



G CONSELLERIA
O MEDI AMBIENT,
I AGRICULTURA
B I PESCA
/ SERVEIS MILLORA
AGRÀRIA I PESQUERA

Xylella fastidiosa en las Islas Baleares

Solicitud de análisis

Detecciones y caracterización en Baleares

Palma, 22 de marzo de 2017

Diego Olmo García
Laboratorio Oficial de Sanidad Vegetal de las Islas Baleares- GOIB



GOIB

SOLICITUD DE ANÁLISIS



http://www.caib.es/sites/sanitatvegetal/ca/solalicitud_danallisis/



GOVERN
ILLES
BALEARS

Inici > Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca > Direcció General d'Agricultura i Ramaderia > Sanitat vegetal > Xylella fastidiosa > Sol·licitud d'anàlisis

Sanitat vegetal

Cercar

Xylella fastidiosa

- Brots de Xylella fastidiosa a les Illes Balears
- Sol·licitud d'anàlisis
- Comunicació prèvia per a la destrucció de vegetals afectats per Xylella fastidiosa
- Llistat de plantes hospedants de Xylella fastidiosa a Europa
- Legislació

Rhynchophorus
ferrugineus (Morrut Roig
de les palmeres)

Com sol·licitar anàlisis *Xylella fastidiosa*?

1. Enviant un correu electrònic a sanitatvegetal@dgagric.caib.es amb les seves dades personals i les dades de la mostra (espècie vegetal varietat, localització, si es possible amb coordenades). Els tècnics de Sanitat Vegetal es posaran en contacte amb la persona sol·licitant per prendre la mostra i enviar-la al Laboratori de Sanitat Vegetal

o bé

2. Duent directament una mostra al Laboratori de Sanitat Vegetal (C/Eusebi Estada 145) o a les Delegacions Comarcals, amb una sol·licitud d'anàlisis  totalment emplenada, indicant les coordenades de la planta mostrejada. La mostra s'ha de compondre per brots d'uns 20-30 cm amb fulles preferiblement simptomàtiques (aproximadament unes 50 (fulles grans, p.ex. baladre, fruiters i ametller)-100 (fulles petites, p.ex. polígala, olivera o ullastre) en total, sumant tots els brots). Per una mateixa mostra es recomana agafar brots de distintes ubicacions de la planta, però sempre de la mateixa planta. Cada mostra ha d'anar en una bossa, individualment, ben tancada (recomanem bosses amb sistema de tancament tipus "zip") i per cada mostra s'ha d'omplir una fitxa de sol·licitud que ha d'adjuntar-se.



GOIB

DETECCIÓN

Métodos de detección y diagnóstico, problemática asociada



Detección

(RAE) Acción y efecto de Detectar (= Descubrir la existencia de algo que no era patente)

Diagnóstico de una enfermedad

(RAE) Determinar la naturaleza (causa) de una enfermedad.

Postulados de Koch (1882):

- 1. El patógeno debe estar presente siempre en individuos enfermos y nunca de individuos sanos.
- 2. Cuando un individuo está enfermo el patógeno debe aislarse en cultivo puro.
- 3. Si el patógeno se inocula a otro individuo debe reproducirse la enfermedad.
- 4. El patógeno debe aislarse nuevamente en cultivo puro.



En algunos casos es complicado realizar los ensayos de patogenicidad y completar los postulados de Koch.

Xylella fastidiosa:

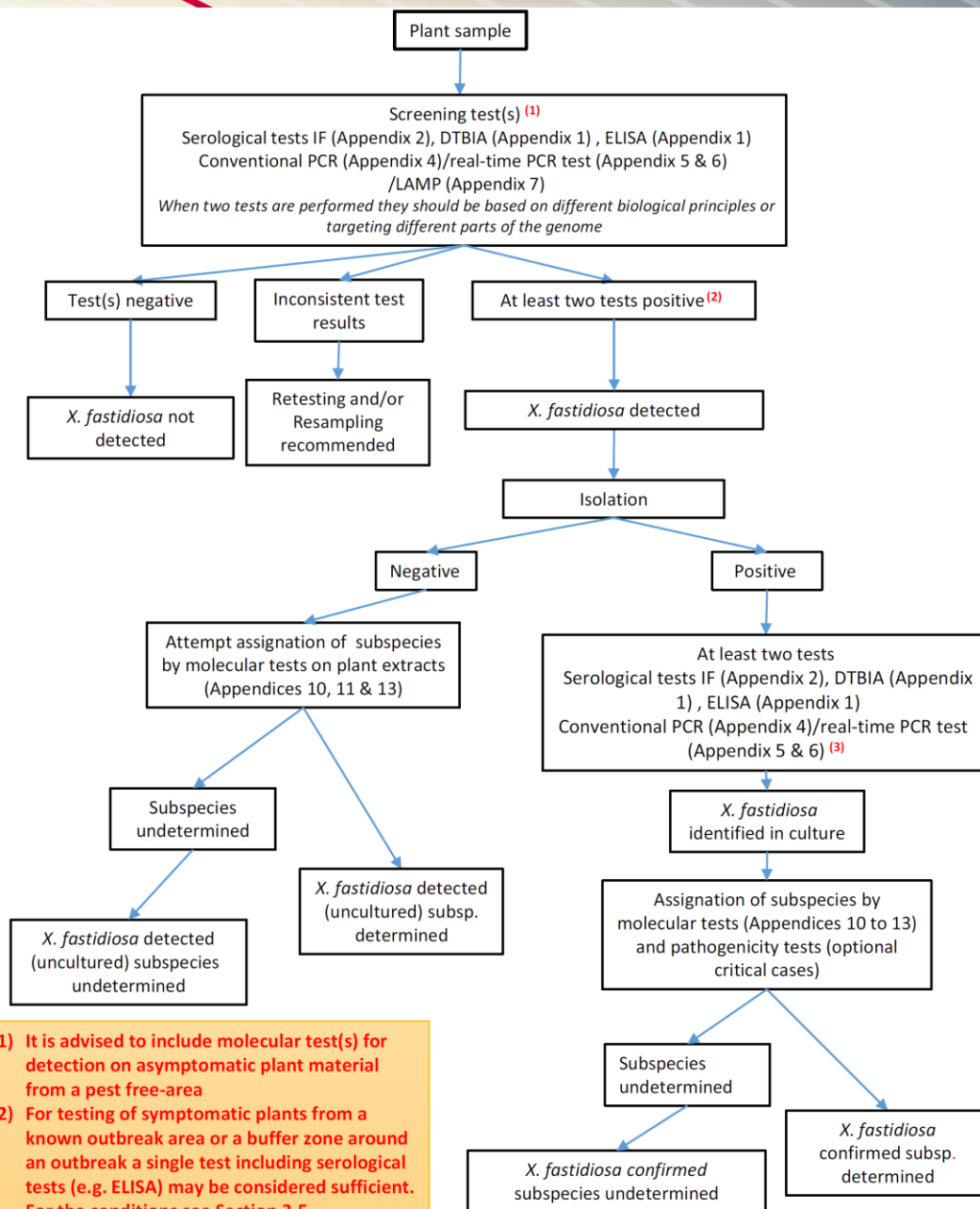
- Dificultad para aislar la bacteria.
- Transmisión en la naturaleza por vectores.
- Los síntomas en plantas inoculadas se manifiestan tras largos períodos de tiempo.
- Es un patógeno de cuarentena => los ensayos de patogénesis deben realizarse en condiciones de bioseguridad.

EFSA (2015):

There are **uncertainties associated with reports** that **incompletely describe the detection methods** that were used. The tedious isolation process of *X. fastidiosa*, the **difficulty in fulfilling Koch's postulates** and the need also to understand the **vector's role** are certainly part of the explanation why the identification process has sometimes been stopped or performed inadequately. Furthermore, it should be stressed that, since infected plants might be missed because they are asymptomatic or show symptoms that could be due to drought, the known distribution can be linked only to areas where the disease has provoked clearly visible symptoms, and usually epidemics.

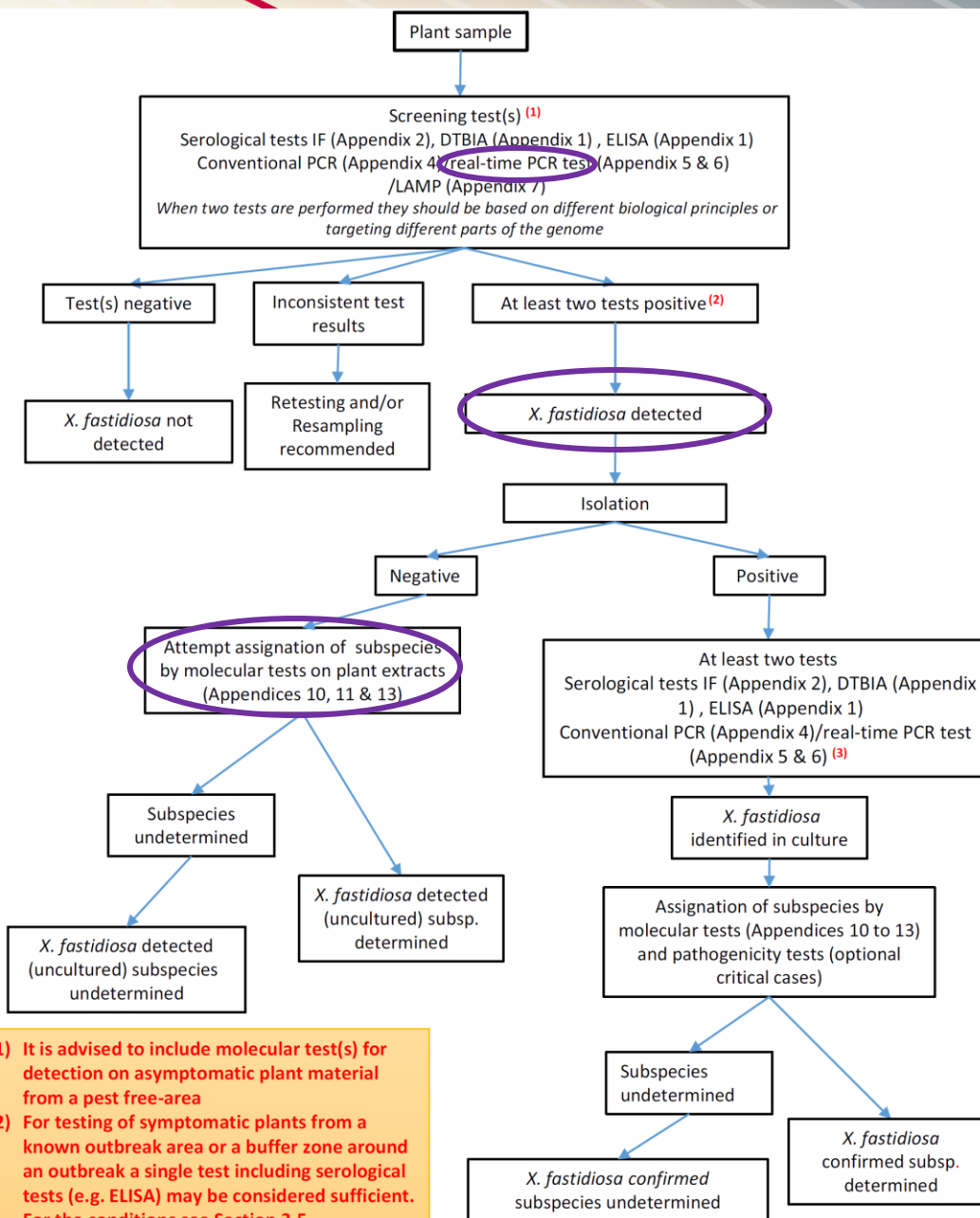
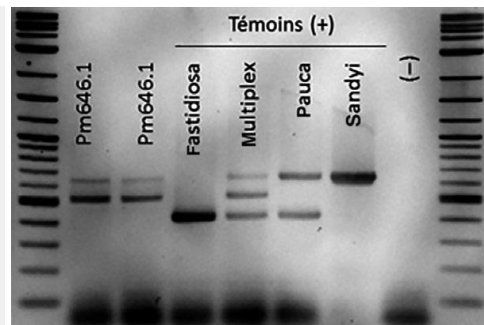
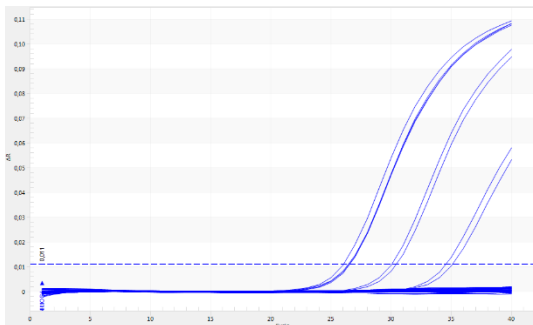
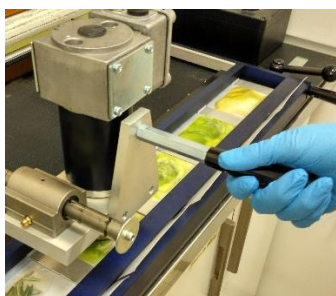
Métodos de detección de *X. fastidiosa* en muestras vegetales

- Screening test:
 - Serológicos: IF, DTBIA, ELISA (sensibilidad $\approx 10^4$ ufc/ml)
 - Moleculares: PCR (sens. $\approx 10^3$ - 10^2 ufc/ml), real time PCR (sens. $\approx 10^2$ - 10 ufc/ml), LAMP (sens. $\approx 10^3$ - 10^2 ufc/ml)
- Subspecies:
- Grupo genético (ST): Multilocus Sequences Typing (MLST)



Métodos de detección de *X. fastidiosa* en muestras vegetales de Baleares

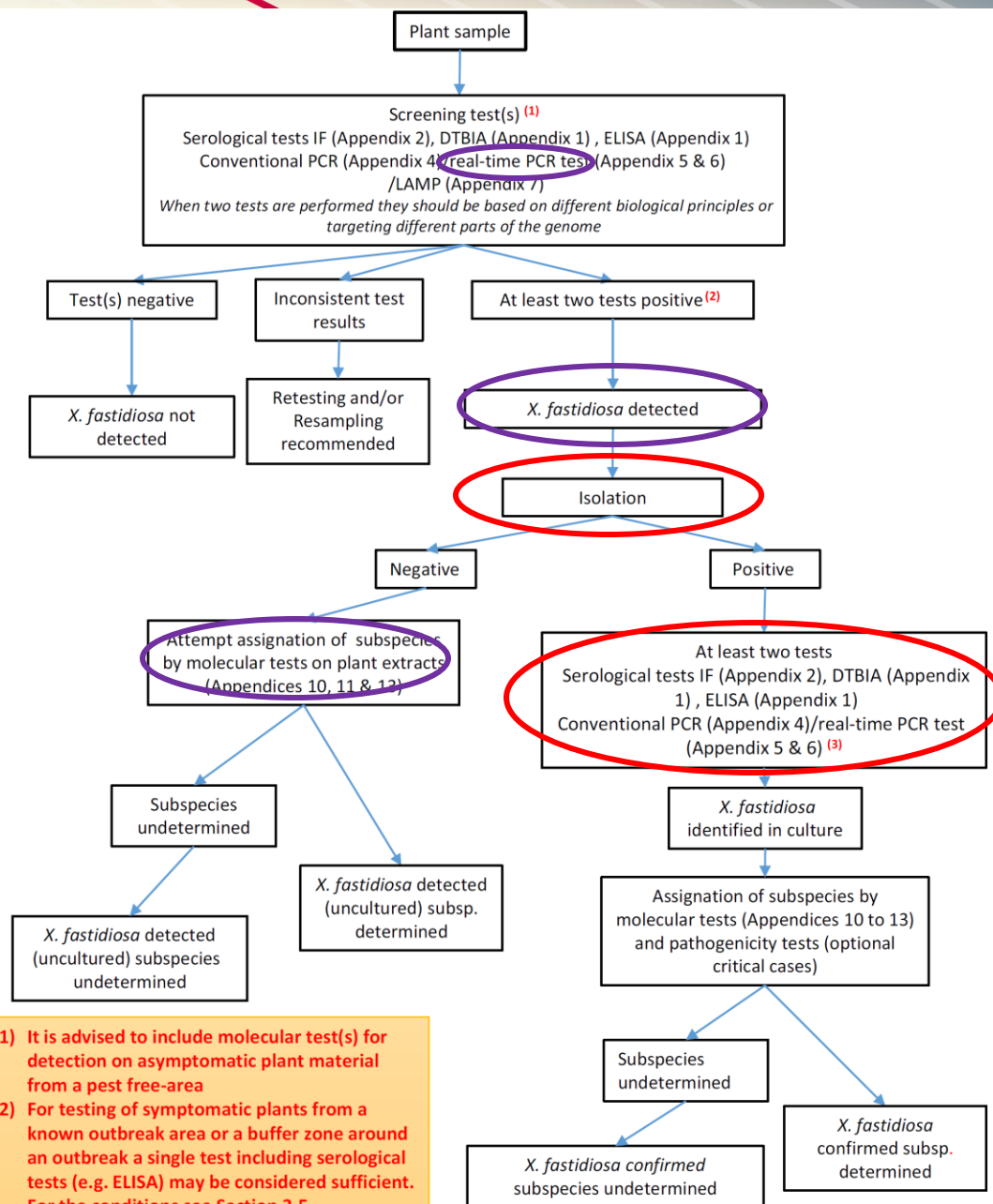
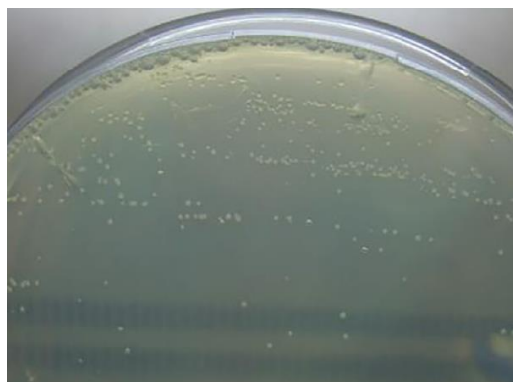
- Protocolo EPPO 7/24 (2) (2016)
- En el Laboratorio Oficial de Sanidad Vegetal de las Islas Baleares (LOSVB): Extracciones ADN y Screening Tests (2 PCR tiempo real) Determinación subsp. mediante multiplex PCR.



- (1) It is advised to include molecular test(s) for detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.5.
- (3) Molecular tests for assignation of subspecies can be used for confirmation of the

Métodos de detección de *X. fastidiosa* en muestras vegetales de Baleares

- Protocolo EPPO 7/24 (2) (2016)
- En el Laboratorio Oficial de Sanidad Vegetal de las Islas Baleares (LOSVIB): Extracciones ADN y Screening Tests (2 PCR tiempo real) Determinación subsp. mediante multiplex PCR.
- En el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de bacterias fitopatógenas se confirman y se intentan los aislamientos.





Métodos de detección de *X. fastidiosa* en muestras vegetales de Baleares

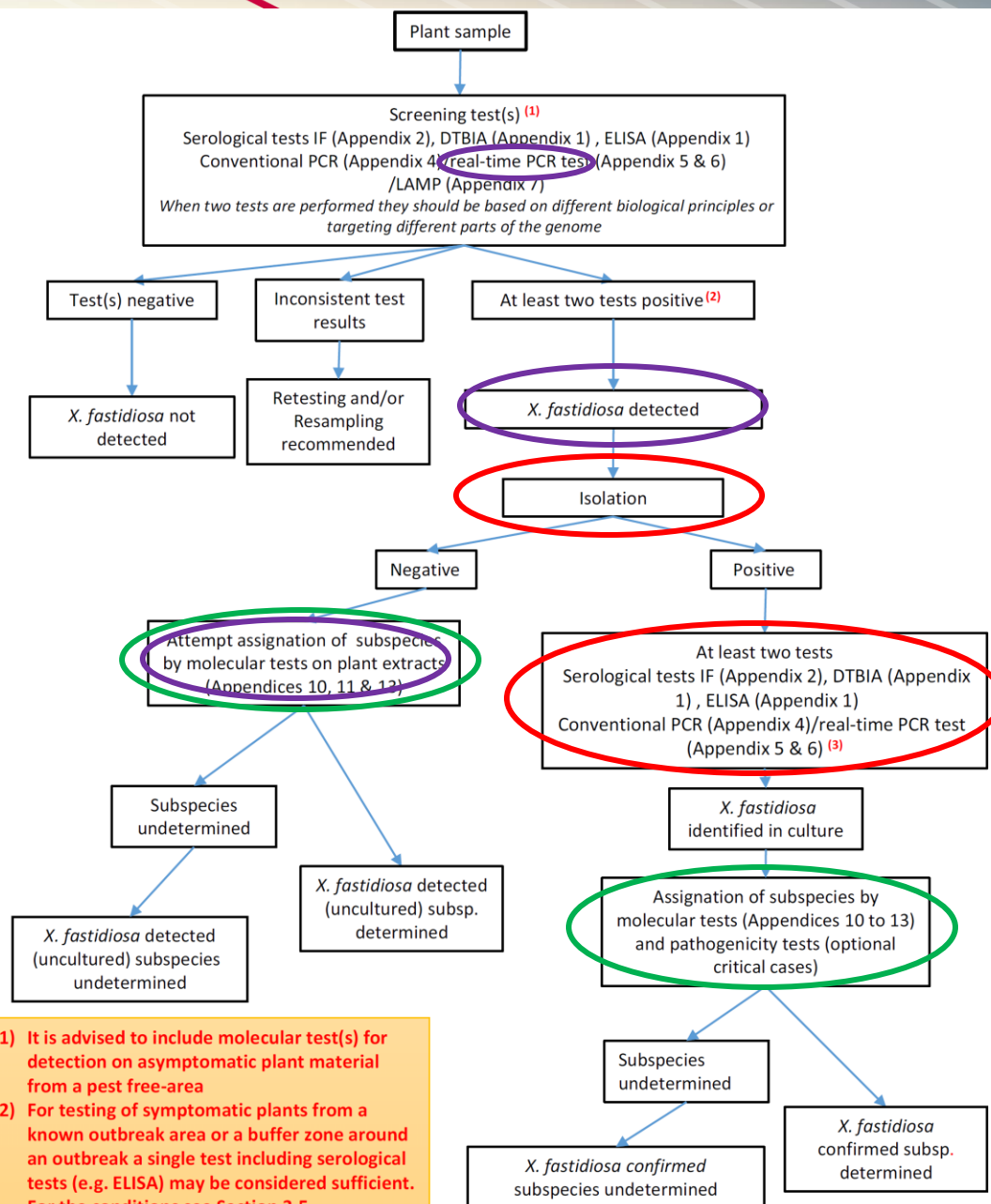
- Protocolo EPPO 7/24 (2) (2016)
- En el Laboratorio Oficial de Sanidad Vegetal de las Islas Baleares (LOSVIB): Extracciones ADN y Screening Tests (2 PCR tiempo real) Determinación subsp. mediante multiplex PCR.
- En el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de bacterias fitopatógenas se confirman y se intentan los aislamientos.
- En el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) del CSIC se determinan las subespecies y grupos genéticos mediante MLST.



Tabla 1. Amplificación y tipo de secuencia (MLST) obtenidas para las diferentes muestras vegetales analizadas

Aislado	lexA	patC	malF	cyoD	hcrC	nuvL	gltT	ST	Signa. fenotípica	Subespecie
ISA_5275.1	7	6	8*	27*	10	16	8*	Número 1: ST72*	+	graua
ISA_5275.6	7	6	8*	27*	10	16	8*	Número 1: ST72*	+	graua
ISA_1581	3	3	3	3*	3	3	3	Número 2: ST6*	+	multiplex
ISA_1582	3	3	3	7	3	3 p	3	7	+	multiplex
ISA_1583	3	3	3	3*	3 p	3	3	Número 2: ST6*	+	multiplex
ISA_1584	3	3	3	3*	3	3	3	Número 2: ST6*	+	multiplex
ISA_1585	3	3	3	3*	3 p	3	3	Número 2: ST6*	+	multiplex
ISA_1587	1	1	1	1	1	1	1	1	+	fastidiosa
ISA_1588	1	1	1	1	1	1	1	1	+	fastidiosa
ISA_1589	1	1	1	1	1	1	1	1	+	fastidiosa
ISA_1590	3	3	3	3*	3	3	3 p	Número 2: ST6*	+	multiplex

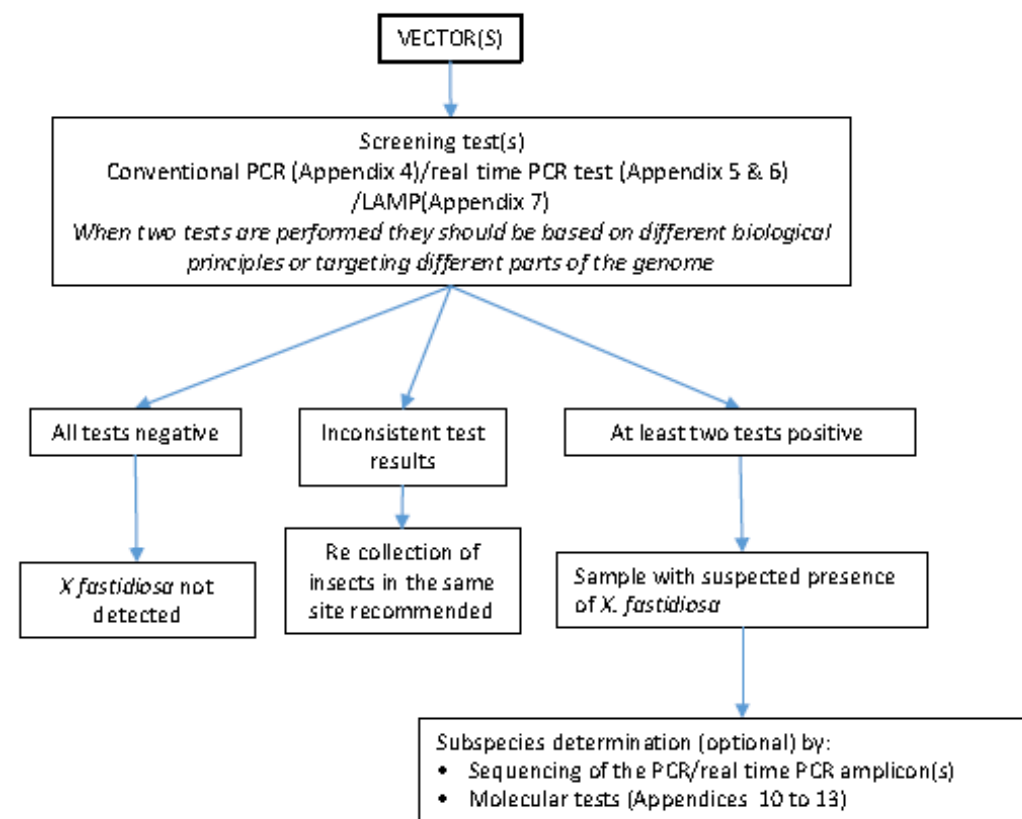
(*) = la secuencia obtenida fue parcial pero presenta el 100% de identidad con el ST indicado.
(*) = No está presente en la base de datos MLST, se indica la secuencia o ST más cercano.



- (1) It is advised to include molecular test(s) for detection on asymptomatic plant material from a pest free-area
- (2) For testing of symptomatic plants from a known outbreak area or a buffer zone around an outbreak a single test including serological tests (e.g. ELISA) may be considered sufficient. For the conditions see Section 3.5.
- (3) Molecular tests for assignment of subspecies can be used for confirmation of the

Métodos de detección de *X. fastidiosa* en vectores

- Técnicas moleculares para detección de *X. f.* a partir de cabezas sin ojos.



Dificultades en la detección de *X. fastidiosa*

- Síntomas inespecíficos.
- Plantas asintomáticas positivas.
- Dificultad de aislamiento de la bacteria.
- Técnicas serológicas => falsos positivos.
- Procesado tedioso de las muestras para PCR (extracciones de ADN a partir nervios centrales).
- Proceso largo hasta llegar a subespecie y ST.
- Distribución no uniforme de la bacteria en la muestra => poca concentración en la muestra => poco ADN bacteriano => dificultad de detección y de estudios del grupo genético.



- Dificultades en el diagnóstico de las enfermedades que pueda provocar *X. fastidiosa*





GOIB

SITUACIÓN EN LAS ISLAS BALEARES

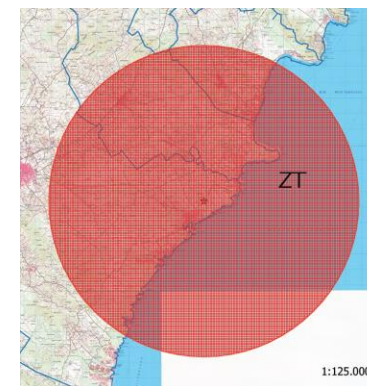
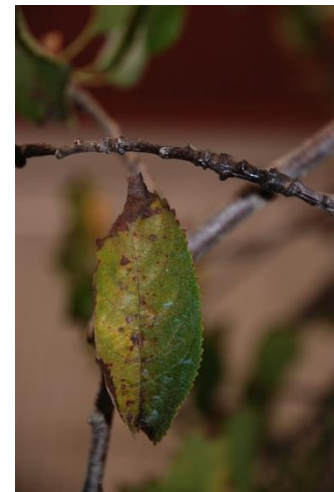
Detecciones en las islas Baleares



GOIB

Detecciones en Baleares.

- Primera detección en octubre 2016 en 3 Cerezos en '*Garden Center*' de Portocristo (Manacor).
- Tal y como se establece en la Decisión de Ejecución (UE) 2016/764 se establece la zona demarcada (ZD) = ZI y se aplican las medidas de erradicación.
- Además de eliminación de todas las plantas de la ZI por principio de precaución (1921 unidades).



Ubicació de la zona afectada. (Portocristo)
Quadrícula de 100x100m.



Detecciones en Baleares.

- 2ª Detección diciembre 2016 en *Polygala myrtifolia* en el mismo 'Garden Center'
- Enero 2017 – hasta ahora: numerosas detecciones* en Mallorca, Ibiza, Menorca.
- La distribución de los brotes es amplia.
- Se ha encontrado en: adelfas, *Acacia*, acebuche, almendro, cerezo, ciruelo, *Cistus*, olivo, *Polygala*, *Lavandula* y romero.
- Hasta la fecha no hay detecciones ni en cítricos ni en vid.

* 189 muestras positivas de 1277 analizadas hasta 14/03/2017



2016

ESPECIE VEGETAL	MUESTRA S	POSTIVOS
<i>Asparagus acutifolius</i>	2	0
<i>Citrus</i>	27	0
<i>Coffea</i>	4	0
<i>Euphorbia</i>	2	0
<i>Hebe</i>	1	0
<i>Hibiscus</i>	1	0
<i>Laurus nobilis</i>	19	0
<i>Lavandula angustifolia</i>	2	0
<i>Lonicera</i>	1	0
<i>Metrosidero excelsa</i>	20	0
<i>Metrosidero tomasi</i>	4	0
<i>Myrtus comunis</i>	43	0
<i>Nerium oleander</i>	81	0
<i>Olea europaea europaea</i>	62	7
<i>Olea europaea sylvestris</i>	29	14
<i>Pittosporum tobira</i>	1	0
<i>Polygala myrtifolia</i>	39	9
<i>Potinia fraseri</i>	2	0
<i>Prunus armeniaca</i>	1	0
<i>Prunus avium</i>	8	3
<i>Prunus domestica</i>	6	1
<i>Prunus dulcis</i>	73	37
<i>Prunus nucipersica</i>	1	0
<i>Quercus ilex</i>	2	0
<i>Rhamnus alaternus</i>	5	0
<i>Rosmarinus</i>	13	0
<i>Rubus</i>	3	0
<i>Vitis vinifera</i>	5	0
<i>Westringia</i>	8	0
Total:	465	71

MALLORCA

2017

ESPECIE VEGETAL	MUESTRAS	POSTIVOS
<i>Acacia saligna</i>	2	1
<i>Arbutus unedo</i>	1	0
<i>Citrus lemon</i>	1	0
<i>Citrus sinensis</i>	2	0
<i>Cistus monspeliensis</i>	4	1
<i>Crataegus monogyna</i>	1	0
<i>Eugenia myrtifolia</i>	1	0
<i>Ficus coronata</i>	1	0
<i>Laurus nobilis</i>	6	0
<i>Lavandula dentata</i>	4	2
<i>Myoporum insulare</i>	1	0
<i>Myoporum tenuifolium</i>	2	0
<i>Myrtus communis</i>	1	0
<i>Nerium oleander</i>	14	1
<i>Olea europaea europaea</i>	49	2
<i>Olea europaea sylvestris</i>	74	27
<i>Polygala myrtifolia</i>	9	5
<i>Prunus dulcis</i>	47	9
<i>Quercus ilex</i>	14	0
<i>Rhamnus alaternus</i>	2	0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	16	5
<i>Thuja</i>	1	0
<i>Westringia fruticosa</i>	2	0
Total:	255	53



GOIB

IBIZA

2016

ESPECIE VEGETAL	MUESTRAS	POSTIVOS
<i>Acacia saligna</i>	1	1
<i>Citrus</i>	1	0
<i>Lavandula</i>	2	1
<i>Metrosideros</i>	3	0
<i>Myrtus communis</i>	1	0
<i>Nerium oleander</i>	7	2
<i>Olea europaea europaea</i>	53	16
<i>Olea europaea sylvestris</i>	2	0
<i>Pistacea</i>	4	0
<i>Polygala</i>	4	1
<i>Prunis dulcis</i>	9	0
<i>Rosmarinus</i>	9	0
<i>Vitis vinifera</i>	1	0
<i>Westringia</i>	3	0
TOTAL:	100	21

2017

ESPECIE VEGETAL	MUESTRAS	POSTIVOS
<i>Acacia saligna</i>	1	0
<i>Citrus aurantium</i>	2	0
<i>Citrus lemon</i>	1	0
<i>Citrus reticulata</i>	1	0
<i>Citrus sinensis</i>	1	0
<i>Cneorum tricoccum</i>	1	0
<i>Convulvulus cneorum</i>	1	0
<i>Lavandula dentata</i>	6	2
<i>Lavandula latifolia</i>	2	0
<i>Metrosidero excelsa</i>	1	0
<i>Nerium oleander</i>	12	1
<i>Olea europaea</i>	24	17
<i>Olea europaea europaea</i>	5	0
<i>Olea europaea sylvestris</i>	13	8
<i>Perlagonium</i>	8	0
<i>Pistacea</i>	2	0
<i>Polygala myrtifolia</i>	1	0
<i>Prunus dulcis</i>	7	0
<i>Phoenix robelini</i>	1	0
<i>Retama</i>	1	0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	7	0
<i>Rosmarinus postratus</i>	2	0
<i>Westringia fruticosa</i>	3	0



GOIB

MENORCA

2017

ESPECIE VEGETAL	MUESTRA S	POSTIVOS
<i>Ceratonia siliqua</i>	1	0
<i>Erica sp.</i>	1	0
<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>	4	2
<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	14	12
<i>Polygala myrtifolia</i>	2	2
<i>Quercus ilex</i>	2	0
<i>Rhamnus alaternus</i>	1	0
TOTAL:	25	16

Ibiza
> 90 % Zona Demarcada



Detecciones en Baleares: hospedantes, subespecies y ST

Isla	Hospedante	Subespecie	Grupo genético (ST)
Mallorca	<i>Prunus avium</i> (Cerezo) <i>Prunus dulcis</i> (Almendro) <i>Polygala myrtifolia</i> (Polígala)	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i>	ST 1
	<i>Polygala myrtifolia</i> (Polígala)	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	ST 7
	<i>Polygala myrtifolia</i> (Polígala) <i>Olea europaea sylvestris</i> (Acebuche) <i>Olea europaea europea</i> (Olivo)	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	Nuevo / cercano al ST 6*
	<i>Acacia</i> sp. (Acacia) <i>Cistus mospeliensis</i> (Estepa) <i>Lavandula dentata</i> (Lavanda) <i>Nerium oleander</i> (Adelfa) <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero)	En estudio	En estudio
Menorca	<i>Polygala myrtifolia</i> (Polígala) <i>Olea europaea sylvestris</i> (Acebuche) <i>Olea europaea europea</i> (Olivo)	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	Nuevo / cercano al ST 6*
Ibiza	<i>Acacia</i> sp. (Acacia) <i>Polygala myrtifolia</i> (Polígala) <i>Lavandula dentata</i> (Lavanda) <i>Olea europaea sylvestris</i> (Acebuche) <i>Olea europaea europea</i> (Olivo)	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i>	Nuevo / cercano al ST 73*
	<i>Nerium oleander</i> (Adelfa)	En estudio	En estudio



GOIB

¿Desde cuándo?

- Es difícil determinar el origen de las primeras entradas.
- En Mallorca se observan síntomas de decaimiento y muerte de almendros desde 2008. Fueron ampliamente estudiados y se asoció a hongos que afectan a la madera, postulados de Koch incluidos (Olmo *et al.*, 2016, Olmo *et al.*, 2015, Gramaje *et al.*, 2012).
- En Mallorca se observan síntomas de seca de ramas de acebuches desde 2012, pero no se había estudiado su etiología. Ahora sabemos que algunos casos son positivos para *X. fastidiosa*.
- En Ibiza 2015 secas en Olivo, se analizó *Xylella fastidiosa* con resultados negativos.
- En Ibiza la *Acacia* positiva en 2017 de la sede del Consell Insular muestra síntomas de decaimiento desde 2014 aunque se hicieron más evidentes a finales de 2016.

La sintomatología de *X. fastidiosa* es inespecífica, la detección es compleja en función de la cantidad de bacteria en la muestra. En algunos casos la bacteria, podría haber convivido con hongos patógenos de la madera y podría estar presente en Baleares desde hace varios años.

Almendros Mallorca 2013



Junio 2012



Mismo acebuche Mallorca

Diciembre 2016



Seca de ramas olivos Ibiza 2015, XF negativo



¿Por qué ahora?

- Las prospecciones y análisis específicos se iniciaron en 2015. Centrándose inicialmente en viveros.
- Se muestreó más a fondo en campo a partir del primer brote en ‘*Garden Center*’ de Porto Cristo
- En zonas donde se han dado casos de epifitía de *Xylella fastidiosa* suele coincidir por la aparición de un vector (a veces nuevo) muy eficiente y darse las condiciones ambientales óptimas para este y para la bacteria.



GOIB

OBJETIVOS FUTUROS



Objetivos futuros

- Profundizar en el conocimiento de la variabilidad genética y la distribución de *X. fastidiosa* en Baleares.
- Determinar cuál o cuales son los vectores implicados en la transmisión, estudiar sus ciclo y establecer las mejores estrategias para controlarlos.
- Estudios de patogenicidad: inoculaciones en distintas especies/variedades, comprobar si existen diferentes grados de sensibilidad.
- Estudiar posibles interacciones con *Xylella fastidiosa* de la microbiota asociada a los hospedantes y al suelo.



G CONSELLERIA
O MEDI AMBIENT,
I AGRICULTURA
B I PESCA
/ SERVEIS MILLORA
AGRÀRIA I PESQUERA



Universitat
de les Illes Balears



Muchas gracias

Palma, 22 de marzo de 2017

Dr. Diego Olmo García
Laboratorio Oficial de Sanidad Vegetal de las Islas Baleares- GOIB