

Métodos de inspección, diagnóstico y detección

María M. López^a, Blanca B. Landa^b y Ester Marco-Noales^a

^aInstituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (España, Valencia, Moncada)

^bInstituto de Agricultura Sostenible-CSIC (España, Córdoba)

1. Introducción y métodos de inspección y muestreo

La inspección y la toma de muestras son pasos clave del proceso completo del diagnóstico. Una buena toma y un buen manejo de muestras puede influir positivamente en el resultado de los análisis posteriores, y en el caso de graves enfermedades, como las causadas por *Xylella fastidiosa*, la prevención de nuevas introducciones mediante el diagnóstico sensible y específico de las muestras es esencial.

Los métodos de muestreo aconsejados en las inspecciones de material vegetal en envíos de todo tipo, procedentes de países terceros, se describen en el estándar de la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO, 2016a), donde se indican los procedimientos para la inspección de muestras de todos las posibles plantas huéspedes de *X. fastidiosa* y de sus vectores. Los métodos de muestreo relativos a las inspecciones y toma de muestras en viveros o plantaciones se describen en otro estándar similar (EPPO, 2016b), y las recomendaciones del plan de contingencia español se detallan en el Capítulo 14. La toma de muestras de vectores se describe en el Capítulo 4.

La época de inspección y muestreo es también importante tanto para el análisis de plantas asintomáticas como con síntomas, dado que, como se ha indicado en el Capítulo 3, la concentración de la bacteria problema depende de factores ambientales, de la cepa bacteriana y de la planta huésped. Por ello, para maximizar las probabilidades de detectar la bacteria y de aislarla, los muestreos deben realizarse durante el período vegetativo de las plantas (desde final de primavera hasta principios de otoño en España). En el caso de plantas subtropicales o mantenidas en invernadero, la inspección y el muestreo pueden ser durante todo el año.

En base a la información de los brotes europeos, se recomiendan las siguientes épocas aconsejadas de muestreo (EPPO, 2016c):

- Para *Polygala* spp., los muestreos se aconsejan desde finales de primavera hasta principios de otoño.
- Para olivo y adelfa, se indica que en Italia los síntomas se expresan con mayor intensidad en verano, por lo que es preferible muestrear entonces, pero se pueden observar durante todo el año.
- Para plantas de hoja caduca, como los frutales y ornamentales del género *Prunus*, se recomienda el muestreo en verano, ya que las muestras tomadas en otras estaciones suelen ser negativas.
- En vid, el mejor período para la observación de síntomas, según la experiencia de EEUU, es el final del verano y el principio de otoño.
- En caso de ser necesario analizar plantas en estado de parada vegetativa, se recomienda tomar estaquillas leñosas, a partir de las cuales se analizará el xilema para la detección de *X. fastidiosa*.

La toma de muestras es similar para el caso de los envíos y de los viveros o las plantaciones. Después de la toma de muestras, estas deben ser enviadas al laboratorio por el método más rápido posible y, como suelen tomarse en verano, es necesario mantenerlas refrigeradas durante el transporte, pero no congeladas.

Las muestras sintomáticas para ser analizadas en el laboratorio deberán ser de ramas o estaquillas con hojas representativas de todos los síntomas observados y unidas al tallo. Deberán contener al menos de 10 a 25 hojas, y no se aconseja tomar muestras de tallos jóvenes porque no conviene analizar hojas inmaduras. Como la bacteria está confinada en el xilema de las plantas, los análisis se realizan usando los peciolo y nervios principales de las hojas, donde se concentra el máximo número de vasos. Si se van a analizar plantas de pequeño tamaño, conviene enviar las plantas enteras; y si, en cambio, las hojas son de gran tamaño, se pueden enviar varias hojas con sus peciolo.

Las muestras asintomáticas para ser analizadas en el laboratorio deberán ser de ramas o estaquillas con hojas maduras y unidas al tallo. El tipo de material es el mismo que para las plantas con síntomas, pero para plantas individuales el número de ramas para enviar al laboratorio será de 4 a 10, dependiendo del huésped y tamaño de la rama. No se dispone de suficientes datos para el análisis de muestras compuestas de distintas especies de plantas, pero en el caso del cafeto se ha detectado *X. fastidiosa* en muestras de 100 a 200 hojas con peciolo.

La norma ISPM31 (IPPC 2008) proporciona la información necesaria para decidir el número de plantas a muestrear en función de la probabilidad de detectar un positivo en casos concretos. Luego en el laboratorio, el analista decidirá el tamaño de material vegetal a analizar, pero generalmente oscila de 0,5 a 1 g de material vegetal por muestra. En el caso de muestras individuales, esto puede ser suficientemente representativo; pero en el caso de muestras de un lote de varias plantas, puede darse frecuentemente el caso de obtener falsos resultados negativos en el análisis, debido a la distribución irregular de la bacteria entre plantas y dentro de la planta.

Para tomar cada muestra se deben emplear nuevos guantes a fin de evitar posibles contaminaciones cruzadas. Los pasos a seguir son, primero tratar la bolsa o recipiente que contiene la muestra por fuera con insecticida, e introducirla en el embalaje de transporte y después añadir la documentación acompañante, y sellar con cinta adhesiva.

Cada muestra debe etiquetarse con un código de identificación y se enviará acompañada del formulario específico de información individualizada, que se adosará al exterior del embalaje, de forma que no contacte directamente con el recipiente primario, que contiene las muestras. De esta manera se puede acceder a toda la información simplemente con abrir el embalaje externo. En él se hará constar la procedencia de la muestra, su número de identificación, tipo de muestra, fecha de la toma de muestra y nombre de la persona que toma las muestras, listado que incluya todas las muestras que contiene el paquete y cualquier información que se considere necesaria para el correcto tratamiento y análisis de la muestra.

Una vez obtenidas la referencia del envío y las muestras, conviene enviar un aviso al laboratorio correspondiente con la fecha/hora de envío de muestras y modo de transporte, así como la fecha/hora de llegada prevista al laboratorio. Las muestras se enviarán acompañadas de la documentación oficial de envío de muestras.

Se recomienda que las partes implicadas en el transporte (remitente, destinatario y empresa de transporte) establezcan anticipadamente una adecuada coordinación para asegurar que el material sea transportado de forma segura, en los embalajes adecuados, y que llegue a su destino oportunamente y en buenas condiciones.

En el laboratorio la muestra debe ser procesada lo antes posible, para la mayor fiabilidad de los resultados y siempre antes de que pase una semana desde que fue recogida y tres días en el caso de realizarse aislamientos (EPPO, 2016c).

2. Diagnóstico de *Xylella fastidiosa* en plantas con síntomas

El diagnóstico de una enfermedad hace referencia a la identificación de la naturaleza y la causa de dicha enfermedad y, por tanto, concierne a aquellas plantas que muestran algún tipo de sintomatología. Las primeras clasificaciones de enfermedades de plantas, allá por la primera mitad del siglo XIX, estaban basadas exclusivamente en los síntomas observados. El primer nombre que hace referencia a una enfermedad causada por *X. fastidiosa* fue «enfermedad misteriosa de la vid», y fue N. B. Pierce quien la describió con gran detalle en 1892 (Janse y Obradovic, 2010). Precisamente, debido a su gran trabajo, esta enfermedad se denominó en 1939 enfermedad de Pierce. Los síntomas causados por *X. fastidiosa* son en realidad inespecíficos, y en el caso de la vid pueden confundirse con los producidos por otros agentes causales de enfermedades como eutipiosis, podredumbre blanca, yesca, y alguna otra producida por hongos u otros patógenos. Y también pueden confundirse los síntomas con estrés hídrico, por salinidad, nutricional, tóxicos ambientales, quemaduras por sol, etc. Debido a que la bacteria invade los vasos del xilema, puede llegar a bloquear el transporte de agua y sales minerales. De modo general, los síntomas incluyen quemadura de hojas, marchitez de hojas, defoliación, clorosis o bronceado en el margen de las hojas y enanismo. Los síntomas dependen de la combinación de planta huésped y cepa de *X. fastidiosa* y, debido a su falta de especificidad, el diagnóstico correcto no puede ser visual, sino que requiere análisis en laboratorio.

Los métodos analíticos actualmente aconsejados por la EPPO, y utilizados en los laboratorios oficiales de diagnóstico de los organismos responsables de Sanidad Vegetal en España, se describen en el apartado 6 de este capítulo. Se deben analizar todas las muestras sospechosas, porque una identificación basada exclusivamente en sintomatología puede llevarnos a interpretaciones equivocadas, lo cual es aplicable a todas las plantas huéspedes de *X. fastidiosa*. De hecho, al Laboratorio Nacional de Referencia han llegado muestras de olivos, almendros, romeros, polígalas y otras especies, con síntomas aparentemente característicos de la presencia de *X. fastidiosa*, pero en los que no se ha podido detectar el patógeno con los métodos más sensibles de que se dispone

hoy en día, sugiriendo que esos daños eran debidos a déficits hídricos o nutricionales y no atribuibles a *X. fastidiosa*.

3. Detección de *Xylella fastidiosa* en plantas asintomáticas

Esta bacteria no causa enfermedad en ciertos casos en las plantas huéspedes, por motivos aún desconocidos. De esta manera, la colonización puede ser asintomática durante mucho tiempo y no necesariamente llegan a desarrollarse los síntomas. Es por ello que los métodos sensibles de detección molecular sean los dirigidos principalmente a estos casos de infección asintomática. La detección e identificación de *X. fastidiosa* en laboratorio es más complicada en plantas asintomáticas que en plantas con síntomas y requiere métodos analíticos de elevada especificidad y sensibilidad, porque la cantidad de bacterias es más baja en plantas sin síntomas y su distribución suele ser bastante irregular en la planta. Puede resultar difícil aislar la bacteria, pero la detección serológica y molecular positiva debe llevar a la toma inmediata de medidas.

Resulta sorprendente, como ya se indicó en el Capítulo 1, la actual globalización del mercado del material vegetal de plantas frutales y ornamentales. Concretamente, al Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas han llegado en los últimos tres años muestras asintomáticas de esquejes, estaquillas u otros tipos de material de reproducción de muy distintas especies y orígenes. El mayor número de muestras importadas era de *Rubus idaeus*, *R. fruticosus*, *R. occidentalis* e híbridos de dicho género, seguidos de fresa, procedentes de EEUU, pero se recibieron también muestras de Argentina, Brasil, Costa Rica, Guatemala, Israel, Kenia, Marruecos y Tanzania de *Aster* sp., *Bidens* sp., *Dianthus* sp., *Fuchsia* sp., *Iberis* sp., *Juglans* sp., *Impatiens* sp., *Lagerstroemia* sp., *Lantana* sp., *Lobelia* sp., *Lavandula* sp., *Nemesia* sp., *Pelargonium* sp., *Rosmarinus* sp., *Salvia* sp., *Schefflera* sp. y *Verbena* sp. De todas ellas, las muestras de *Juglans* sp., procedentes de EEUU, y las de *Pelargonium* sp., de México, resultaron positivas para *X. fastidiosa*.

Por la gravedad del riesgo de introducciones de nuevas cepas de *X. fastidiosa* con plantas importadas, se deberían definir claramente las zonas libres de *X. fastidiosa* en la UE y en países terceros (tras intensivas prospecciones y rigurosos análisis) y no autorizar las importaciones de países terceros en los que no se sabe realmente si está presente la bacteria. Ello es debido a que existe riesgo, aunque figuren en la lista de países libres de *X. fastidiosa*, porque en algunos de ellos no se ha buscado la bacteria, o porque carecen de bacteriólogos

y laboratorios adecuados, como sería el caso de algunos países centroamericanos o africanos que no puedan asegurar su detección con fiabilidad.

Asimismo, los importadores españoles deberían limitar al mínimo imprescindible las importaciones de países en los que está presente la bacteria, aunque las plantas tengan la documentación en regla, porque el análisis de una muestra de 1 g de material vegetal no puede garantizar que un lote de plantas está libre de la bacteria, ya que solo demuestra que el análisis ha resultado negativo en la muestra analizada. Además, en algunos casos como en la vid, se aconseja usar termoterapia en el material importado, cuando sea posible.

Es necesario ser conscientes de que, según lo que hemos aprendido de la experiencia de Italia y de las intercepciones en distintos países europeos, el riesgo mayor es el de la introducción de planta contaminada de países terceros con infecciones latentes. En muchos de esos países los certificados fitosanitarios se emiten de acuerdo a inspecciones visuales y, obviamente, estas pueden no detectar la bacteria, salvo que haya síntomas claros de la misma, siendo muy frecuentes las infecciones latentes de *X. fastidiosa* en plantas ornamentales y cultivadas, que pueden durar varios años o no producir nunca síntomas. En estos casos, si está presente la bacteria en su xilema y de esta planta se alimenta un vector, este podrá transmitir la bacteria a nuevas plantas, algunas desarrollarán los síntomas y todas servirán de nuevas fuentes de inóculo.

4. Detección de *Xylella fastidiosa* en insectos vectores

El mejor modo de coleccionar insectos vectores adultos es mediante manguero, hoja pegajosa o aspiradores, ya que las trampas pegajosas no suelen ser efectivas con los insectos chupadores de xilema (Purcell *et al.*, 2014), aunque si caen también deben analizarse, previo enjuague con etanol/acetona. Los muestreos deben hacerse principalmente desde finales de primavera a principios de otoño. Si los ejemplares capturados no se analizan de modo inmediato se deben conservar en etanol 95-99 % o a -20 o -80 °C (las trampas pegajosas se pueden conservar enteras a -20 °C).

Puesto que *X. fastidiosa* solo coloniza el intestino anterior del insecto, solo debe emplearse la cabeza del mismo para la extracción de ADN, y de esta manera se evita la extracción de posibles inhibidores de la PCR (Purcell *et al.*, 2014). En Italia se ha comprobado que se puede hacer una muestra conjunta con hasta cinco ejemplares de *Philaenus spumarius*. En los ojos puede haber presencia de inhibidores, por lo que se recomienda quitarlos (EPPO, 2016c).

Los insectos se analizan por PCR (o LAMP), ya que el método serológico ELISA no tiene sensibilidad suficiente para la detección de *X. fastidiosa* en esta matriz, puesto que la bacteria, a pesar de multiplicarse en el tracto anterior del aparato digestivo, se encuentra normalmente en niveles poblacionales bajos (Purcell *et al.*, 2014). Para hacer la extracción del ADN, primero se ha de eliminar el solvente utilizado (etanol/acetona) colocando los insectos durante unos minutos en un papel de filtro seco e incluso en una centrifuga de secado al vacío. Se puede utilizar el protocolo de extracción con CTAB, aunque también existen diversos estuches de extracción para ello, pero en Europa no hay experiencia con ellos (EPPO, 2016c). Si se emplea la técnica de LAMP (ver apartado 6.1) no es necesario hacer extracción de ADN.

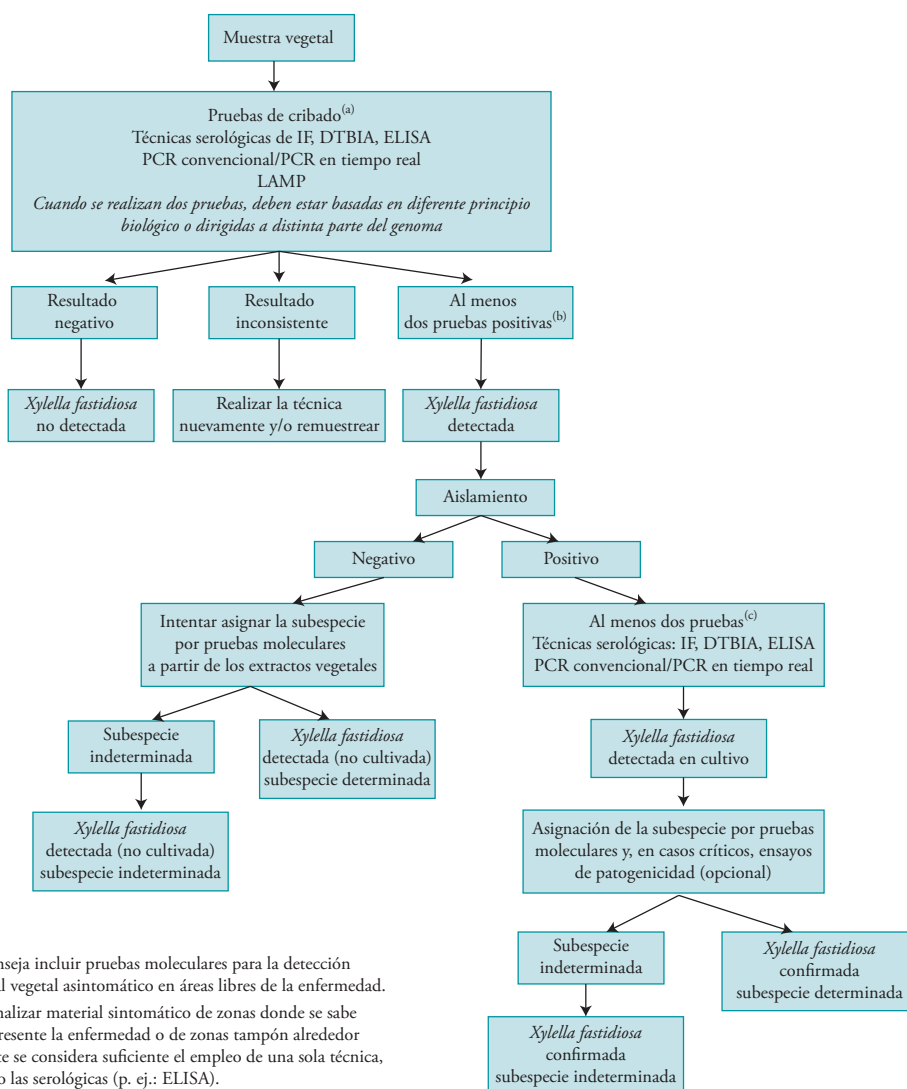
5. Protocolos de análisis de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)

Dada la importancia de las pérdidas causadas por *X. fastidiosa* y la carencia de protocolos universalmente aceptados que estuvieran disponibles en la década de 1990-2000, la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) publicó un primer protocolo en 2004 (PM7/24), que se basaba en los resultados de EEUU y detallaba los métodos para la detección de dicha bacteria particularmente en vid, incluyendo aislamiento, ELISA y PCR convencional.

Sin embargo, tras la detección de la bacteria en Italia y luego en Francia, dicho protocolo resultó insuficiente y obsoleto, por lo que la EPPO organizó un grupo de trabajo, a principios de 2016, del que formaban parte expertos de siete países, incluida España, a petición de la Comisión Europea. La misión era ampliar y actualizar dicho protocolo, incluyendo nuevas técnicas moleculares como PCR en tiempo real y LAMP, pero además integrar la información obtenida sobre nuevos huéspedes y los resultados de las validaciones de las técnicas evaluando su especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, repetibilidad, precisión, etc., en laboratorios de distintos países. El protocolo se publicó en pocos meses (EPPO, 2016c), es considerado el oficial para todos los laboratorios de los Estados miembros de la UE y permite a los usuarios del mismo conocer la sensibilidad esperada para cada técnica con distintas matrices vegetales o de vectores, e incorporar las de mayor interés en cada laboratorio, en función de su experiencia, equipamiento, huésped y número de plantas a analizar.

El diagrama de dicho protocolo para el análisis de material vegetal se muestra en la Figura 1, y a continuación se resumen brevemente las técnicas aconsejadas en el mismo, con sus ventajas e inconvenientes.

Figura 1. Diagrama de flujo para el procedimiento de diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal

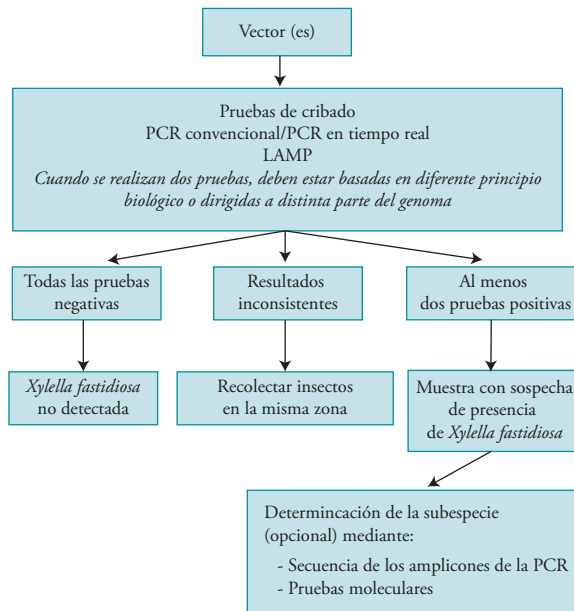


(a) Se aconseja incluir pruebas moleculares para la detección de material vegetal asintomático en áreas libres de la enfermedad.
 (b) Para analizar material sintomático de zonas donde se sabe que está presente la enfermedad o de zonas también alrededor de un brote se considera suficiente el empleo de una sola técnica, incluyendo las serológicas (p. ej.: ELISA).
 (c) Las pruebas moleculares para la asignación de subespecie puede emplearse para la confirmación de la identificación de *Xylella fastidiosa*.

Fuente: EPPO (2016c).

Para el análisis de vectores se utilizan las mismas técnicas, como se muestra en la Figura 2. Pero hay que señalar que se dispone todavía de escasa información sobre los protocolos optimizados de análisis para los vectores europeos, ya que en los casos de los brotes de Francia y España, aún no está claro cuál es la especie o especies de vectores implicados.

Figura 2. Diagrama de flujo para el procedimiento de diagnóstico de *X. fastidiosa* en insectos vectores



Fuente: EPP0 (2016c).

6. Métodos de análisis

6.1. Métodos moleculares

Se han descrito diversos protocolos de PCR, en tiempo final y en tiempo real, para la detección de *X. fastidiosa*. La PCR en tiempo real constituye la técnica de mayor sensibilidad actualmente disponible, y se puede emplear tanto con muestras vegetales como de insectos. Hay que tener en cuenta que un problema relativamente frecuente con algunas matrices vegetales es la presencia de inhibidores que pueden interferir en la detección, pero habitual-

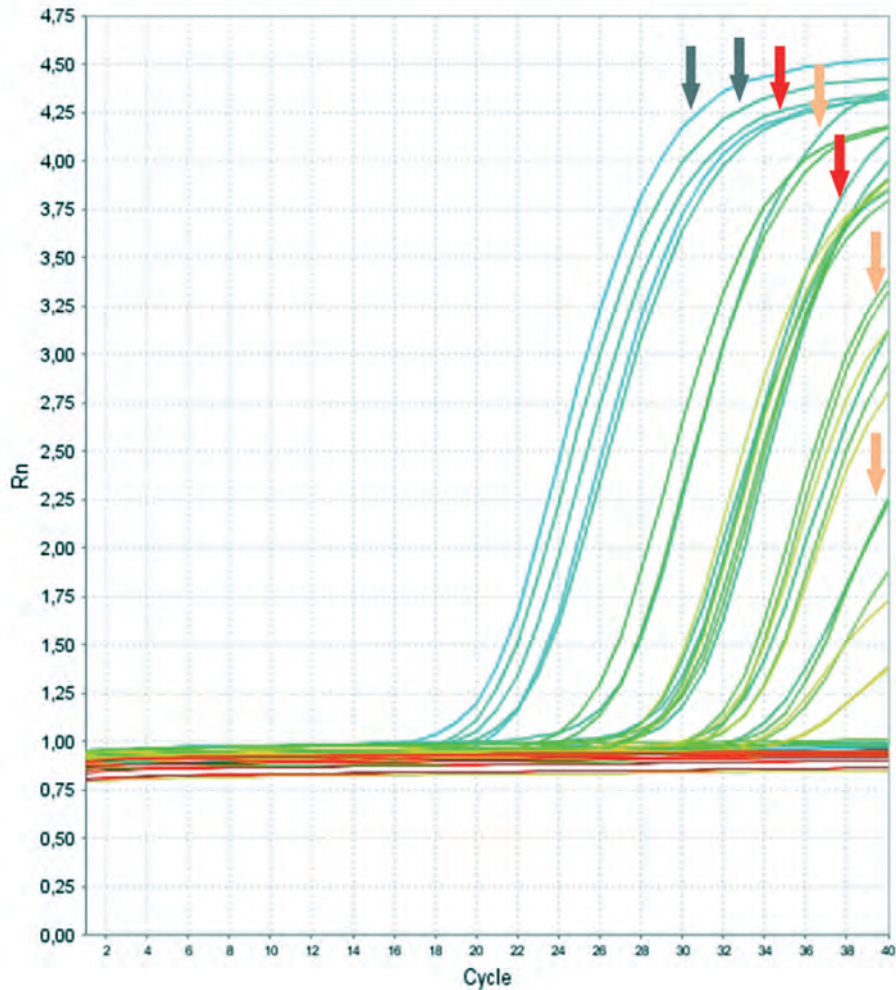
mente este efecto negativo se supera con un protocolo adecuado de extracción del ADN y con diluciones del extracto.

Un paso clave del proceso es la extracción del ADN. Se recomienda utilizar el protocolo del CTAB (Hendson *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003; de Souza *et al.*, 2003) o algunos de los estuches de extracción comercialmente disponibles que han sido validados en laboratorios europeos (EPPO, 2016); los datos de validación se pueden consultar en la base de datos de expertos en diagnóstico de la EPPO. Es esencial hacer pruebas de sensibilidad antes de utilizar rutinariamente algunos de los estuches que hay en el mercado, puesto que la extracción del ADN es una etapa muy importante que influye en el análisis posterior mediante PCR.

Varios protocolos de PCR (convencional y en tiempo real), seleccionados por la EPPO (EPPO, 2016), amplifican los fragmentos diana de todas las subespecies de *X. fastidiosa* y son utilizados para un primer cribado de las muestras. La PCR convencional desarrollada por Minsavage *et al.* (1994) ha sido muy utilizada y por eso se incluye en el protocolo EPPO. Tiene como diana una secuencia localizada en el extremo 3' del gen *rpoD*, que codifica un factor sigma-70 de la RNA polimerasa. El tamaño del amplicón es de 733 pares de bases y la sensibilidad de la técnica es inferior a la de la PCR en tiempo real.

Las dos PCR en tiempo real que se utilizan en los países de la UE, siguiendo el protocolo de la EPPO (EPPO, 2016), son las descritas por Francis *et al.* (2006) y Harper *et al.* (2010; erratum 2013). La PCR de Francis *et al.* (2006) tiene como secuencia diana un gen de una proteína hipotética conservada, HL, y el tamaño del amplicón es de 221 pares de bases. Y en la PCR de Harper *et al.* (2010; erratum 2013) la secuencia diana se encuentra localizada en el gen que codifica la proteína rimM de procesamiento del RNA ribosómico 16S. La sensibilidad de esta segunda PCR es mayor que la de la primera, y por ello, en ocasiones, cuando la cantidad de bacteria en la muestra es baja, es posible detectarla con la PCR de Harper *et al.* (2010) y no con la de Francis *et al.* (2006). En la Figura 3 se ilustra un resultado positivo de PCR en tiempo real, mostrando los Ct (*cycle threshold*), indicativos de la amplificación de la secuencia diana.

Figura 3. Gráfica de amplificación obtenida en el análisis de muestras naturalmente infectadas por *X. fastidiosa* mediante PCR en tiempo real según Harper *et al.* (2010, erratum 2013)



* Las flechas de color gris señalan las curvas exponenciales de dos controles positivos de amplificación de *Xylella fastidiosa* (cultivos puros de la bacteria inactivada por calor). Las flechas de color rojo señalan las curvas exponenciales de muestras de almendro (curvas más a la izquierda) y de olivo (curvas más a la derecha) de Alicante y Baleares, respectivamente, tomadas y analizadas en septiembre de 2017. Y las flechas de color rosa señalan las curvas exponenciales de diluciones decimales de esas mismas muestras. Los controles negativos corresponden a las líneas que no se levantan y no forman curvas exponenciales.

Fuente: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

La técnica de *loop mediated isothermal amplification* (LAMP), desarrollada también por Harper *et al.* (2010; erratum 2013) para *X. fastidiosa*, no se emplea en Europa de modo tan general como las PCR en tiempo real, pero se ha ensayado en Italia con diferentes huéspedes vegetales y con insectos, en este segundo caso incluso sin extracción previa del ADN (Yaseen *et al.*, 2015), por lo que en el protocolo de la EPPO se recomienda para este tipo de muestras. La sensibilidad no es generalmente tan elevada como la de la PCR en tiempo real.

6.2. Métodos serológicos

Desde que se identificó *X. fastidiosa*, hace cuatro décadas, se han ido desarrollando distintas técnicas serológicas para este patógeno y estuches de diagnóstico basados en dichas técnicas. Así, se dispone de al menos dos estuches para ELISA (Sherald y Lei, 1991), que han sido validados para su utilización en olivo, adelfa, almendro, cítricos, roble, vid y otras especies vegetales (Loconsole *et al.*, 2014). Puede emplearse tejido de hojas (incluyendo peciolo), tallos o ramillas (a los que se elimina la corteza) y la muestra se prepara en tampón de extracción adecuado, utilizando un mortero o un homogeneizador de tejido o robots apropiados.

También se desarrolló una técnica de inmunofluorescencia con fijación en membrana (MEIF, *membrane entrapment immunofluorescence*) (Hartung *et al.*, 1994), que se basa en la retención de las bacterias en membranas negras de policarbonato de 0,2 µm mediante filtración secuencial del extracto vegetal, y posterior tinción con sueros específicos. Las membranas se observan después en el microscopio de epifluorescencia. En 2004 se puso a punto también una técnica de inmunofluorescencia clásica (Carbajal *et al.*, 2004). La recientemente desarrollada técnica de inmunopresión (DTBIA, *direct tissue blot immunoassay*) (Djelouah *et al.*, 2014) es muy interesante porque permite la impresión directa en membrana, y posterior revelado de secciones directas de tejido (peciolo, ramillas) de olivo y otros huéspedes.

La sensibilidad de todas estas técnicas es menor que la de las técnicas moleculares, pero pueden ser muy útiles en zonas donde ya está presente la enfermedad, como Apulia (Italia), porque permiten procesar un gran número de muestras con rapidez y a un coste inferior al de las técnicas moleculares.

6.3. Aislamiento

El aislamiento de *X. fastidiosa* es difícil, incluso a partir de plantas con síntomas. Esta bacteria no crece en medios rutinarios de laboratorio, sino que requiere medios específicos como PD2 (Davis *et al.* 1980), BCYE (Wells *et al.*, 1981) y PWG (modificado de Hill y Purcell, 1995). Es recomendable emplear al menos dos de los medios citados para aumentar las posibilidades de éxito (EPPO, 2016c). Para el procesado de la muestra, esta se debe desinfectar superficialmente, a fin de evitar el crecimiento de organismos saprofitos, ya que *X. fastidiosa* es de crecimiento muy lento y puede quedar enmascarada en la placa de cultivo por organismos de crecimiento más rápido. Las colonias son pequeñas, con un diámetro de 1-1,5 mm después de 1-3 semanas de incubación a 28 °C (Figura 4). Las placas se deben sellar para prevenir la deshidratación del medio de cultivo, dado que los períodos de incubación son largos (hasta varias semanas).

Se han diseñado algunas estrategias con la finalidad de aumentar las probabilidades de lograr el aislamiento de *X. fastidiosa*, como la utilización de ultrasonidos que disgregan las estructuras de biopelícula que forma la bacteria en los vasos del xilema, liberando células individuales que pueden formar colonias en el medio de cultivo. También se ha intentado, con muestras leñosas como olivo o almendro, la impresión directa de secciones de tronco tras ligera presión para facilitar la salida de líquido xilemático.

Dada la dificultad del aislamiento, este método no se recomienda para la detección, basada en métodos independientes del cultivo, pero sí es aconsejable intentarlo, para disponer del cultivo bacteriano y poder estudiar sus características fenotípicas, patogenicidad, etc. y, particularmente, cuando se analizan huéspedes nuevos o cuando se trata de la primera detección de *X. fastidiosa* en una zona.

Figura 4. Colonias de *Xylella fastidiosa* en tres medios de cultivo diferentes: BCYE (Wells *et al.*, 1981), esquina superior izquierda; PWG (modificado de Hill y Purcell, 1995), esquina superior derecha; y PD2 (Davis *et al.*, 1980), parte inferior, tras 15 días de incubación a 28 °C



Fuente: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

6.4. Pruebas de patogenicidad

La verificación de la patogenicidad de los cultivos de *X. fastidiosa* es, en general, compleja y puede requerir varios meses de incubación de las plantas inoculadas. Los ensayos se hacen con plantas huéspedes en maceta. Deben ser plantas no herbáceas, con el tejido xilemático bien diferenciado, y se deben seleccionar las variedades más susceptibles, si se conocen. Las plantas, en crecimiento activo, deben mantenerse en invernadero de seguridad biológica,

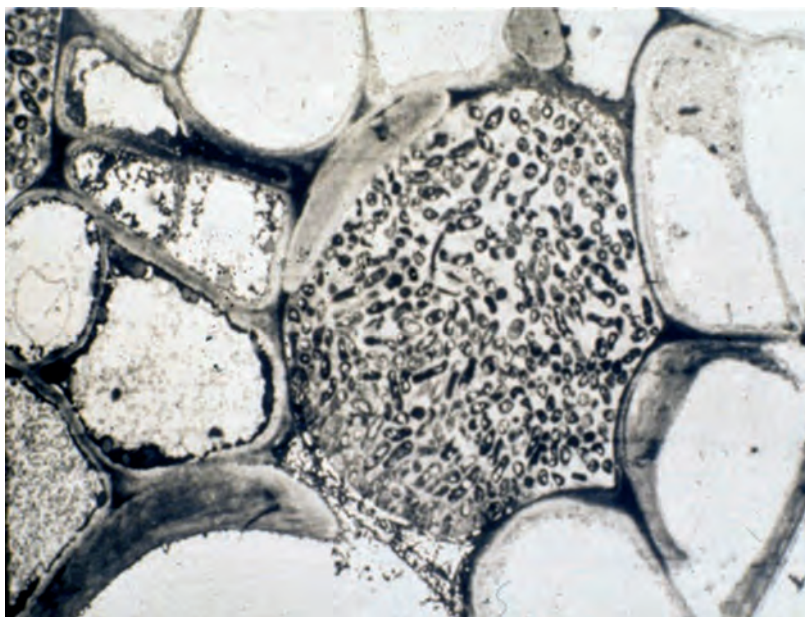
protegidas de insectos o en cámaras de crecimiento a 25-28 °C. Para las inoculaciones, el sustrato de la maceta debe estar seco y las condiciones experimentales deben favorecer la transpiración de la planta. Se deben incluir unas 10-15 plantas por experimento y al menos 3-5 plantas de controles positivos y otras tantas de negativos. En cuanto a las condiciones de crecimiento de la planta, dependen del huésped en cuestión.

Las técnicas de inoculación deben asegurar la infiltración directa en los vasos del xilema. El método más utilizado es la punción con aguja en el tallo, al nivel de inserción del peciolo, o un procedimiento general de pinchazo (Hill y Purcell, 1995; Almeida *et al.*, 2001). Para preparar el inóculo, las células bacterianas procedentes de medio de cultivo sólido se resuspenden en PBS o tampón succinato-citrato, intentando que la concentración de la suspensión sea alta (aproximadamente 10^9 ufc/mL). Se deposita una gota (de 10-50 μ L) de la suspensión en la axila de la hoja, pinchando varias veces con una aguja fina y repitiendo la inoculación en varias partes de la planta. Se espera de 5 a 10 minutos hasta que el inóculo se absorba. Alternativamente, puede pincharse directamente la planta con una aguja cargada con gotas de inóculo (10^8 ufc/mL). En los cítricos se puede emplear un método alternativo, levantando un trozo de corteza con una cuchilla y depositando 10-30 μ L de una suspensión 10^8 ufc/mL. Para plantas con muchos tallos (como *Polygala myrtifolia* o arándano), las inoculaciones deben realizarse en al menos dos tallos por planta. Para incrementar la efectividad, las plantas se pueden volver a inocular a las 3-8 semanas después de la primera inoculación.

6.5. Observación mediante microscopía electrónica

Dado que *X. fastidiosa* coloniza el xilema de las plantas formando agregados en los vasos y además la bacteria presenta una morfología bastante característica, la observación mediante microscopía electrónica de barrido o de transmisión puede ser útil para distinguir de manera no específica, pero sí orientativa, plantas afectadas por *X. fastidiosa*, de otras con sintomatología similar. La Figura 5 muestra el aspecto de un corte de los vasos de una planta infectada y la Figura 6, de una célula de la bacteria.

Figura 5. Micrografía electrónica de un corte transversal de tallo de una planta de vid infectada por *Xylella fastidiosa*



Fuente: fotografía de A. H. Purcell (EEUU, Berkeley, Universidad de California).

Figura 6. Micrografía electrónica de células de *Xylella fastidiosa*, con su característica forma bacilar



Fuente: fotografía de A. H. Purcell (EEUU, Berkeley, Universidad de California).

7. Identificación de *X. fastidiosa* y de sus subespecies

Existen diferentes pruebas moleculares para la asignación a nivel de subespecie de las distintas cepas de *X. fastidiosa* detectadas en un área determinada. Sin lugar a dudas, el análisis MLST basado en la amplificación y secuenciación en ambas direcciones de siete genes de mantenimiento (Yuan *et al.*, 2010) es el más utilizado actualmente y es el recomendado por la UE cuando ocurren nuevas detecciones (bien sean nuevos brotes o nuevos huéspedes). Estos siete genes codifican para la 2-isopropilmalato sintetasa (*leuA*); subunidad C1 de la ubiquinol citocromo c oxidoreductasa C1 (*petC*); ABC permeasa transportadora de azúcares (*malF*); sintasa del gen sirohemo (*cysG*); subunidad chi de la holoenzima DNA polymerase III (*holC*); subunidad NQO12 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (*nuoL*); y proteína simportadora del glutamato (*gltT*). El tamaño de los productos amplificados es de 708 pb para

leuA, 533 pb para *petC*, 730 pb para *malF*, 600 pb para *cysG*, 379 pb para *holC*, 557 pb para *nuoL* y 654 pb para *glfI*. En ciertos aislados hay veces que faltan 6 pb en la secuencia del gen *cysG*, o 30 pb en el gen *nuoL*.

Una vez obtenidas las secuencias en ambas direcciones, estas tienen que alinearse y ensamblarse eliminando las secuencias de los iniciadores. Posteriormente, las secuencias se cotejan mediante la herramienta de alineación y búsqueda (BLASTN), disponible en la base de datos pubMLST para genes MLST (<http://pubmlst.org/xfastidiosa>) para *X. fastidiosa*. A cada secuencia se le asigna un número y la combinación de estos números es la que indica la subespecie y grupo genético (hasta un total de 80 posibles en la actualidad). Además, esta herramienta permite identificar la existencia de recombinaciones genéticas, al presentar ciertas cepas alelos que son característicos de otras subespecies (Coletta-Filho *et al.*, 2017). Para inferir las relaciones filogenéticas entre cepas o su posicionamiento más preciso ante nuevas detecciones de grupos genéticos nuevos se procede a la concatenación de los siete genes y su análisis filogenético (o MLSA, del inglés *Multilocus Sequence Alignment*), tal y como se ha llevado a cabo para clasificar la nueva cepa de la subespecie *pauca* identificada en Ibiza (Ver Figura 2 en Capítulo 2 y Capítulo 12).

Por otro lado, se ha visto que en base a las secuencias del gen *rpoD* (Minsavage *et al.*, 1994) también se pueden diferenciar todas las subespecies de *X. fastidiosa*, incluyendo *morus* y *tashke*.

En otros casos, la asignación de subespecies puede realizarse por marcadores moleculares que son específicos de subespecie, en los que la amplificación o no de un producto del tamaño esperado, indica la asignación o no a esa subespecie. Por ejemplo, en la PCR de Pooler y Hartung (1995) la amplificación de un fragmento de 500 pb de tamaño indica la presencia de la subespecie *pauca* causante de clorosis variegada de los cítricos o quemadura del café, mientras que este producto no es amplificado por el resto de subespecies. También existe otro protocolo de PCR en tiempo real o cuantitativa que permite asignar un aislado o su secuencia a la subespecie *pauca* (cepas causantes de CVC) (Li *et al.*, 2013).

En la PCR de Hernández-Martínez *et al.* (2006), la utilización de tres parejas de iniciadores permite obtener combinaciones (patrones) de productos de amplificación que diferencian las subespecies *fastidiosa*, *multiplex*, y *sandyi*. Así, se obtienen los siguientes fragmentos: 638 pb con subsp. *sandyi* y *multiplex*; 521 pb con subsp. *multiplex*; 412 pb con subsp. *fastidiosa* y *multi-*

plex. Recientemente se ha observado que algunos aislados de la subsp. *pauca* amplifican los fragmentos de 412 pb y 638 pb.

Hay que indicar que las pruebas descritas se han desarrollado principalmente en cultivos puros, pero se puede utilizar en ADN extraído de las plantas, a excepción de la PCR múltiple de Hernández-Martínez *et al.* (2006) que produce patrones de amplificación poco consistentes cuando se utiliza ADN extraído de tejido vegetal. Sin embargo, hay que señalar que la cantidad y calidad de ADN diana, presencia de inhibidores en las matrices extraídas, o la aparición de posibles infecciones mixtas en las plantas analizadas, puede impedir la obtención de amplicones o la clara asignación de subespecies en ciertas muestras.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, al Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas, y a los proyectos POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y XF-ACTORS (*Xylella Fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy), del programa Horizonte 2020 de la UE, su apoyo y financiación.

Referencias bibliográficas

- ALMEIDA, R. P. P.; PEREIRA, E. F.; PURCELL, A. H. y LOPES, J. R. S. (2001): «Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange»; *Plant Disease* (85); pp. 382-386.
- CARBAJAL, D.; MORANO, K. A. y MORANO, L. D. (2004): «Indirect immunofluorescence microscopy for direct detection of *Xylella fastidiosa* in xylem sap.»; *Current Microbiology* (49); pp. 372-375.
- COLETTA-FILHO, H. D.; FRANCISCO, C. S.; LOPES, J. R.; MULLER, C. y ALMEIDA, R. P. (2017): «Homologous recombination and *Xylella fastidiosa* host-pathogen associations in South America»; *Phytopathology* (107); pp. 305-312.
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H. y THOMSON S. V. (1980): «Isolation medium for the Pierce's disease bacterium»; *Phytopathology* (70); pp. 425-429.

- DE SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; YANAI, G. M. *et al.* (2003): «Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity»; *Molecular Plant-Microbe Interactions* (16); pp. 867-875.
- DJELOUAH, K.; FRASHERI, D.; VALENTINI, F.; D'ONGHIA, A. M. y DIGIARO, M. (2014): «Direct tissue blot immunoassay for detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees»; *Phytopathologia Mediterranea* (53); pp. 559-564.
- EPPO (2016a): «PM 3/81 (1) Inspection of consignments for *Xylella fastidiosa*»; *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 46(3); pp. 395-406.
- EPPO (2016b): «PM 3/82 (1) Inspection of places of production for *Xylella fastidiosa*»; *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 46(3); pp. 407-418.
- EPPO (2016c): «PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*»; *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 46(3); pp. 463-500.
- FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA ROSA, J.; DODDAPANENI, H. y CIVEROLO, E. L. (2006): «Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*»; *European Journal of Plant Pathology* (115); pp. 203-213.
- HARPER, S. J.; WARD, L. I. y CLOVER, G. R. G. (2010): «Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications»; *Phytopathology* (100); pp. 1282-1288.
- HARTUNG, J. S.; BERETTA, J.; BERLANSKY, R. H.; SPISSO, J. y LEE, R. F. (1994): «Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*»; *Phytopathology* (84); pp. 591-597.
- HENDSON, M.; PURCELL, A. H.; CHEN, D.; SMART, C.; GUILHABERT, M. y KIRKPATRICK, B. (2001): «Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*»; *Applied and Environmental Microbiology* (67); pp. 895-903.
- HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; COSTA, H. S.; DUMENYO, C. K. y COOKSEY, D. A. (2006): «Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay»; *Plant Disease* (90); pp. 1382-1388.

- HILL, B. L. y PURCELL, A. H. (1995): «Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*»; *Phytopathology* (85); pp. 209-212.
- LI, W.; TEIXEIRA, D. C.; HARTUNG, J. S.; HUANG, Q.; DUAN, Y.; ZHOU, L. *et al.* (2013): «Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis»; *Journal of Microbiological Methods* (92); pp. 79-89.
- LOCONSOLE, G.; POTERE, O.; BOSCIA, D.; ALTAMURA, G.; DJELOUAH, K.; EL-BEAINO, T. *et al.* (2014): «Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods»; *Journal of Plant Pathology* (96); pp. 7-14.
- MINSAVAGE, G. V.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS, D. L.; LEITE, R. M. V. B. C. y STALL, R. E. (1994): «Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue»; *Phytopathology* (84); pp. 456-461.
- POOLER, M. R. y HARTUNG, J. S. (1995): «Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis»; *Current Microbiology* (31); pp. 377-381.
- PURCELL, A. H.; PORCELLI, F.; CORNARA, D.; BOSCO, D. y PICCIAU, L. (2014): «Characteristics and identification of xylem-sap feeders»; *Workshop Manual* ftp://ftpfiler.to.cnr.it:21001/Xylella_symposium/Workshop%20manuals/WORKSHOP%20MANUAL%20INSECTS.pdf [last accessed 2016-26].
- RODRIGUES, J. L. M.; SILVA-STENICO, M. E.; GOMES, J. E.; LOPES, J. R. S. y TSAI, S. M. (2003): «Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and gyrB Sequences»; *Applied and Environmental Microbiology* (69); pp. 4249-4255.
- SHERALD, J. L. y LEI, J. D. (1991): «Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees»; *Plant Disease* (75); pp. 200-203.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; NYLAND, G. y LOWE S. K. (1981): «Medium for isolation and growth of bacteria associated with Plum leaf scald and Phony peach diseases»; *Applied Environmental Microbiology* (42); pp. 357-363.

- YASEEN, T.; DRAGO, S.; VALENTINI, F.; ELBEAINO, T.; STAMPONE, G.; DIGIARRO, M. *et al.* (2015): «On-site detection of *Xylella fastidiosa* in host plants and in 'spy insects' using the real-time loop-mediated isothermal amplification method»; *Phytopathologia Mediterranea* (54); pp. 488-496.
- YUAN, X.; MORANO, L.; BROMLEY, R.; SPRING-PEARSON, S.; STOUTHAMER, R. y NUNNEY, L. (2010): «Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States»; *Phytopathology* (100); pp. 601-611.