



Polygala myrtifolia contaminada de *Xylella fastidiosa* en Córcega (Anses-B. Legendre).

Situación actual en Francia con respecto a *Xylella fastidiosa*: desarrollos recientes y validación del método de detección en plantas y en el vector *Philaenus spumarius*

Poliakoff F., Legendre B., Juteau V., Molusson D., Dintheer A., Sainte-Luce A., Dousset C., Audusseau C., Paillard S., Cunty A., Olivier V.

ANSES-LSV, Angers
cedex 01 - France (P4)
*francoise.poliakoff@anses.fr

El método validado (MA039) que se usa en Francia para detectar *Xylella fastidiosa* en muestras de plantas en el marco de un sistema de vigilancia regulado se basa en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real (Harper y col., 2010) aplicada al ADN de la planta que se extrae con el kit QuickPick SML (Bio-Nobile). La tipificación multilocus de secuencias (MLST, por sus siglas en inglés) (Yuan y col., 2010, EPPO PM7/24) se utiliza para identificar tipos de secuencia y subespecies. Hasta el momento, la bacteria *X. fastidiosa* subespecie *multiplex* se ha encontrado en aproximadamente cuarenta especies de plantas, principalmente ornamentales, de la zona mediterránea. Los métodos empleados se han optimizado a fin de mejorar su sensibilidad en matrices de plantas como el olivo y el roble, además de en el insecto vector *Philaenus spumarius*. Por ello, deberían contribuir a la revisión del protocolo de la Organización Europea de Protección de Plantas (EPPO, por sus siglas en inglés).

Análisis de los sistemas de vigilancia en Francia

En Francia, *Xylella fastidiosa* se detectó por primera vez en condiciones naturales en 2015 en Córcega y en la región de la Provenza-Alpes-Costa Azul (PACA). Desde entonces, se han analizado más de 30.000 muestras a nivel nacional en el Laboratorio de Sanidad Vegetal (LSV) de la Agencia Nacional de Seguridad Sanitaria de los Alimentos, el Medio Ambiente y el Trabajo (ANSES) y la red nacional de laboratorios autorizados.

Córcega: alta presencia de la bacteria en condiciones naturales

Desde la identificación del primer brote de *X. fastidiosa* subespecie *multiplex* en Francia en julio de 2015, en Córcega del Sur, se ha puesto en práctica un programa importante de vigilancia (17.000 muestras) y se han realizado investigaciones que demuestran que la bacteria está muy extendida en la isla, especialmente en el litoral sur. En la actualidad, el porcentaje de muestras con resultados positivos es del 5,5%; la mayoría de las muestras proceden de zonas urbanas (jardines públicos y privados) y de hábitats naturales (brezales silvestres). Desde la notificación de la Comisión Europea del 2 de febrero de 2018, se ha establecido en toda Córcega una estrategia de contención. La bacteria ha sido detectada en unas cuarenta especies de plantas huéspedes. Las principales plantas huéspedes son: *Polygala myrtifolia* (que representa el 54% de las plantas con resultados de infección positivos), *Calicotome villosa* (11%), *Helichrysum italicum* (9%), *Cistus monspeliensis* (6%), *Lavandula stoechas* (2%), *Spartium junceum* (2%), *Genista corsica* y *Myrtus communis* (1%). Todas ellas tienen en común el hecho de ser endémicas y típicas de los brezales silvestres de Córcega. En términos de incidencia por especie examinada (con resultados positivos), las tres especies de plantas con los valores más altos son *Calicotome villosa* (33%), *Polygala myrtifolia* (20%) y *Spartium junceum* (19%).

Casi el 62% de los brotes de *X. fastidiosa* en Córcega se encuentran en altitudes inferiores a 100 m, principalmente en zonas litorales. Sin embargo, existen también informes de

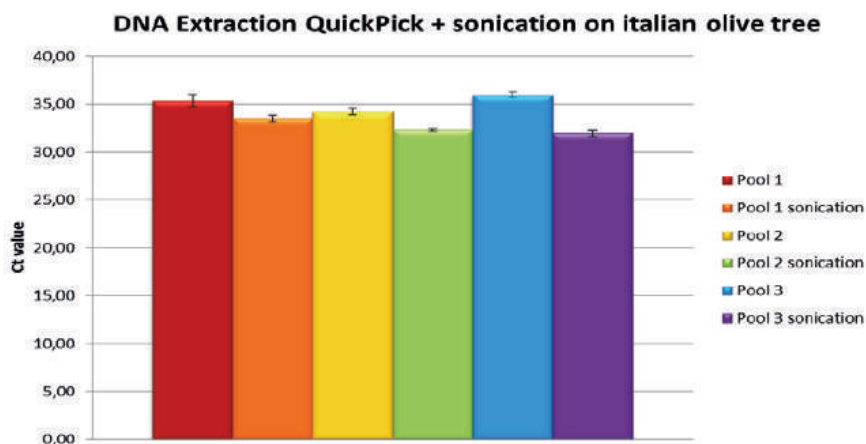


Figura 1. Efecto de la sonicación en valores Ct (Harper y col., 2010) con uso del kit QuickPick™ DNA en muestras de grupos de olivos infectados.

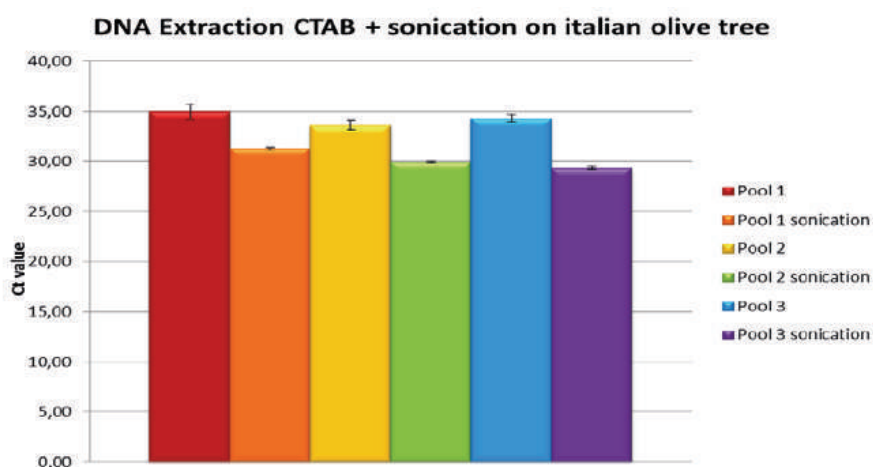


Figura 2. Efecto de la sonicación en valores Ct (Harper y col., 2010) con extracción de ADN mediante CTAB en muestras de grupos de olivos infectados.

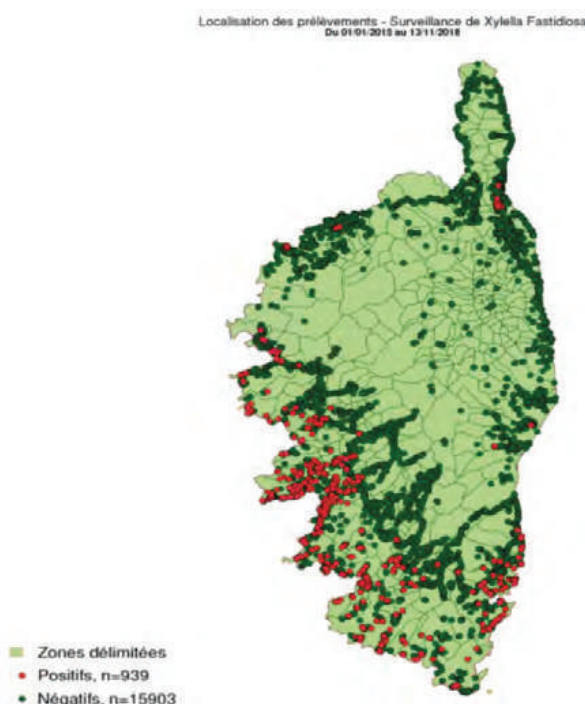


Figura 3. Resultados de los estudios de *Xylella fastidiosa* en Córcega.

brotos en áreas más altas, entre 700 y 950 m; nos encontramos, así, ante un gran número de focos en hábitats naturales (brezales y bosques silvestres) (Figura 3).

PACA: presencia esporádica en áreas urbanas

La primera detección de *X. fastidiosa* en *Polygala myrtifolia* en la ciudad de Niza en octubre de 2015 pone de evidencia también la presencia de la subespecie *multiplex*. Hasta la fecha, el porcentaje de muestras recogidas con resultados positivos alcanza aproximadamente el 2%. Se han encontrado principalmente en los departamentos de Var y los Alpes Marítimos. El 19% de las especies infectadas son plantas hortícolas: *Polygala myrtifolia* (que representa el 60% de las muestras positivas), *Spartium junceum* (11%), *Euryops chysanthemoides* (10%), *Helichrysum italicum* (6%), *Lavandula* sp (3%) y *Lavandula angustifolia* (2%). En 2016, la subespecie *pauca* se identificó en tres plantas de *Polygala myrtifolia* en un solo foco, en Menton, cerca de la frontera con Italia. Todas las pruebas realizadas desde que se ha erradicado la subespecie en el foco de Menton indican que no hay más infecciones (Figura 4): Los nuevos focos descubiertos se encuentran principalmente en zonas urbanas o semiurbanas.

Organización de los laboratorios franceses en el marco de la vigilancia de *Xylella fastidiosa*

Como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) nombrado por el Ministerio de Agricultura, Agroalimentación y Silvicultura, el Laboratorio de Sanidad Vegetal (ANSES-LSV) lleva a cabo varias misiones. Se encarga de la caracterización, evaluación y validación de los métodos de detección e identificación, con el fin de proponer protocolos de análisis fiables y validados para el uso previsto, especialmente para la implementación de planes de seguimiento y controles oficiales. El proceso de validación de un método de detección por parte de LSV-ANSES se realiza a través de pruebas dentro de los laboratorios y entre varios laboratorios, de acuerdo con estándares de ANSES y de EPPO, como, por ejemplo, PM7/98.

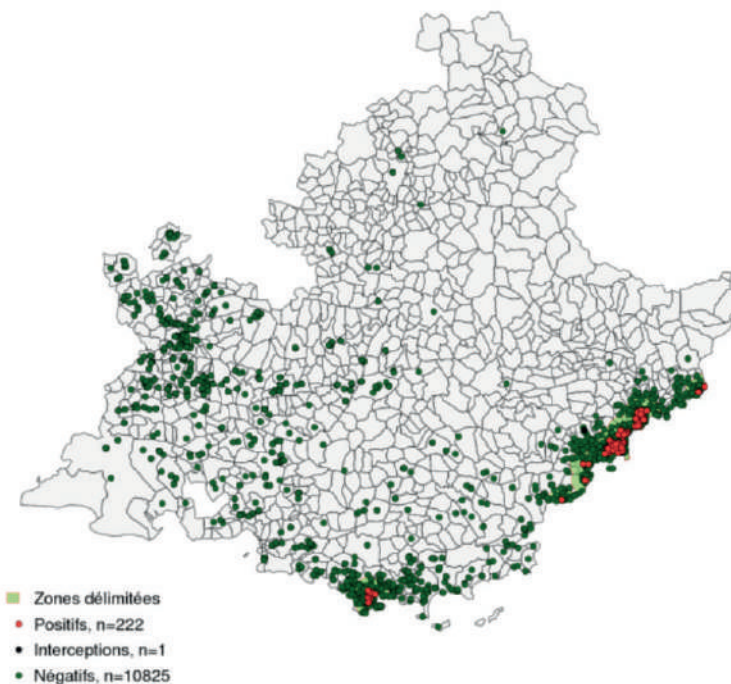


Figura 4. Resultados de los estudios de *Xylella fastidiosa* en el área de PACA.

/ El método MA039 se puede utilizar en cualquier laboratorio, ya que no hay riesgos relacionados con la manipulación de productos tóxicos /

Los laboratorios aprobados por el Ministerio de Agricultura para los análisis de primera línea (detección de la bacteria en la matriz vegetal) realizan los análisis oficiales. El LNR supervisa esta red de laboratorios y

realiza análisis de confirmación y de identificación de subespecies.

Método oficial de detección de *Xylella fastidiosa*

Método de detección de *Xylella fastidiosa* en plantas

En 2012, el ANSES-LSV se centró en la evaluación y optimización de los métodos moleculares dados a conocer en publicaciones especializadas para la detección de *X. fastidiosa*, con objeto de proponer al Ministerio un método validado oficialmente. La validación de un método tiene como objetivo el verificar si los criterios de rendimiento evaluados alcanzan los niveles requeridos de sensibilidad y especificidad de diagnóstico, sensibilidad (límite de detección) y especificidad analítica, repetibilidad y reproducibilidad.

El método de detección de *X. fastidiosa* MA039 en material vegetal, que se validó y publicó en 2015 como método oficial en Francia, se basa en la extracción de ADN con el kit comercial QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) con los robots KingFisher™ mL o Flex (Thermo Fisher Scientific) y en la PCR en tiempo real (Harper y col., 2010). Este método tiene la ventaja de que se puede uti-

lizar en cualquier laboratorio, pues no hay riesgos relacionados con la manipulación de productos tóxicos. Puede aplicarse a cualquier planta huésped de *X. fastidiosa*, sea o no sintomática. Las pruebas de comparación entre laboratorios organizadas en el marco de los proyectos Euphresco y PONTE han proporcionado datos adicionales, que refuerzan la base de datos de validación de este método. Este hecho ha permitido la integración del método en la norma EPPO PM7/24 (2016), específica para el diagnóstico de *X. fastidiosa*.

Diversos trabajos realizados en el marco del proyecto PONTE H2020 y de pruebas entre laboratorios indican una mayor sensibilidad analítica (umbral de detección) en el olivo con extracción de ADN mediante CTAB, frente a la extracción de ADN con QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile). Tras la realización del trabajo de evaluación, el ANSES-LSV propone un método optimizado para el seguimiento de *X. fastidiosa* en matrices de olivos y robles, ricos en componentes inhibidores que se sabe que reducen la eficacia de la extracción de ADN y de la PCR. Este nuevo método incluye una fase de sonicación (con ultrasonidos) antes de la extracción del ADN con un tampón CTAB; la reacción PCR (Harper y col., 2010) se realiza en tiempo real con más ADN de plantilla (4 µL, en lugar de 2 µL, como se ha descrito en estudios anteriores). Se ha observado además que la adición de la fase de sonicación mejora la sensibilidad analítica del método al utilizar el kit comercial QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) para la extracción de ADN (Figuras 1-2).

Método de detección de *Xylella fastidiosa* en vectores

La bacteria *X. fastidiosa* se transmite a través de insectos que se alimentan de la savia del xilema. Se conocen solo algunos grupos de hemípteros, todos pertenecientes al suborden Auchenorrhyncha, que son vectores efectivos de la enfermedad. Se trata principalmente de cicadélidos, salivazos, afrofóridos y chicharras. Hasta la fecha, *Philaenus spumarius* es el único insecto vector eficiente identificado en Italia. En Francia, las muestras recogidas en áreas de bro-

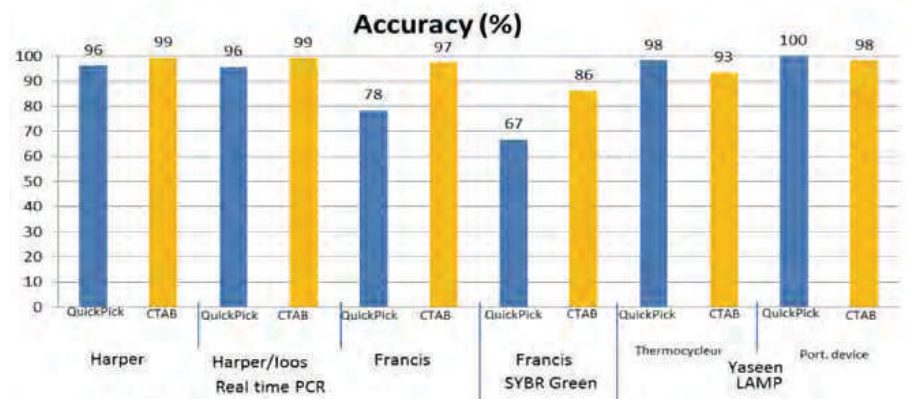


Figura 5. Comparación de la precisión de los métodos para la detección de *Xylella fastidiosa* en *Philaenus spumarius* en el marco del estudio sobre el rendimiento de métodos realizados en varios laboratorios

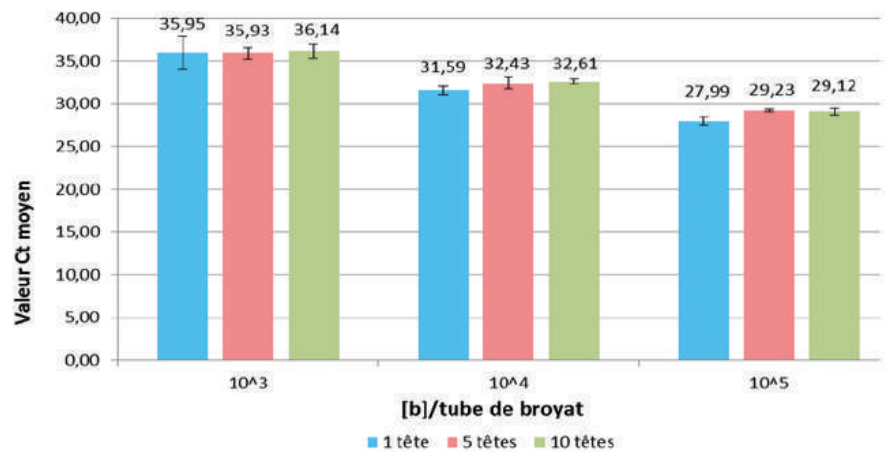


Figura 6. Impacto de muestras compuestas de 5 -10 individuos (insectos) en la detección de *Xf* en concentraciones de 10³, 10⁴, 10⁵ b/tubo.

Performance criteria	Amplification Harper et al., 2010 (Erratum 2013) loos et al, 2009 (internal control)	
6 concentrations X 3 extractions X 2 PCR X 3 days = 108 PCR per method	Spiked <i>Philaenus spumarius</i> with <i>X. f. subsp. fastidiosa</i> (0 to 10 ⁵ bact./head)	
DNA Extraction (spiking <i>X. f. subsp. fastidiosa</i>)	QuickPick™ (Bionobile) + KingFisher™ mL	Blood and Tissue Kit (Qiagen)
Diagnostic sensitivity	100%	100%
Diagnostic specificity	100%	100%
Repeatability	91%	87%
Analytical sensitivity- Detection limit (with 100% of detection)	≈ 10 ³ bact./head	≈ 10 ⁴ bact./head

Tabla 1. Criterios de rendimiento del método de detección de *Xylella fastidiosa* en *Philaenus spumarius*.

tes de *X. fastidiosa* en Córcega y de la Riviera Francesa (PACA) han dado resultados positivos con porcentajes del 12% y 9%, respectivamente.

El ANSES-LSV ha realizado estudios sobre los insectos. Se ha optimizado y validado un método de detección mediante PCR en tiempo real en un individuo de *Philaenus spumarius* basándose en la extracción de ADN con QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) y mediante PCR doble en tiempo real, una específica para

X. fastidiosa (Harper y col., 2010) y otra para eucariotas, como control interno de PCR (Loos y col., 2009). La evaluación de los criterios de rendimiento del método en insectos triturados infectados en laboratorio con la bacteria ha arrojado buenos resultados en cuanto a la sensibilidad analítica, la especificidad, la repetición y la repetibilidad (Tabla 1). En 2017, un estudio paralelo entre laboratorios sobre el rendimiento propuesto por ANSES dentro del marco de los

proyectos POnTE H2020 y EUPHRES-CO PROMODE permitió evaluar los métodos de práctica disponibles en la red de socios europeos (con participación de veinte laboratorios) en torno a insectos de naturaleza infecciosa (positivos) e insectos triturados e infectados artificialmente. De acuerdo con el estudio, los siguientes métodos son fiables: extracción de ADN mediante CTAB o con el kit QuickPick™ SML Plant DNA en combinación con PCR en tiempo real (Harper y col., 2010), PCR doble en tiempo real (Harper y col., 2010, loos y col., 2009) o PCR LAMP (Yassen y col., 2015) (Figura 5).

Asimismo, la evaluación de la fiabilidad del agrupamiento de insectos para la detección de *X. fastidiosa* dio resultados prometedores. El uso de cinco, diez o quince individuos no afecta la sensibilidad analítica de la detección de *X. fastidiosa*, frente al método usado anteriormente con un individuo. (Figuras 6-7).

Método de identificación de subespecies en material vegetal

La identificación de subespecies de aislados, adoptada por ANSES-LSV en 2015, en colaboración con el INRA (Denancé y col., 2017), se realiza mediante MLST específica para *X. fastidiosa* (adaptado de Yuan y col., 2010). La técnica de MLST se basa en el análisis de las secuencias parciales de siete genes constitutivos. Hasta la fecha, se han descrito 86 tipos de secuencias (ST) en la base de datos PubMLST sobre *X. fastidiosa* (<https://pubmlst.org/xfastidiosa/>). La ventaja de este método es que se puede usar directamente con extractos de plantas, sin necesidad de aislar la bacteria, un proceso que precisa de un periodo largo de tiempo para obtener colonias.

En las muestras positivas de Francia, los tipos de secuencia que se han encontrado son ST6 y ST7, lo que indica que las cepas francesas son de la subespecie *multiplex*. La excepción se ha encontrado en Menton (PACA), donde se ha identificado la subespecie *pauca* ST53 en tres muestras (Figuras 8-9). En algunas ocasiones se han encontrado dificultades durante la tipificación, como la falta de amplificación de un gen en algunas plantas huésped, la mala ca-

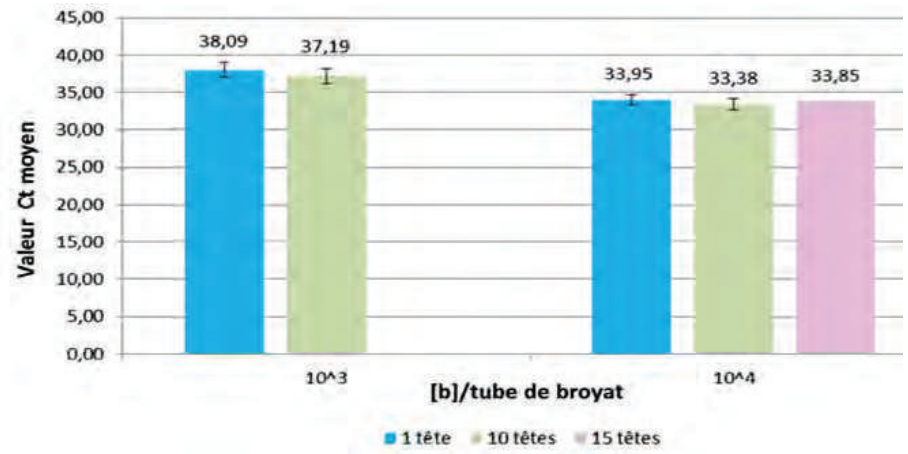


Figura 7. Impacto de muestras compuestas de 10-15 individuos (insectos) en la detección de *Xf* en concentraciones de 10³ y 10⁴ b/tubo.

Répartition des sous-espèces de *Xylella fastidiosa* (foyers total)

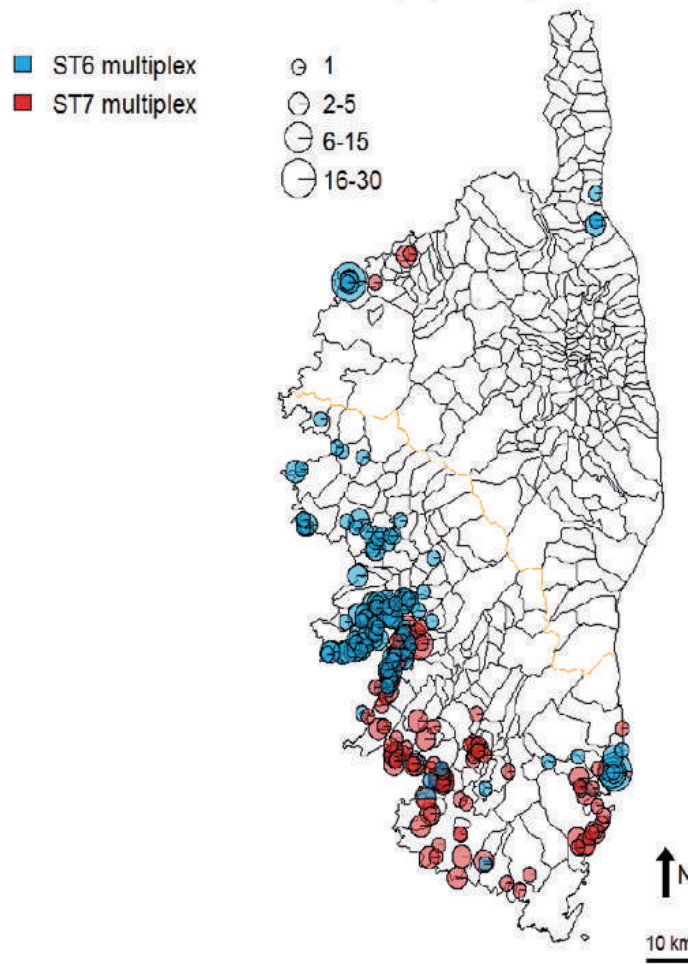


Figura 8. Subespecies de *Xylella fastidiosa* en Córcega.

lidad o la falta de una parte de las secuencias obtenidas. Esta tipificación incompleta se debe en la mayoría de los casos a una población bacteriana baja en las muestras o a la presencia de inhibidores de la PCR.

El análisis de las combinaciones de loci

muestra que dos genes constitutivos son suficientes para asignar el aislado a nivel de subespecie (*cysG* y *malF*). El LSV también ha observado una mejora en la eficiencia de la amplificación de los genes de mantenimiento al añadir la albúmina de suero bovina

(BSA) a 0,3µg/µL a la mezcla de reacción PCR. Esto ha sido objeto de un ensayo de validación, cuyos datos se han proporcionado a la EPPO para la revisión del protocolo PM7/24.

Conclusiones y perspectivas

Se ha podido contrastar hasta cierto punto el impacto de los diferentes aislados de *X. fastidiosa* en las diferentes regiones. La situación en las regiones de PACA y Córcega parece ser diferente a la de Italia o España. Las infecciones se han observado principalmente en especies de plantas ornamentales (*Polygala myrtifolia*) o en especies de plantas específicas del paisaje mediterráneo (como, por ejemplo, *Helichrysum italicum*, *Calicotome villosa*, *Cistus monspeliensis* o *Spartium junceum*) y esporádicamente en *Prunus*. A diferencia de la muerte masiva de los olivos y almendros en Apulia (Italia) y Alicante (España), respectivamente, no se ha observado ninguna muerte extendida en huertos o hábitats naturales de Francia y, hasta ahora, la producción de vid, cítricos u olivos no se ha visto afectada.

Desde 2015, el LSV ha recogido más de cincuenta aislados de cepas, en el marco del plan de vigilancia que hace posible seguir las rutas de invasión de la bacteria en Francia. El aporte de los nuevos elementos permitirá ampliar el conocimiento sobre la epidemiología de la bacteria y su evolución en el marco de colaboración entre ANSES e INRA.

En cuanto a la detección en vectores, se evaluará el rendimiento del método en otros vectores distintos a *Philaenus spumarius*. Se está llevando a cabo una evaluación del impacto de las muestras compuestas de insectos

Répartition des sous-espèces de *Xylella fastidiosa* (foyers total)

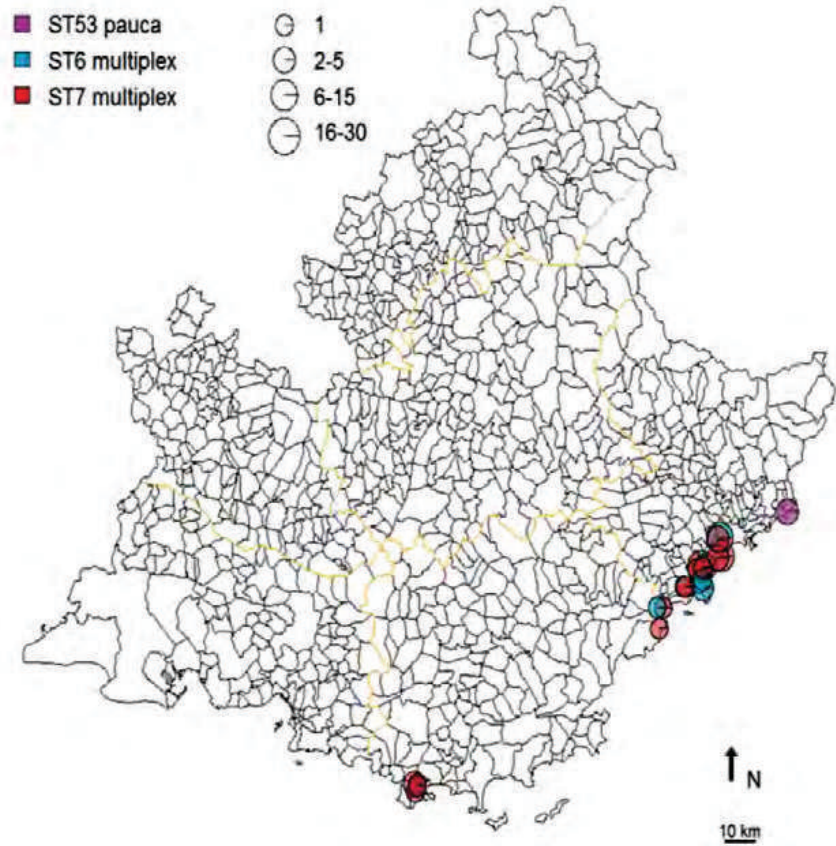


Figura 9. Subespecies de *Xylella fastidiosa* en el área de PACA.

en la caracterización de la subespecie mediante la MLST y la calidad de la secuenciación. Los primeros resultados son prometedores.

Abstract

The validated method (MA039) used in France to detect *Xylella fastidiosa* in plant samples in the framework of regulated surveillance is based on a Real-Time PCR (Harper y col., 2010) applied on plant DNA extracted with the QuickPick SML kit (Bio-Nobile). The MLST (Multi Locus Sequen-

ce Typing) (Yuan y col., 2010, EPPO PM7/24) scheme is applied to identify the sequence types and the subspecies. Until now the bacterium *X. fastidiosa* subspecies multiplex was mostly detected on about forty plant species, mainly ornamental of the Mediterranean area. These methods were optimized to improve their sensitivity on plant matrices such as olive tree, oak and on the insect vector *Philaenus spumarius*. They should contribute to the revision of the EPPO protocol.

Bibliografía

- Denancé N., Legendre B., Briand M., y col. 2017. Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France. *Plant Pathology* 66, 1054-64.
- Harper S.J, Ward L.I., G.R.G.C. 2010. Development of LAMP and Real-Time PCR Methods for the Rapid Detection of *Xylella fastidiosa* for Quarantine and Field Applications. *Phytopathology* 100, 1282-8.
- Ioos R., Fourrier C., Iancu G., Gordon T.R. 2009. sensitive detection of fusarium circinatum in pine seed by com. *The American Phytopathological Society* 99, 0582-90.
- Yaseen T., Drago S., Valentini F. y col. 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, 488-96.
- Yuan X., Morano L., Bromley R., Spring-Pearson S., Stouthamer R., Nunney L. 2010. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology* 100, 601-11.