas por las nervaduras, que son síntomas característicos de la mancha angular de la hoja. El fluido bacteriano se tomó en 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 ± 1 °C hasta observar crecimiento bacteriano con el cual se hicieron siembras en el mismo medio hasta obtener colonias puras, pequeñas, de color blanco sedoso, brillantes, mucoides y apariencia viscosa. Los aislamientos bacterianos puros se preservaron en tubos criogénicos con caldo nutritivo y 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 según el método propuesto por Maas *et al.* (2000). Las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara de crecimiento a $25-27$ °C con humedad relativa de 50 a 65 % y fotoperiodo de 16 h luz. Cada 24 h se observaron para registrar el período de incubación y a los 15 d después de la inoculación se midió el tamaño de la lesión en las hojas inoculadas.

Extracción de ADN bacteriano

El ADN bacteriano se extrajo desde colonias puras aisladas de nuevo desde las plantas inoculadas con 72 h de crecimiento en medio de cultivo Wilbrink, con el protocolo descrito por Minas *et al.* (2011). El ADN obtenido se suspendió de nuevo en agua destilada estéril y se conservó a -20 °C.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and bacteria isolation

Strawberry leaf tissue was collected from commercial plantations in the states of Michoacán (Tupátaro, Tangancícuaro, Jacona, and Santiago de Tangamandapio), Jalisco (Ciudad Guzmán, Tapalpa), and Puebla (San Salvador del Seco) with watery lesions delimited by the nerves, characteristic symptoms of the angular leaf spot. Bacterial fluid was collected from diseased tissue and adjacent healthy tissue and seeded in Petri dishes with a Wilbrink culture medium (Koike, 1965, quoted by Vandroemme *et al.*, 2008). The dishes were incubated at 25 ± 1 °C until bacterial growth was observed. This growth was seeded in the same medium, until pure, small, silky white, shiny, mucoid, and viscous-looking colonies were obtained. Pure bacterial isolates were preserved in cryogenic vials with nutrient broth and 40 % glycerol at -20 °C.

Pathogenicity tests

The *X. fragariae* isolates were inoculated individually on two 4-weeks-old strawberry plants var. Monterrey grown in pots with sterile soil, according to the method proposed by Maas *et al.* (2000). The inoculated plants were kept in a growth chamber at $25-27$ °C, with 50-65 % relative humidity, and a 16 h light photoperiod. Observations were made every 24 h, in order to record the incubation period. Lesion size in inoculated leaves was measured 15 days after inoculation.

Bacterial DNA extraction

Bacterial DNA was extracted from pure colonies isolated again from the inoculated plants with 72 h of growth in a Wilbrink culture medium, using the protocol described by Minas *et al.* (2011). The DNA obtained was again put in a sterile distilled water suspension and stored at -20 °C.

Phylogenetic analysis

Hrp and *gyrB* genes segments were amplified from the DNA obtained, by means of PCR primers and conditions employed by Roberts *et al.* (1996) and Young *et al.* (2008) who amplified 537 bp and 865 bp fragments, respectively. The amplicons obtained were purified and sent for sequencing at MacroGen Inc. (Seoul, Korea). The sequences obtained were edited with the BioEdit Sequence Alignment Editor program, generating consensus sequences that were then aligned with the CLUSTALW software included in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis

Análisis filogenético

Segmentos de los genes *hrp* y *gyrB* a partir del ADN se amplificaron mediante PCR con los iniciadores y las condiciones de PCR usadas por Roberts *et al.* (1996) y Young *et al.* (2008), que amplifican fragmentos de 537 pb y 865 pb, respectivamente. Los amplicones se purificaron y enviaron a secuenciar a Macro-gen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, generándose las secuencias consenso que después se alinearon con el software CLUSTALW incluido en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6) (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias se editaron, 414 pb y 529 pb para los genes *hrp* y *gyrB* se obtuvieron, y se concatenaron para tener un segmento con una longitud de 943 pb. Un árbol filogenético se construyó con el programa MEGA 6 por el método Neighbour-joining. Las distancias evolutivas se obtuvieron por el método de Tamura 3-parameter model usando bootstrap con 10 000 repeticiones. Las secuencias editadas se depositaron en la base de datos del GenBank®.

Escala diagramática de severidad

Se recolectaron 200 hojas trifoliadas de fresa con diferentes niveles de daño por mancha angular. Las hojas se escanearon con una resolución de 200 dpi en una multifuncional HP (Officejet Pro 276dW®, USA). Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Assess 2.0 (The American Phytopathological Society, St Paul MN, USA) para determinar el porcentaje de área foliar dañada. Una escala diagramática de severidad de síntomas se desarrolló de acuerdo con la ley de agudeza visual de Weber-Fechner considerando los límites inferior y superior de severidad de la enfermedad detectada en campo. Seis niveles de severidad se establecieron con el programa 2LOG v.1.0 a partir del porcentaje de daño más alto, considerando el punto medio de cada nivel para ubicar imágenes representativas (Mora-Aguilera *et al.*, 2000, citado por Saucedo-Carabez *et al.*, 2014).

Evaluación de la severidad en genotipos de fresa

El aislamiento bacteriano 12XfMxJal se seleccionó porque mostró menor periodo de incubación en las pruebas de patogenicidad ya descritas, para evaluar la susceptibilidad de las variedades comerciales de fresa Fortuna y Festival, así como de los genotipos Frag53, Frag40, FragLa, FragMa y FragSp. Una suspensión bacteriana de 3×10^8 UFC mL⁻¹ de agua estéril fue preparada y se usaron dos métodos de inoculación: 1) inyección: 10 plantas de cada variedad comercial y genotipo se inocularon según la metodología de Maas *et al.* (2000), y 2) aspersión: se asperjaron

(MEGA 6) program (Tamura *et al.*, 2011). The sequences were edited and 414 bp and 529 bp were obtained for the *hrp* and *gyrB* genes, respectively; subsequently, these results were concatenated and a 943-bp long segment was the result. A phylogenetic tree was developed with MEGA 6, using the neighbor-joining method. The evolutionary distances were obtained with the Tamura 3-parameter model using a 10 000-repetitions bootstrap. The sequences edited were deposited in the GenBank® database.

Diagrammatic severity scale

Two hundred trifoliate strawberry leaves with different levels of angular spot damage were collected. The leaves were scanned with a 200 dpi resolution, in an HP all-in-one (Officejet Pro 276dW®, USA). The resulting images were analyzed with Assess 2.0 software (The American Phytopathological Society, St Paul MN, USA), in order to determine the percentage of damaged leaf area. A diagrammatic symptom severity scale was developed according to Weber-Fechner's law of visual acuity, considering the lower and upper disease severity limits detected in the field. Six levels of severity were established with the 2LOG v.1.0 program, starting from the highest damage percentage, taking into consideration the midpoint of each level, in order to locate representative images (Mora-Aguilera *et al.*, 2000, quoted by Saucedo-Carabez *et al.*, 2014).

Severity evaluation on the strawberry genotypes

The 12XfMxJal bacterial isolation was selected —because its incubation period was shorter in the pathogenicity tests described above— to evaluate the susceptibility of Fortuna and Festival strawberry commercial varieties, as well as of the Frag53, Frag40, FragLa, FragMa, and FragSp genotypes. A sterile water 3×10^8 CFU mL⁻¹ bacterial suspension was prepared and two inoculation methods were used: 1) injection: 10 plants of each commercial variety and genotype were inoculated according to the methodology of Maas *et al.* (2000), and 2) spray: 10 plants per material were sprayed up to dripping point using the method of Bestfleisch *et al.* (2015). The experiment was set up in the field inside plastic tunnels.

The plants treated with both methods of inoculation were observed every 24 h for 11 d, in order to record the incubation period. Subsequently, they were observed every 4 d for four weeks, in order to evaluate the severity using the scale developed.

The experimental design was made up by fully random blocks. An ANOVA was carried out with the severity data, and means were compared using Tukey's multiple comparison test ($p \leq 0.05$) in SAS (SAS System for Windows v9.0). Based on

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.

Las plantas con ambos métodos de inoculación se observaron cada 24 h durante 11 d para registrar el período de incubación y después cada 4 d durante cuatro semanas para evaluar la severidad mediante la escala desarrollada.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar. Con los datos de severidad se realizó un ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando SAS (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)^[3].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de patogenicidad

En los estados de Michoacán, Jalisco y Puebla se obtuvieron 14 aislamientos de *X. fragariae* (Cuadro 1), desde hojas con síntomas de mancha angular. Todos los aislamientos fueron patogénicos en plantas de fresa (var. Monterrey) y causaron

the incidence data, the area under the disease progress curve was obtained for each material evaluated (LANREF-Mora-Aguilera, COLPOS)^[3].

RESULTS AND DISCUSSION

Pathogenicity tests

In the states of Michoacán, Jalisco, and Puebla, 14 *X. fragariae* isolates were obtained from leaves with angular spot symptoms (Table 1). All isolates were pathogenic in strawberry plants (var. Monterrey). They caused watery spots in the inoculation site (Figure 1), which are typical symptoms of a natural bacterial infection. The incubation period ranged between 3 and 5 d, and the shortest incubation period was recorded in the 2XfMxMich and 12XfMxJal isolates (Table 1).

Phylogenetic analysis

The sequence analysis of the *hrp* and *gyrB* genes segments grouped into a single branch the 14 isolates from our study with an Australian isolation

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

Table 1. *Xanthomonas fragariae* isolates origin and identification, incubation period, and lesion size recorded in strawberry var. Monterrey plants.

Aislamiento	Localidad	Período de incubación (días)	Tamaño de la lesión (cm)	No. Acceso GenBank	
				<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	Tangamandapio [†]	5	0.37	KU719624	KU747980
7XfMxMich	Tangamandapio [†]	5	0.45	KU719625	KU747981
8XfMxMich	Tangamandapio [†]	5	0.46	KU719626	KU747982
9XfMxMich	Tangamandapio [†]	5	0.38	KU719627	KU747983
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 [§]	5	0.38	KU719631	KU747988

[†]Michoacán, [§]Jalisco, [¶]Puebla.

³ Mora-Aguilera, G. Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LANREF), Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas-DGSV SENASICA SAGARPA - Programa de Postgrado en Fitosanidad. www.lanref.org.mx

manchas acuosas en el sitio de inoculación (Figura 1), que son síntomas típicos de la infección natural por la bacteria. El período de incubación osciló entre 3 y 5 d, y el período menor de incubación fue con los aislamientos 2XfMxMich y 12XfMxJal (Cuadro 1).

Análisis filogenético

El análisis de las secuencias de los segmentos de los genes *hrp* y *gyrB* agrupó en una sola rama a los 14 aislamientos de nuestro estudio con uno de Australia (GenBank Accession HQ223085) (Figura 2), lo cual 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 5 d, pero en los aislamientos 2XfMxMich y 12XfMxMich fue de 3 d. Estas diferencias muestran variabilidad genética inherente de esta especie bacteriana. Aun que hubo diferencias biológicas, no

(GenBank Accession HQ223085) (Figure 2), which indicates that they are very similar to each other. *Xanthomonas fragariae* isolates infected strawberry plants var. Monterrey with a 5 d incubation period, but the 2XfMxMich and 12XfMxMich isolates only took 3 d. These differences show the potential genetic variability inherent in this bacterial species. Although there were biological differences, it was not possible to find genetic differences in the regions of the genes examined. Stöger *et al.* (2008) studied the genetic variability of several *X. fragariae* isolates by means of Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC), and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), but did not find any differences between them. However, studies that analyzed the *hrp* and *gyrB* genes for phytopathogenic bacterial species (including other genus *Xanthomonas* species) were consistent and showed genetic variability among them (Yin *et al.*, 2008; Young *et*

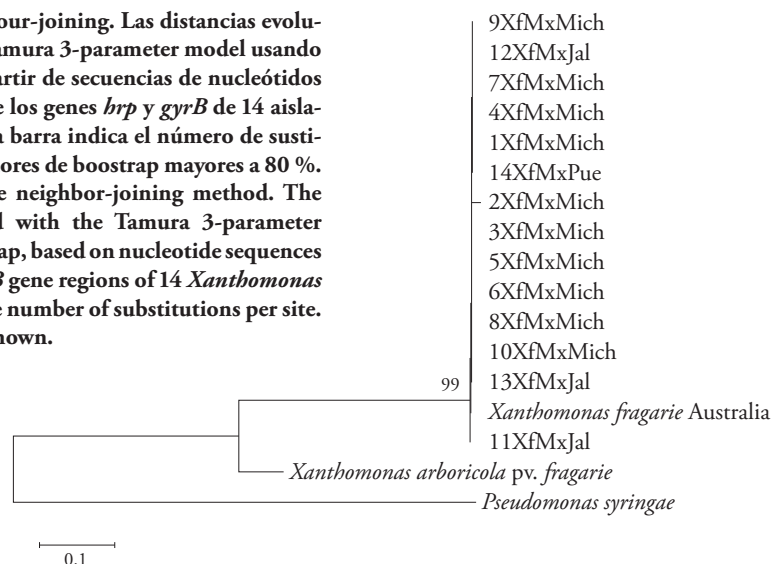


Figura 1. Hojas con lesiones acuosas en los sitios de inoculación por inyección de *Xanthomonas fragariae* 15 d después de la inoculación. A) vista abaxial, B) vista adaxial.

Figure 1. Leaves with watery lesions in the inoculated places where *Xanthomonas fragariae* was injected (15 d after inoculation). A) abaxial view, B) adaxial view.

Figura 2. Árbol generado con el método Neighbour-joining. Las distancias evolutivas se obtuvieron por el método de Tamura 3-parameter model usando 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. Sólo se muestran valores de bootstrap mayores a 80 %.

Figure 2. Phylogenetic tree developed using the neighbor-joining method. The evolutionary distances were obtained with the Tamura 3-parameter model using 10 000-repetitions bootstrap, based on nucleotide sequences concatenated with partial *hrp* and *gyrB* gene regions of 14 *Xanthomonas fragariae* isolates. The bar indicates the number of substitutions per site. Only bootstrap values over 80 % are shown.



se identificaron genéticamente con las regiones de los genes estudiados. Stöger *et al.* (2008) estudiaron la variabilidad genética de 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. Pero estudios donde se analizaron los genes *hrp* y *gyrB* para especies de bacterias fitopatógenas, incluyendo otras especies del género *Xanthomonas*, fueron consistentes y mostraron variabilidad genética entre ellas (Yin *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010). En nuestra investigación, los resultados del análisis de las secuencias parciales de los genes *hrp* y *gyrB* de los 14 aislamientos de *X. fragariae*, no mostraron variabilidad a pesar de las diversas condiciones ambientales, variedades, manejo del cultivo y otros factores, donde se recolectaron las muestras. Lo anterior puede indicar diversidad genética baja, probablemente por un origen común de los aislamientos introducidos a México, o porque hay un número reducido de secuencias de los genes *hrp* y *gyrB* en la base de datos del GenBank de esta especie y que permitan detectar diferencias en estas regiones del genoma. Ahora se realiza la secuenciación del genoma completo de estos aislamientos para obtener mayor claridad acerca de la interacción genotipo/severidad de los síntomas inducidos, así como posibles estudios filo-geográficos de los mismos.

Escala diagramática

La escala diagramática diseñada tuvo seis niveles de severidad en los que se indica el rango de área foliar afectada. Esta escala se integró con una imagen que muestra el porcentaje de daño calculado con el software y que es representativa de cada nivel con el propósito de facilitar la evaluación del daño en campo (Figura 3).

El uso de este tipo de escala reduce la subjetividad en las estimaciones de la gravedad de una enfermedad y es 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 no usada con frecuencia debido quizá al número de niveles y porque el daño se ilustra con dibujos en blanco y negro. Para otras enfermedades hay escalas de severidad

al., 2008; Almeida *et al.*, (2010). In our research, the results of the analysis of the *hrp* and *gyrB* partial gene sequences of the 14 *X. fragariae* isolates showed no variability, despite, among other factors, the different environmental conditions, as well as crop varieties and management, in the regions where the samples were collected. This may indicate a low genetic diversity, probably because the isolates introduced in Mexico have a common origin or because there is a small number of *hrp* and *gyrB* gene sequences in the GenBank database for this species, making it impossible to detect differences in these genome regions. The complete genome sequencing of these isolates is currently being carried out, in order to obtain a greater understanding of the genotype/severity interaction of the induced symptoms, as well as possible phylo-geographic studies of these isolates.

Diagrammatic scale

The diagrammatic scale was designed with six severity levels, which indicate the affected leaf area range. This scale was integrated with an image that shows the damage percentage calculated with the software, and that is representative of each level, in order to facilitate damage evaluation in the field (Figure 3).

The use of this type of scale reduces the subjectivity of the disease severity estimations and is an essential element in epidemiological studies (Menge *et al.*, 2013). Bestfleisch *et al.* (2015) proposed a nine-level *X. fragariae* severity scale. It is not often used, perhaps due to the number of levels and because the damage is illustrated with black and white drawings. There are five- or six-level severity scales for other diseases, which have acceptable precision values and provide an accurate validation (Menge *et al.*, 2013, Freitas *et al.*, 2014). The scale proposed in our research shows a progressive sequence of the advance of the affected leaf area, with images that clearly show the damage level caused by this bacterium in the sites under study. (The figures are shown in grayscale and color —printed and electronic version, respectively).

Severity evaluation

During the evaluation period (September-October 2015), 16-28 °C daytime and 18-28 °C night-time

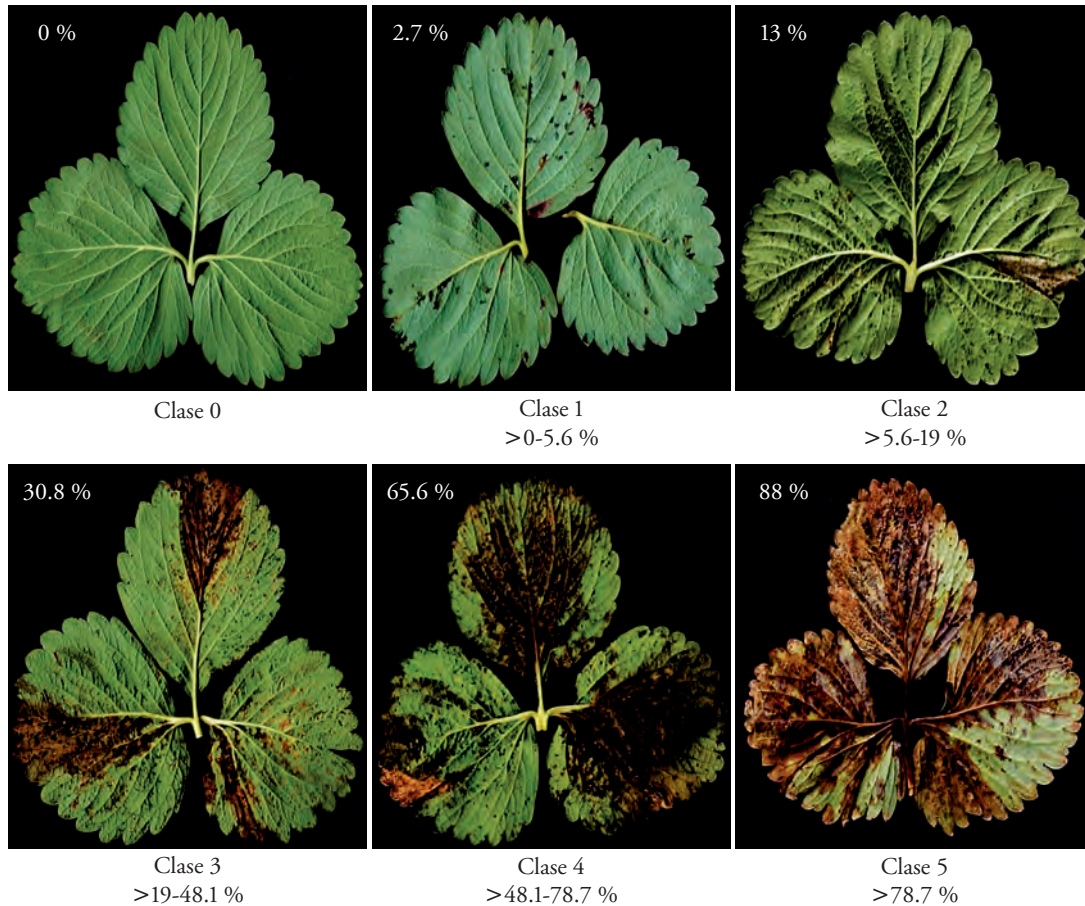


Figura 3. Escala diagramática diseñada para evaluar la severidad de *Xanthomonas fragariae* en genotipos de fresa.
Figure 3. Diagrammatic scale designed to evaluate the severity of *Xanthomonas fragariae* in strawberry genotypes.

con cinco o seis niveles, las cuales tienen valores aceptables de precisión y exactitud en la validación (Menge *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2014). La escala propuesta en nuestra investigación muestra una secuencia progresiva del avance del área foliar afectada, con imágenes que proporcionan de manera clara el nivel de daño ocasionada por esta bacteria en las localidades estudiadas. (La versión impresa muestra las figuras en escala de grises y la versión electrónica a color).

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 aspersión.

temperatures were recorded, with 44-99 % relative humidity. The seven evaluated strawberry genotypes were susceptible to *X. fragariae*, after being inoculated by injection or spray.

Inoculation by injection

By means of this method, watery and necrotic lesions forming an angular spot delimited by nerves were observed. Eleven days after inoculation, 100 % plants of all genotypes showed symptoms; there was a 4, 6, 9, and 11 d incubation period variation. The area under the disease progress curve varied among different genotypes. The FragLa genotype had the lowest severity value (31.82) (Figure 4).

In all cases, the size of the lesions increased progressively during the experiment. Thirty-four days after inoculation (34 dai), the Frag53 genotype had the highest value, followed by the Festival

Inoculación por inyección

Con este método se observaron lesiones acuosas y necróticas que formaron una mancha angular delimitada por las nervaduras. El 100 % de plantas mostraron síntomas a los 11 d después de la inoculación en todos los genotipos y hubo variación entre los periodos de incubación de 4, 6, 9 y 11 d. El área bajo la curva del progreso de la enfermedad fue variable entre los diferentes genotipos, y el genotipo FragLa tuvo el menor valor (31.82) de severidad (Figura 4).

En todos los casos, las lesiones aumentaron progresivamente de tamaño durante el experimento. A los 34 d después de la inoculación (ddi) el genotipo Frag53 tuvo el mayor valor seguido de la variedad Festival; los otros genotipos fueron estadísticamente similares ($p > 0.05$; Cuadro 2). A los 18 ddi los genotipos Frag53 y Fortuna fueron similares ($p > 0.05$) y

variety; the other genotypes were statistically similar ($p > 0.05$, Table 2). Eighteen days after inoculation (18 dai), the Frag53 and Fortuna genotypes were similar ($p > 0.05$) and from 22 dai they behaved differently ($p \leq 0.05$) until the end of the evaluation.

The inoculated plants showed two types of foliar lesions: 1) irregular necrotic spots surrounded by a yellow halo that generally covered the entire leaf blade (Figure 5A); and 2) necrotic lesions bordered by watery tissue (Figure 5B). Only in the FragLa genotype, 65 % of the inoculation sites showed a third type of lesions: necrotic spots limited to the inoculation area (Figure 5C), similar to those that occur in a hypersensitive response (HR). HR is considered the highest expression of the plants' resistance to pathogen attacks, and is defined as a rapid plant cell death associated with the restriction

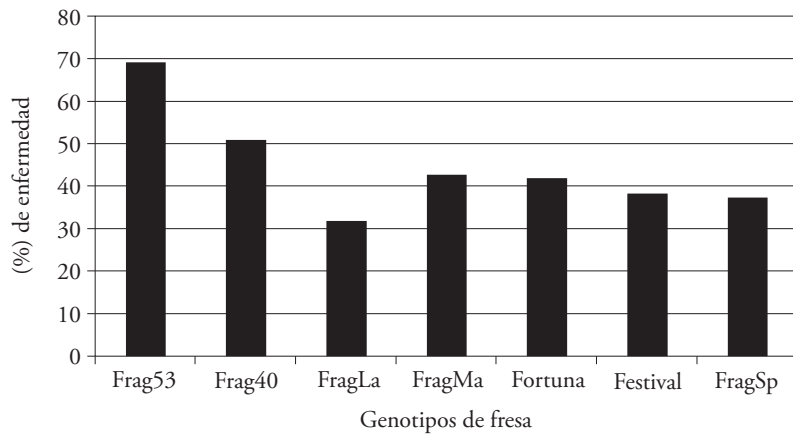


Figura 4. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en siete genotipos de fresa inoculados por inyección con *Xanthomonas fragariae*.

Figure 4. Area under the disease progress curve in seven strawberry genotypes inoculated with *Xanthomonas fragariae* by injection.

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

Table 2. Lesion size (cm) caused by *Xanthomonas fragariae* in seven strawberry genotypes leaves inoculated by injection.

Genotipo	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 letra diferente son estadísticamente significativos (Tukey, $p \leq 0.05$) ❖ *Different-letter treatments are statistically significant (Tukey, $p \leq 0.05$).

desde los 22 ddi se comportaron de manera diferente ($p \leq 0.05$) hasta finalizar la evaluación.

Las lesiones foliares en las plantas inoculadas fueron de dos tipos: 1) manchas necróticas irregulares rodeadas por un halo amarillo que generalmente llegaba a cubrir la totalidad de la lámina foliar (Figura 5A), y 2) lesiones necróticas bordeadas por tejido acuoso (Figura 5B). Solo en el genotipo FragLa el 65 % de los sitios de inoculación mostró un tercer tipo de lesión de manchas necróticas (Figura 5C) y limitadas al área de inoculación, similar a las producidas 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 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-Mejía, 2011). Además, las plantas en las que se produce una RH poseen cierto grado de resistencia al patógeno que la indujo (Vlot *et al.*, 2008). 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). Según, Bestfleisch *et al.* (2015), las plantas

of the pathogen growth, which is recognized by the presence of one or more brown dead cells in the infection site (Greenberg and Yao, 2004; Sanzón and Zavaleta-Mejía, 2011). In addition, plants in which an HR is produced, have some degree of resistance to the pathogen that induced it (Vlot *et al.*, 2008). Different species of phytopathogenic bacteria —such as *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, and *Ralstonia solanacearum*, among others— have elicitors that trigger HR (Grant and Mansfield, 1999). Bestfleisch *et al.* (2025) also report that, in the early stages of their development, strawberry plants are more susceptible to *X. fragariae*, and that, as they mature, they show some resistance that may become more evident over time.

Spray inoculation

The same symptom types were consistently observed with this method: watery angular spots (Figure 6A) coalesced over time forming larger necrotic areas bordered by yellow-colored tissue (Figure 6B). This type of lesions were different from those observed in plants inoculated by injection. The first symptoms were observed 7 dai. Statistical analysis did not show significant differences

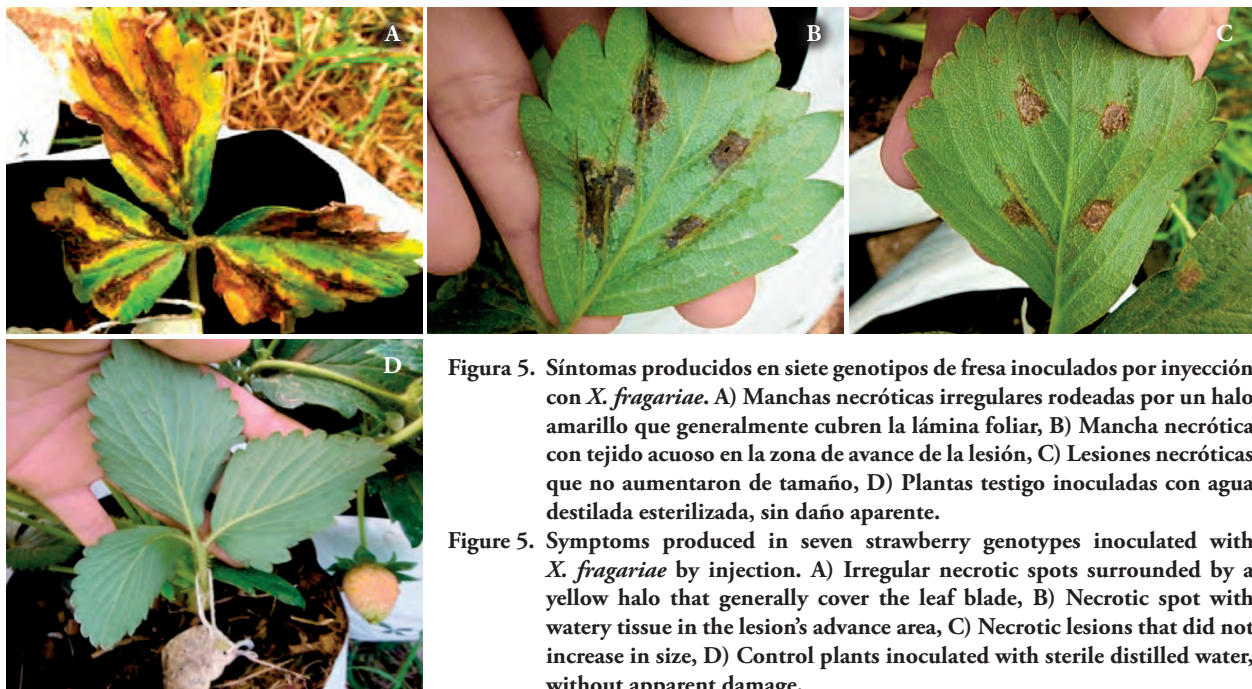


Figura 5. Síntomas producidos en siete genotipos de fresa inoculados por inyección con *X. fragariae*. A) Manchas necróticas irregulares rodeadas por un halo amarillo que generalmente cubren la lámina foliar, B) Mancha necrótica con tejido acuoso en la zona de avance de la lesión, C) Lesiones necróticas que no aumentaron de tamaño, D) Plantas testigo inoculadas con agua destilada esterilizada, sin daño aparente.

Figure 5. Symptoms produced in seven strawberry genotypes inoculated with *X. fragariae* by injection. A) Irregular necrotic spots surrounded by a yellow halo that generally cover the leaf blade, B) Necrotic spot with watery tissue in the lesion's advance area, C) Necrotic lesions that did not increase in size, D) Control plants inoculated with sterile distilled water, without apparent damage.

de fresa son más susceptibles a *X. fragariae* en etapas tempranas de desarrollo y, al madurar, presentan cierta resistencia que puede ser más evidente con el tiempo.

Inoculación por aspersión

Con este método se observó consistentemente un mismo tipo de síntoma de manchas angulares acuosas (Figura 6A) que coalescieron con el tiempo formando áreas necróticas de mayor tamaño bordeadas por tejido con coloración amarillo (Figura 6B). Este tipo de lesiones fueron diferentes de las observadas en las plantas inoculadas por inyección. Los primeros síntomas se observaron a los 7 ddi. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) en severidad entre los materiales de fresa inoculados por aspersión con *X. fragariae*.

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

En experimentos se ha obtenido cierto control de la bacteria con tratamientos térmicos, esterilización de superficie por inmersión de plántulas en cloro + radiación ultravioleta (UV-C) y remoción de hojas y peciolos en plantas de vivero (Turechek y Peres, 2009; Turechek *et al.*, 2013). El mejoramiento genético como un método más de manejo de esta enfermedad podría ser una herramienta valiosa que requiere la evaluación y selección constante de genotipos con características agronómicas deseables, así como la valoración de la resistencia o tolerancia a la bacteria. Por tanto, es necesario continuar las evaluaciones de los materiales de fresa para seleccionar genotipos mejor adaptados a este patosistema con

($p > 0.05$) in severity among strawberry materials inoculated with *X. fragariae*.

The two inoculation methods used in this research efficiently infected strawberry genotypes. However, symptoms similar to those occurring in a natural environment were observed when spray inoculation was used.

Some bacteria control has been achieved, during experiments, with thermal treatments, surface sterilization by immersion of seedlings in chloro + ultraviolet radiation (UV-C), and removal of leaves and petioles in nursery plants (Turechek and Peres, 2009; Turechek *et al.*, 2013). Genetic improvement as an additional disease management method could be a valuable tool that requires the constant selection of genotypes with desirable agronomic characteristics, as well as the evaluation of the resistance or tolerance to the bacteria. Therefore, it is necessary to continue evaluating the strawberry materials, in order to select the genotypes that are better adapted to this *X. fragariae* pathosystem, providing alternatives that contribute to an efficient disease management. In Mexico, the development of selection techniques for strawberry materials that can resist or which have some tolerance degree to angular leaf spot is incipient, due to its recent introduction in the country.

Two forms of *X. fragariae* inoculation were evaluated in our study —these forms are reported separately in other works. Although an infection occurred in both cases, the incubation period with inoculation by injection was shorter; therefore, using this inoculation method in selection programs may be more convenient, because it reduces the time needed to evaluate genetic materials.



Figura 6. Síntomas observados en siete genotipos de fresa inoculados por aspersión con *X. fragariae*. A) Manchas angulares inicialmente acuosas que necrosaron con el tiempo, B) Lesiones necróticas con halo amarillo con cierta zona de avance de la lesión.

Figure 6. Symptoms observed in seven strawberry genotypes inoculated spraying *X. fragariae*. A) Angular spot (initially watery) that suffered necrosis over time, B) Necrotic lesions with yellow halo with some areas in which the lesion has advanced.

X. fragariae, que proporcionarán alternativas que contribuyan a un manejo eficiente de la enfermedad. En México es incipiente 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 nuestro 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 utilizar este método de inoculación en programas de selección al reducir el tiempo de evaluación de los materiales genéticos.

CONCLUSIONES

La secuenciación parcial de los genes *hrp* y *gyrB* mostró una alta similitud genética entre 14 aislamientos de *Xanthomonas fragariae* de diferentes localidades del Centro de México.

Todos los genotipos de fresa evaluados resultaron susceptibles a *Xanthomonas fragariae*. Pero FragMa y FragLa mostraron los valores menores de severidad de síntomas, y pueden constituir fuentes de genes con potencial para usarse en programas de mejoramiento genético para el cultivo de fresa en México.

El genotipo FragLa mostró evidencias de reacción de hipersensibilidad en el 65 % de los sitios de inoculación, por lo que será estudiado con mayor profundidad para encontrar genes involucrados en esta reacción.

AGRADECIMIENTOS

A Driscoll's Strawberry Associates. Investigación Aplicada, Driscoll's – México, por el apoyo y soporte brindado para el desarrollo de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Almeida N. F., S. Yan, R. Cai, C. R. Clarke, C. E. Morris, N. W. Schaad, E. L. Schuenzel, G. H. Lacy, X. Sun, J. B. Jones, J. A. Castillo, C. T. Bull, S. Leman, D. S. Guttman, J. C. Setubal, and B. A. Vinatzer. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology* 100: 208-215.
- Bestfleisch M., K. Richter, N. A. Wensing, J. Wünsche, M. V. Hanke, M. Höfer, E. Schulte, and H. Flachowsky. 2015.

CONCLUSIONS

The partial sequencing of *hrp* and *gyrB* genes showed a high genetic similarity between 14 *Xanthomonas fragariae* isolates from different localities in central Mexico.

All strawberry genotypes evaluated were susceptible to *Xanthomonas fragariae*. However, FragMa and FragLa showed the lowest symptom severity values, and may constitute gene sources that can potentially be used in genetic improvement programs for strawberry cultivation in Mexico.

The FragLa genotype showed evidence of hypersensitive response in 65 % of the inoculation sites and will be studied in greater depth, in order to find the genes involved in this reaction.

—End of the English version—



Resistance and systemic dispersal of *Xanthomonas fragariae* in strawberry germplasm (*Fragaria* L.). *Plant Pathol.* 64: 71-80.

- CABI/EPPO (CAB International/European and Mediterranean Plant Protection). 2015. Invasive Species Compendium. Datasheets, maps, images, abstracts and full text on invasive species of the world. *Xanthomonas fragariae* (angular leaf spot). CAB International, Wallingford, UK. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/56934>.
- Fernández-Pavía S. P., 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 Dis.* 98: 682.
- Freitas M. L. D. O., E. A. Pozza, L. L. Belan, J. L. da Silva, and M. S. de Abreu. 2014. Diagrammatic scale for blister spot in leaves of coffee tree. *Afr. J. Agric. Res.* 10: 2068-2075.
- Grant M., and J. Mansfield. 1999. Early events in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 312-319.
- Greenberg J. T., and N. Yao. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 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 H. 1965. The aluminium-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* 55: 317-9.
- Koike S. T., W. D. Gubler, U. C. Davis, and G. T. Browne. 2005. Guía para el manejo de las plagas: fresas. Universidad de California. Publicación 3473. UC Agricultura y Recursos Naturales. pp: 41-57.
- Maas J. L., B. C. Gouin, J. S. Hartung, and S. C. Hokanson. 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes. *Hortscience* 35: 128-131.

- Menge D., M. Makobe, S. Shomari, and V. A. Tiedemann. 2013. Development and validation of a diagrammatic scale for estimation of cashew blight for epidemiological studies. *Int. J. Adv. Res.* 1: 26-38.
- Minas K., N. R. McEwan, C. J. Newbold and K. P. Scott. 2011. Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 325: 162-169.
- Mora-Aguilera G., P. Rivas-Valencia, C. Góngora-Canul, A. Tovar-Soto, J. Cristobal-Alejo, E. Loeza-Kuk, S. Michereff, A. Marinelli, y K. Osada-Velázquez. 2000. Sistemas computarizados en la epidemiología: 1. 2-LOG ver 1.0 y su aplicación en el diseño de escalas diagramáticas logarítmicas. *In: XXIX Simposio Nacional de Parasitología Agrícola.* Octubre 12-15. Puerto Vallarta, Jalisco, México. pp: 2-22.
- Roberts P. D., J. B. Jones, and C. K. Chandler. 1997. Disease progress, yield loss, and control of *Xanthomonas fragariae* on strawberry plants. *Plant Dis.* 81: 917-921.
- Roberts P. D., J. B. Jones, C. K. Chandler, R. E. Stall, and R. D. Berger. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 80: 1283-1288.
- Sanzón G. D., y E. Zavaleta-Mejía. 2011. Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 29: 154-164.
- Saucedo-Carabez J. R., D. Téliz-Ortíz, S. Ochoa-Ascencio, D. Ochoa-Martínez, M. R. Vallejo-Pérez, and H. Beltrán-Peña. 2014. Effect of avocado sunblotch viroid (ASBVd) on avocado yield in Michoacan, Mexico. *Eur. J. Plant Pathol.* 138: 799-805.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado> (Consulta: Diciembre 2014).
- 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. *J. Plant Pathol.* 90: 469-473.
- Tamura K., D. Peterson, 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. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Turechek W. W., and N. A. Peres. 2009. Heat Treatment effects on strawberry plant survival and angular leaf spot, caused by *Xanthomonas fragariae*, in nursery production. *Plant Dis.* 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. *Int. J. Fruit Sci.* 13: 234-245.
- 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 Pathol.* 57: 438-444.
- Vlot A. C., D. F. Klessig, and S. Park. 2008. Systemic acquired resistance the elusive signal (s). *Curr. Opin. Plant Biol.* 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/>. (Consulta: Octubre 2014)
- 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. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 302-311.
- Young J. M., D. C. Park, H. M. Shearman, and E. Fargier. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 366-377.