



# ***Xylella fastidiosa*, un problema global: enfermedades que causa, diagnóstico y control**

**Ana Palacio-Bielsa**

**Unidad de Sanidad Vegetal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 - (CITA-Universidad de Zaragoza)**



**Instituto Universitario de Investigación Mixto  
Agroalimentario de Aragón  
Universidad Zaragoza**

# Un poco de historia: La enfermedad de Pierce de la vid

## *El agente causal es una bacteria...*

- Enfermedad de Pierce de la vid conocida desde el siglo XIX (Pierce, 1884). Agente causal desconocido.



**Davis et al. 1978. Science 199: 73-77**

### Pierce's Disease of Grapevines:

#### Isolation of the Causal Bacterium

**Abstract.** A Gram-negative, rod-shaped bacterium has been consistently isolated from grapevines with Pierce's disease. Grapevines inoculated with the bacterium developed Pierce's disease, and the bacterium was reisolated from the plants. The bacterium was serologically and ultrastructurally indistinguishable from the one in naturally infected plants, and also indistinguishable from a bacterium isolated from almonds with almond leaf scorch disease.

The etiological agent of Pierce's disease (PD), an important and often devastating disease of grapevines (*Vitis vinifera* L.) (1), is also considered to cause alfalfa dwarf (2) and almond leaf scorch diseases (3). Prior to 1971, PD was considered to be a viral disease (4), but chemotherapy, thermotherapy, and electron microscopy subsequently implicated the "rickettsia-like" organism seen in the xylem vessels of diseased grapevines as the etiological agent (2, 5, 6). Many investigators have reported failure to isolate the PD pathogen from diseased plants using artificial media (2, 6, 7). Similar insect-vectored bacteria

constitute a new group of plant pathogenic bacteria (8).

Recently, a Gram-positive, catalase-negative bacterium that could be isolated from infectious leafhopper vectors but not from diseased plants was reported to be the etiological agent of PD (7). However, this bacterium did not infect healthy plants following direct inoculation, and contradictory evidence as to its causal role has been reported (9).

We now report the consistent culture of a Gram-negative, catalase-positive bacterium from grapevines with PD, and evidence that this bacterium causes PD. A rod-shaped, Gram-negative, bacte-

istics were obtained from 97.4 percent (111/116) of the diseased plants. Only one plant in each group of healthy plants, or a total of 2.5 percent (2/79), yielded bacteria with colonies resembling those of the PD bacterium. Other bacteria were rarely isolated from diseased or healthy plants.

The pathogenicity of the PD bacterium was tested by inoculating green stem cuttings of the grapevine varieties Pinot Noir, Mission, and Ruby Cabernet. The upper end of each two- or three-node cutting with leaves intact was attached to a vacuum pump, and 0.1 to 0.2 ml of a turbid suspension of the PD bacterium (approximately  $5 \times 10^8$  bacteria per milliliter) in sterile tap water was drawn into each cutting. Controls consisted of non-inoculated cuttings and cuttings inoculated with sterile tap water alone, or with suspensions of *Erwinia amylovora* ( $8 \times 10^8$  bacteria per milliliter). After inoculation, the cuttings were rooted on a heated bench under intermittent mist for 14 days and transplanted. Typical PD symptoms (1) developed in 86 percent (43/50) of the cuttings inoculated with the

**Davis et al. 1980. Phytopathology 70: 425-429**

Techniques

### Isolation Media for the Pierce's Disease Bacterium

M. J. Davis, A. H. Purcell, and S. V. Thomson

Former graduate research assistant and assistant professors, respectively, Departments of Plant Pathology and Entomological Sciences (second author), University of California, Berkeley 94720. Present addresses of first and third authors: Department of Plant Pathology, Cook College, Rutgers University, New Brunswick, NJ 08903; and Department of Biology, Utah State University, Logan 84322, respectively.

We thank Donald L. Hopkins, University of Florida, IFAS, Leesburg, 32748, for assistance in a part of this study. Accepted for publication 9 November 1979.

### ABSTRACT

DAVIS, M. J., A. H. PURCELL, and S. V. THOMSON. 1980. Isolation medium for the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology* 70:425-429.

Media supporting the first isolations of the xylem-limited bacterium causing Pierce's disease of grapevines and almond leaf scorch contained PPLO broth base, hemin chloride, bovine serum albumin or starch, and agar. Modifications of these media led to the formulation of the PD2 medium containing (in grams per liter): Tryptone (4.0), Soytone or Phytone (2.0), trisodium citrate (1.0), disodium succinate (1.0), hemin chloride (0.01),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (1.0),  $KH_2PO_4$  (1.0),  $K_2HPO_4$  (1.5), Bacto-agar (15.0), and bovine serum albumin fraction five (2.0). Bacterial strains from

grapevine and almond had a high capability on the PD2 medium as indicated by comparison of total cell counts to counts of colony forming units, and had a generation time averaging 9.2 hr at 29 C in PD2 broth medium. Ninety percent of the isolation attempts from naturally infected grapevines in vineyards in California and Florida were successful, and the strains were all agglutinated by antisera produced against a California Pierce's disease strain.

*Additional key words:* rickettsialike bacteria, alfalfa dwarf disease.

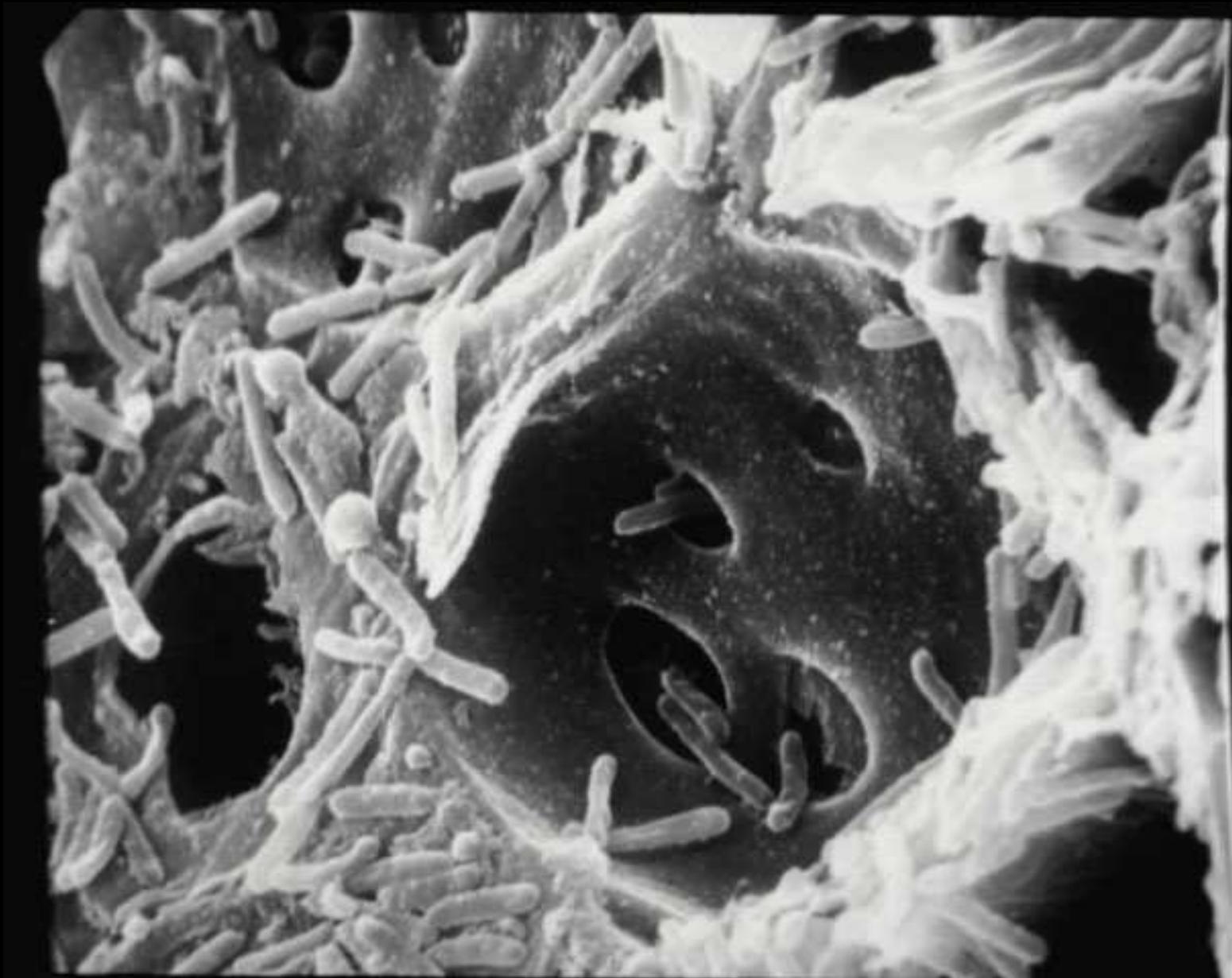
***Xylella fastidiosa* (Wells et al. 1987. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 136-143)**

***Xylella* (habita en el xilema de plantas huésped)**

***fastidiosa* (crecimiento difícil "fastidioso"):** crecimiento lento en medios de cultivo microbiológicos y con requerimientos nutritivos muy específicos, a veces subespecie/cepa

## ***X. fastidiosa*: Biología y ecología de la bacteria**

- **Bacteria limitada al xilema.** Se multiplica en vasos y dificulta el paso de savia. Síntomas reflejan problemas vasculares. Inespecíficos.
- **Transmitida por insectos vectores que se alimentan de savia (chupadores del xilema).** Orden Hemiptera.
- **Bacteria mesófila.** Crecimiento óptimo entre 26-28 °C.
- **Temperaturas por encima de 34 °C o por debajo de 10 °C.** Supervivencia limitada. Adaptada a inviernos suaves o moderados.
- **Organismo nocivo de cuarentena en la UE (D 2000/29/CE) (RD 58/2005).**



***Xylella fastidiosa* en xilema de vid**

© Dr. Doug Cook, UC Davis

# ***X. fastidiosa*: Biología y ecología de la bacteria**

## **Subespecies de *Xylella fastidiosa***

Actualmente, 1 especie que incluye 3 subespecies “oficiales”

<b><i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i></b>	Alfalfa, almendro y vid, entre otros
<b><i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i></b>	Cafeto, cítricos y olivo, entre otros
<b><i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i></b>	<i>Morus</i> spp., <i>Prunus</i> spp., <i>Quercus</i> spp., <i>Rubus</i> spp. y <i>Ulmus</i> spp.
<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>sandy</i>	Adelfa
<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>tashke</i>	<i>Chitalpa tashkentensis</i> (ornamental)
<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>morus</i>	Morera y <i>Nandina domestica</i> (ornamental)
Especie nueva <i>X. taiwanensis</i>	(Peral, Taiwan)

➤ **Importante asignar *X. fastidiosa* a subespecies para conocer su biología.**

➤ **Su diversidad genética (80 STs) y elevada tasa de recombinación hacen que puedan aparecer nuevas cepas e infectar nuevos huéspedes.**

# ***X. fastidiosa*: Biología y ecología de la bacteria**

## **Gama de huéspedes**

- **Abarca 359 especies de plantas:** 204 géneros y 75 familias botánicas.
- **Dicotiledóneas** (68 familias), **Monocotiledóneas** (6 familias), **Gimnospermas** (1 familia).
- **La lista va en aumento a medida que se detectan nuevos brotes en Europa.**

- **No todas las especies de plantas son susceptibles** (desarrollan enfermedad). **Infecciones asintomáticas.**
- **No todas las especies de plantas se asocian con todas las subespecies de *X. fastidiosa*** (cierta especificidad).

# ***X. fastidiosa*: Distribución geográfica**

## **América**

## **Europa:**

- **Italia** (Región de Apulia, 2013). *X. fastidiosa* subsp. *pauca*
  - **Francia** (Córcega, 2015; Costa Azul). *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*
  - **Alemania** (Sajonia, 2016). *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*
  - **España:**
    - Islas Baleares** (Mallorca, Menorca e Ibiza, octubre 2016)
    - Alicante** (junio 2017)
- 
- **Repetidas introducciones en la UE con planta ornamental.**
  - **Costa Rica, primer país exportador a la UE.**
  - **Plantas en maceta suponen 15,6% de las importaciones de planta viva y productos de floricultura (en 2014, más de 64.000 t).**

## ***X. fastidiosa*: Enfermedades que produce y síntomas**

- **A veces, las enfermedades reciben en la bibliografía distintos nombres según el huésped y aluden al tipo de síntoma:** “Almond leaf scorch (ALS)”, “Citrus variegated chlorosis (CVC)”, “Pierce disease (PD)” en vid, “deseccamiento rápido del olivo” (CoDiRO), etc.
- **Los síntomas, muchas veces como un “chamuscado” de las hojas, son reflejo de la falta de circulación de savia. Son inespecíficos y fácilmente confundibles con factores abióticos (falta de agua, salinidad, etc.).**
- **Puede llegar a producirse el secado de ramas o incluso muerte de la planta.**
- **Pueden ocasionar graves pérdidas económicas.**



**Olivo**



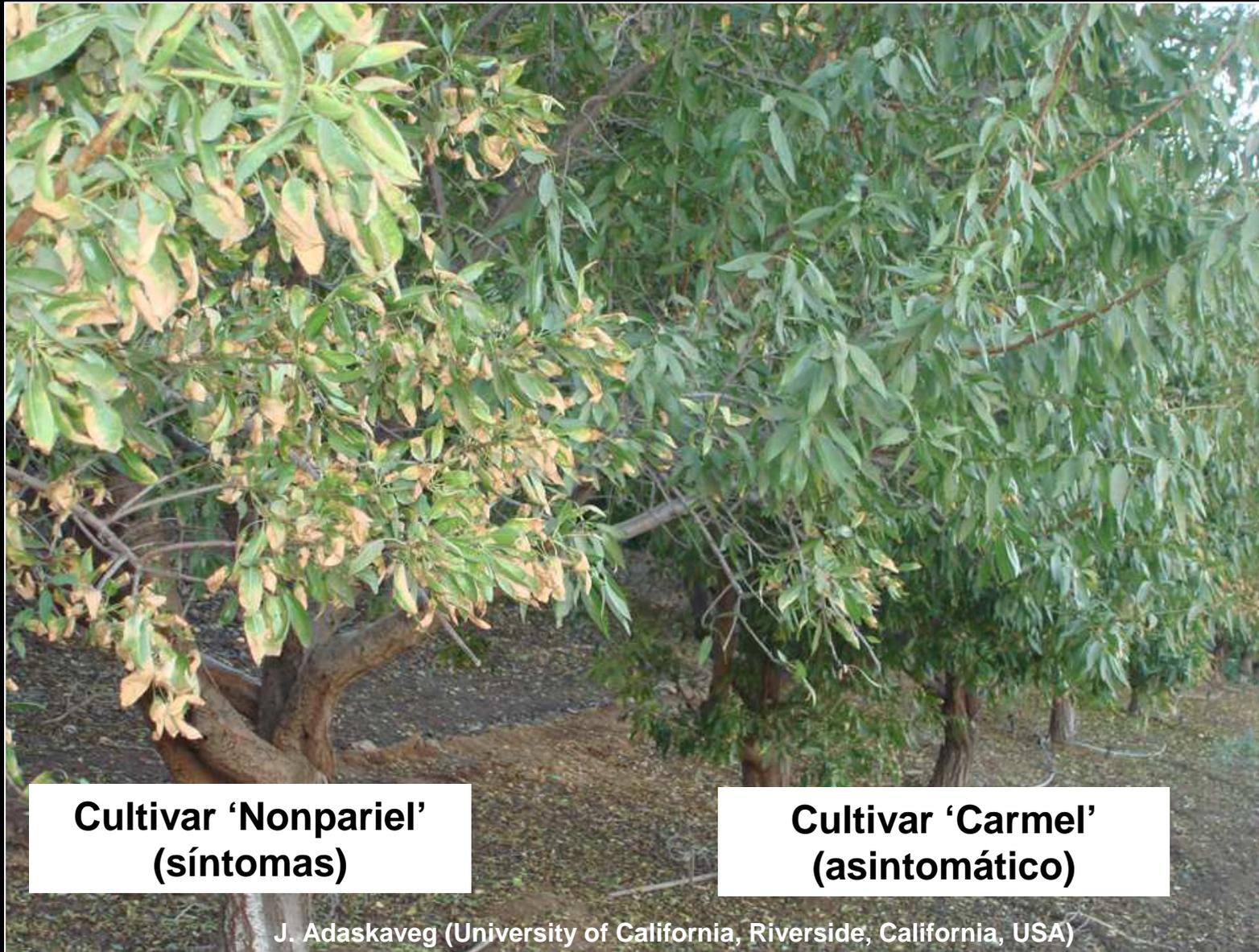
## Desarrollo de síntomas del Complejo de Desecamiento Rápido del Olivo (OQDS/CoDiRO)



Fuente: B. Landa (IAS, CSIC, Córdoba)



**Almendro (“Almond Leaf Scorch” ALF)**



**Cultivar 'Nonpariel'  
(síntomas)**

**Cultivar 'Carmel'  
(asintomático)**

J. Adaskaveg (University of California, Riverside, California, USA)

**Almendro (“Almond Leaf Scorch”, ALF)**



*Xylella fastidiosa* (XYLEFA) - <https://gd.eppo.i>



UGA0162045

## Enfermedad de Pierce (vid)



UGA0162046



*Xylella fastidiosa* (XYLEFA) - <https://qd.eppo.ir>

**Cerezo**

**Ciruelo**  
"Plum leaf scald"



# “Citrus variegated chlorosis” (CVC)



# Olmo



(B. Olson, Oklahoma State University, Bugwood.org)



**Plátano de sombra** (T.D. Leininger, USDA Forest Service, Bugwood.org)



Stephanie Russell

*Adelfa (Nerium oleander)*



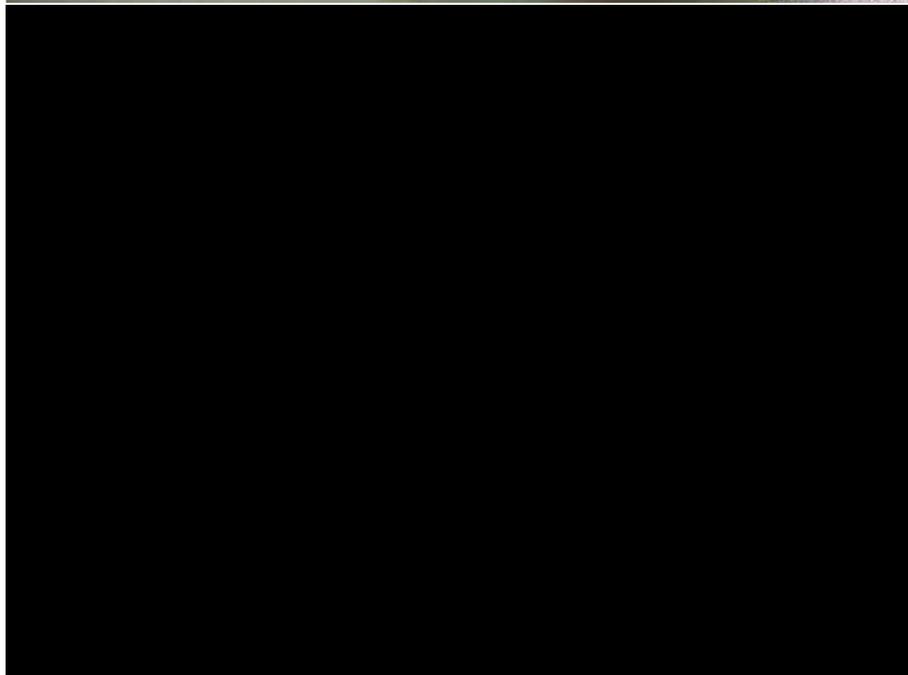
*Xylella fastidiosa* (XYLEFA) - <https://gd.eppo.int>

*Polygala myrtifolia*



*Xylella fastidiosa* (XYLEFA) - <https://gd.eppo.int>

# Cafeto



*Xylella fastidiosa* (XYLEFA) - <https://gd.eppo.int>

# *X. fastidiosa*: Ciclo de patogénesis

## Triángulo de la enfermedad

### PLANTAS HUÉSPED

- **Susceptibles**  
(>340 especies)
- **Vectores** (insectos chupadores del xilema)

### PATÓGENO

- *X. fastidiosa*  
(subespecies)

### FACTORES CLIMÁTICOS

- Temperatura
- Humedad



# Diagnóstico de *Xylella fastidiosa*

- **Síntomas:** No viable (inespecíficos), salvo conocimiento previo de su presencia en una zona y experiencia.

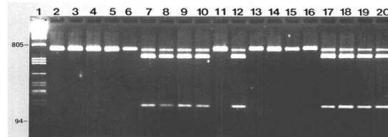
- **Aislamiento:** Crecimiento muy lento “fastidiosa” y requerimientos nutritivos muy específicos (subespecie dependiente).



- **Técnicas ELISA e IF (anticuerpos):** Coste asumible, gran número de muestras. **Inconveniente:** limitada sensibilidad.



- **Técnicas basadas en ADN (PCR):** Numerosos protocolos.



Diferenciación de subespecies mediante MLST (7 genes)

# Diagnóstico *Xylella fastidiosa*

## European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Standards de *Xylella fastidiosa*

### Diagnostics. PM 7/24 (2). EPPO Bulletin 46: 463–500

- PCR en tiempo real TaqMan. Harper *et al.* (2010). *Phytopathology* 100: 1282–1288.
- PCR en tiempo real TaqMan. Francis *et al.* (2006). *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 203-213.

Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (5), 463–500

ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12327

European and Mediterranean Plant Protection Organization  
Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PM 7/24 (2)

Diagnostics  
Diagnostic

### PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*

#### Specific scope

This Standard describes a diagnostic protocol for *Xylella fastidiosa*.<sup>1</sup>

It should be used in conjunction with PM 7/76 *Use of EPPO diagnostic protocols*.

#### Specific approval and amendment

First approved in 2004-09.  
Revised in 2016-09.<sup>2</sup>

# Métodos de control: dificultades

- **Confinada al xilema de las plantas o en insectos vectores.**
- **Forma biopelículas protectoras.**
- **Amplia gama de huéspedes. Infecciones asintomáticas.**
- **Capacidad de desarrollo en un amplio rango de temperaturas, aunque las bajas temperaturas limitan su supervivencia.**
- **Se transmite por insectos que se alimentan del xilema.**

# Métodos de control (I)

## ➤ Métodos preventivos:

- **Evitar entrada de material infectado (inspecciones).** Decisión de Ejecución UE 2015/789; Planes de contingencia Nacional y Autonómicos.
- **Erradicación de plantas infectadas y vectores (reducción de fuentes de inóculo).** Solo es efectiva si se actúa en los primeros momentos y con rapidez, pero no una vez establecida la enfermedad.
- **Resistencia en plantas (búsqueda de variedades menos sensibles).** Costoso y a largo plazo. Algunos avances en vid, olivo y cítricos.

# Métodos de control (II)

- **Terapia: integrar prácticas culturales, lucha química y biológica:**
- **Poda de ramas afectadas.** No siempre es efectivo.
  - **Termoterapia en material de plantación de vid.** Eliminación de la bacteria con agua caliente durante 45 minutos.
  - **Tratamiento químico de insectos vectores.** En estado de larva sobre la cubierta vegetal, antes de que vuelen y se alimenten en los cultivos.
  - **Biocontrol (investigación en progreso).** Bacteriofágos, péptidos antimicrobianos, microorganismos endófitos que protejan a la planta de la infección por *X. fastidiosa*.

DIRECCIÓN GENERAL DE ALIMENTACIÓN Y FOMENTO AGROALIMENTARIO

Centro de Sanidad y Certificación Vegetal

INFORMACIONES  
TÉCNICAS

1/2015

## *Xylella fastidiosa* Wells et al. (1987)



CURSO PARA LOS LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO FITOPATOLÓGICO DE LAS CCAA

## DETECCIÓN DE *Xylella fastidiosa* EN MATERIAL VEGETAL

11-12 de mayo de 2017

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)  
Moncada (Valencia)

### Programa

#### 11 de mayo

9:00 – 9:30 h. Bienvenida y presentación.

9:30 – 10:00 h. Introducción sobre *Xylella fastidiosa*: historia, huéspedes, enfermedades que causa, vectores.

10:00 – 10:30 h. Descanso.

10:30 – 10:45 h. Detección y diagnóstico. Protocolo EPPO.

10:45 – 11:00 h. Inmunoimpresión.

10:45 – 11:30 h. Situación de *X. fastidiosa* en Baleares.

11:30 – 11:45 h. Toma de muestras en laboratorio.

12:00 – 14:00 h. PARTE PRÁCTICA. Toma de muestras.

14:00 – 15:30 h. Comida.

15:30 - 15:45 h. Extracción de ADN.

15:45 – 19:00 h. PARTE PRÁCTICA. Extracción de ADN del material vegetal mediante el protocolo de CTAB.

#### 12 de mayo

9:00 – 9:30 h. PARTE PRÁCTICA. Finalización del protocolo de extracción de ADN y carga de las placas para PCR en tiempo real.

9:30 – 10:00 h. Detección de *X. fastidiosa* por PCR en tiempo real.

10:00 – 10:30 h. Descanso.

10:30 – 14:00 h. Lectura de resultados e interpretación de los mismos. Conclusiones. Clausura.



# Proyectos de investigación en España

(participa en proyectos UE H2020, desde 2015)

- Desarrollo de estrategias de control integrado de las enfermedades asociadas a *X. fastidiosa* para prevenir su entrada, establecimiento y expansión.
- Contribuir a controlar el impacto económico, ambiental y social en caso de producirse nuevos brotes en la UE.
- **XF-ACTORS** ‘*Xylella fastidiosa* Active Containment Through a Multidisciplinary-Oriented Research Strategy’.
- **PONTE** ‘Pest Organisms Threatening Europe’.
- **COST-EuroXanth** ‘Integration science for Xanthomonadaceae for integrated plant disease management in Europe’ (**participación CITA, Aragón**)

**PROYECTO NACIONAL (MINECO-INIA). Pendiente de resolución**  
**(Participación CITA. Colaboración CSCV)**



# Información actualizada

**EFSA (2016) European Food Safety Authority Panel on Plant Health.** Update of database of host plants of *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal* 14 (2), 4378

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4378>

**EFSA (2016) European Food Safety Authority Panel on Plant Health.** Scientific opinion on four statements questioning the EU control strategy against *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal* 14 (3), 4450

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4450>

**EPPO (2017). Global Database** <https://gd.eppo.int>

**CajaMar Caja Rural ed. 2017.** Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa* [www.publicacionescajamar.es](http://www.publicacionescajamar.es)

# Conclusiones

- ✓ ***X. fastidiosa* es un patógeno de cuarentena en la UE, temible por ser causante de enfermedades devastadoras.**
- ✓ **Riesgo elevado: huéspedes, vectores potenciales y condiciones climáticas.**
- ✓ **No se puede prever como podrían evolucionar las epidemias en caso de introducción (entre otros aspectos, dependería de la/s subespecie/s).**
- ✓ **No hay métodos de control químico eficaces y autorizados.**
- ✓ **Medidas preventivas esenciales. Control sanitario del material vegetal en viveros.**
- ✓ **El control requiere una estrategia integrada, con medidas tendentes a minimizar la sensibilidad del hospedador, la diseminación del patógeno y optimizar los tratamientos.**
- ✓ **Detección precoz y diagnóstico rápido y fiable, que permitan aplicar medidas drásticas de erradicación.**

# MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN

