

PROTOCOLO



Toma de muestras para la detección de *Xylella fastidiosa* en material vegetal



Prunus amygdalus



Prunus amygdalus



Olea europaea



Olea europaea

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



IPSN
International Plant
Sentinel Network



BGCI

IAS  **CSIC**



Funded by
the European Union

CONTENIDO:

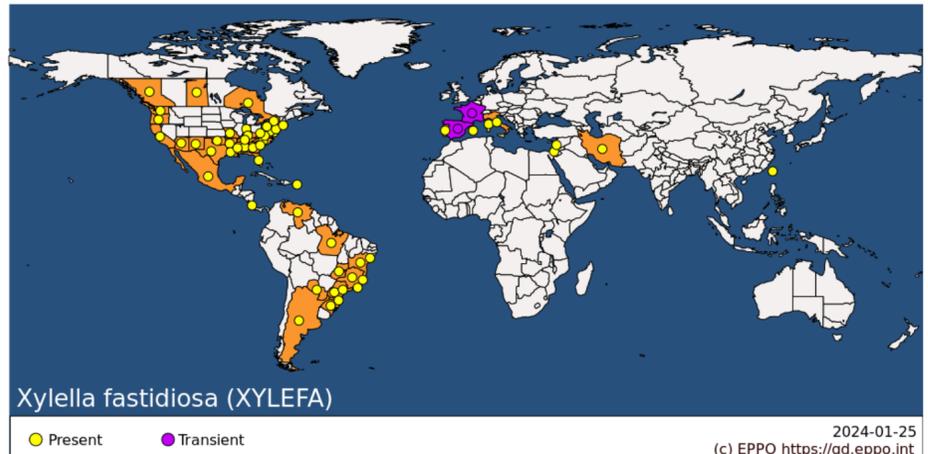
- **Sobre *Xylella fastidiosa*.....3**
- **Síntomas.....4**
- **Toma de muestras.....5**
- **PASO A PASO: Como tomar muestras en campo.....6**
- **Preparación de muestras vegetales.....7**
- **PASO A PASO: Como obtener el extracto de las hojas.....8**
- **PASO A PASO: Como preparar el envío de muestras.....9**
- **Hoja de registro.....10**



Sobre *Xylella fastidiosa*

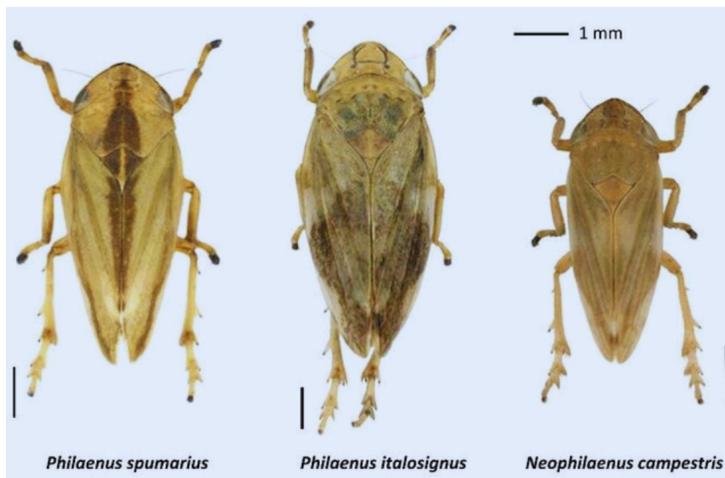
Xylella fastidiosa es una bacteria gram-negativa, aeróbica, y cuyo óptimo de crecimiento se sitúa entre los 26-28°C. Este patógeno es considerado uno de los más agresivos del mundo.

El área de distribución principal de *Xylella fastidiosa* se sitúa en el continente americano, desde Canadá hasta Argentina. Fuera del continente americano, la presencia de la bacteria se ha confirmado en Taiwán, Irán e Israel, así como en diversos países de la Unión Europea.



Distribucion de *Xylella fastidiosa* en 2024.

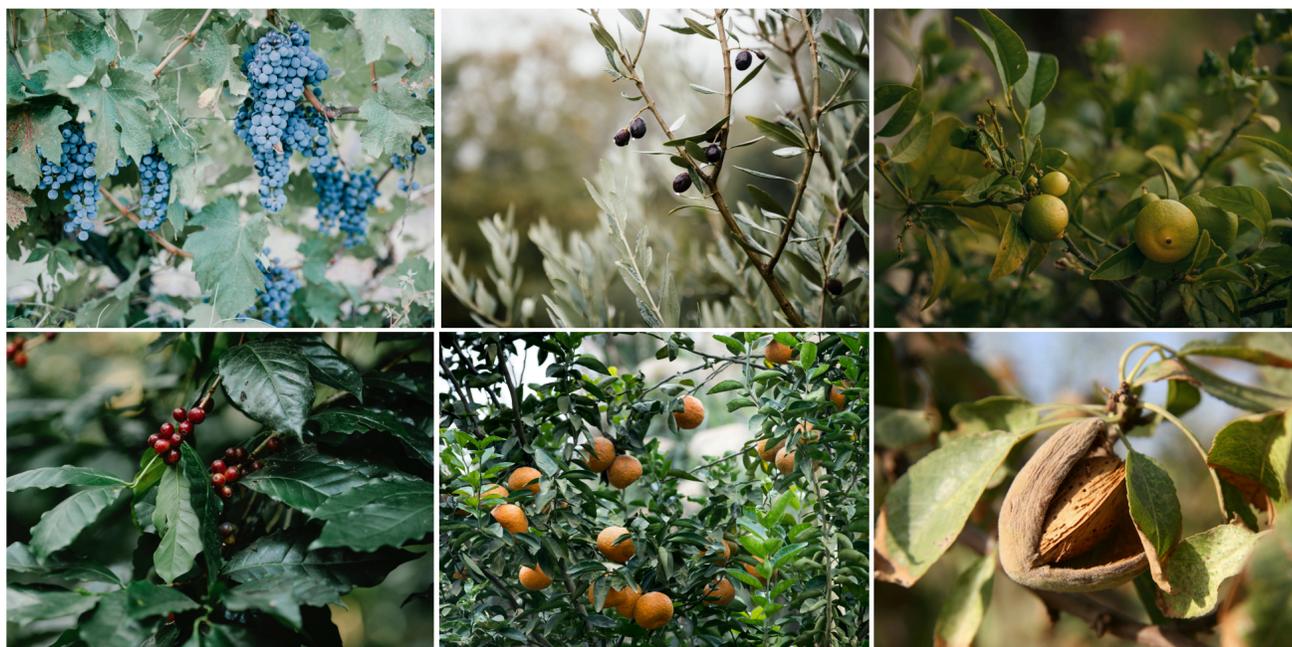
Para mapas actualizados: <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/distribution>.



Vectores que se alimentan del xilema trasmitiendo *Xylella fastidiosa*.

Xylella fastidiosa, es una bacteria que **se encuentra en el xilema** y se multiplica dentro de los vasos de la planta, llegando a taponarlos y a obstruir el flujo de savia bruta. Se transmite de forma natural de unas plantas a otras con la ayuda de insectos vectores, principalmente cicadélidos, cercópodos y cigarras (englobados dentro de los hemípteros), que se alimentan del xilema.

Se conocen **más de 700 especies de plantas que pueden ser susceptibles** a la infección de *Xylella fastidiosa*, incluyendo plantas de alto interés económico. Sin embargo, la bacteria no parece causar enfermedades en muchas de estas especies. La colonización en muchos huéspedes suele ser asintomática durante largos periodos de tiempo después de la inoculación y no necesariamente resulta en el desarrollo de la enfermedad (aunque estas plantas pueden servir como fuente de inóculo).



Plantas de interés económico afectadas por *Xylella fastidiosa*.

Puedes encontrar más información sobre *Xylella fastidiosa* en:

<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/organismos-nocivos/xylella-fastidiosa/>

Síntomas

Los síntomas dependen de la combinación entre la planta huésped y la cepa de *Xylella fastidiosa*. A medida que la bacteria invade los vasos del xilema, bloquea el movimiento de agua y nutrientes, lo que **provoca síntomas similares a los causados por la falta de agua o carencia de nutrientes**. Por ello, pueden confundirse con los causados por otros factores bióticos o abióticos, como otros patógenos, estrés ambiental, salinidad, contaminantes del aire o quemaduras solares.

Los síntomas generalmente aparecen solo en unas pocas ramas, pudiéndose extender luego y afectar a toda la planta. Las infecciones pueden llegar a provocar la muerte de las plantas infectadas.

También, dependiendo de la especie de planta o del cultivo, se pueden observar diferentes síntomas. Estos pueden manifestarse de forma aislada o en combinación.:

 Follaje clorótico o presencia de manchas amarillas



 Marchitamiento del follaje



 Quemaduras en las hojas



 Defoliación (caída prematura de las hojas)



 Deseccación



 Enanismo o retraso del crecimiento



 Reducción de producción y tamaño de frutos o distorsión de frutos



 Lignificación irregular de la corteza



Para más fotos de síntomas causados por *Xylella fastidiosa* consultar:

<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos> & <https://www.ponteproject.eu/category/symptom-xylella/>

Toma de muestras

El muestreo debe realizarse **preferentemente durante el período de crecimiento activo de la planta** para maximizar la probabilidad de detección. La duración de este período variará según la ubicación del jardín y tipo de plantas cultivadas:

- En zonas tropicales o con inviernos suaves, el muestreo se puede llevar a cabo durante todo el año. Esto también aplica a plantas tropicales cultivadas en interiores.
- En zonas templadas, especialmente en especies de hoja caduca, la mayor concentración de la bacteria se encuentra a mediados de verano, cuando los síntomas son más visibles, y sería el momento óptimo para el muestreo.
- También se pueden tomar muestras en invierno o a inicios de la primavera. En estos casos, se recolectan muestras de ramas y se obtienen virutas de madera que contengan parte del xilema

CRITERIOS PARA LA PRIORIZACIÓN DE MUESTRAS:

- Tome al menos una muestra de cada especie hospedadora en su colección. Si no es posible muestrear todas, priorice las siguientes especies:
 1. Aquellas de origen europeo o comúnmente utilizadas en cultivo o horticultura en Europa (por ejemplo, café).
 2. Especímenes que presenten posibles síntomas de *Xylella fastidiosa*.
- Si hay varios individuos de la misma especie, muestree 4-5 de ellos (si es posible), priorizando los que presenten síntomas de *Xylella fastidiosa* y los ejemplares más antiguos.

Como *Xylella fastidiosa* está confinada al tejido xilemático de sus huéspedes, **el pecíolo y la nervadura central de las hojas son la mejor fuente para el diagnóstico**. Aproximadamente, **se necesitan de 0.5-1 g de material vegetal** para extraer de ADN de la bacteria. Para obtener esa cantidad se requiere un número mínimo de hojas. Por ejemplo, en plantas con hojas grandes, cinco hojas serían suficientes, mientras que en plantas con hojas pequeñas, se necesitarían al menos 25 hojas para alcanzar el peso de muestra deseado (ver Tabla abajo del protocolo PM 7/24 (5) *Xylella fastidiosa* de la EPPO).

Tabla - Numero de hojas (incluyendo el pecíolo) necesarios y el peso aproximado de la muestra de laboratorio para analizar plantas individuales.

Tipo de muestra	Tipo de tejido de plantas hospedadoras	Mínimo numero de hojas	Peso aproximado (g)
Muestras de plantas con hojas grandes como <i>Coffea</i> spp., <i>Ficus</i> spp., <i>Vitis</i> spp., <i>Nerium oleander</i> (sintomáticas o asintomáticas)	Parte basal de las hojas	5	0.5 - 1
Muestras de plantas con hojas pequeñas como <i>Polygala myrtifolia</i> y <i>Olea</i> spp. (sintomáticas o asintomáticas)	Parte basal de las hojas	25	0.5 - 1
Muestras de plantas sin pecíolos o con pequeños pecíolos y nervadura central (sintomáticas o asintomáticas)	Parte basal de las hojas y nervio central	25	0.5 - 1
Plantas o esquejes durmientes o en parada vegetativa	Tejido xilemático	NA	0.5 - 1
Otros esquejes	Tallo	NA	1

Como tomar muestras en campo:



1 TOMAR LA MUESTRA



Recoger ramas o esquejes con 10 - 25 hojas sintomáticas o cerca de la zona sintomática. En caso de ser asintomática, tomar la muestra de la mitad o parte superior de la planta.

- **Para herbáceas:**

Incluir tallos con hojas maduras de diferentes partes de la planta.

- **Para plantas pequeñas:**

Se puede recoger la planta entera.

¡IMPORTANTE! La muestra debe ser representativa de toda la zona aérea.

- ⚠ Preferentemente de una sola planta.
- ⚠ Si las plantas son de la misma especie y presentan los mismos síntomas, y solo si hay poco material, las muestras se pueden agrupar.

¡EVITAR!

- ⊗ Tejidos muertos
- ⊗ Síntomas muy avanzados
- ⊗ Brotes jóvenes



2 AGITAR LA MUESTRA

Una vez tomada la muestra, agitarla suavemente para evitar que posibles vectores viajen con ella.



3 PONER LA MUESTRA EN UN RECIPIENTE CERRADO

Meter la muestra en un recipiente cerrado para mantenerla fresca, por ejemplo, en una bolsa de plástico.



4 MANTENER LA MUESTRA EN FRIO

Mantener la muestra en frío, por ejemplo, en una nevera, hasta su procesamiento. Evitar la exposición al sol y a elevadas temperaturas.



5 TOMAR FOTOS

Recuerda registrar detalladamente los síntomas que presenta la planta y tomar fotografías de los mismos y de la planta.



6 ANOTAR EN LA HOJA DE REGISTRO

Anotar la información de la especie muestreada en la hoja de registro proporcionada. Datos como: Código del jardín, especie, número de accesión del ejemplar, fecha de muestreo (DD/MM/AA), síntomas (si hay) y referencia de la foto (si esta se tomó).



7 TRANSPORTAR LA MUESTRA A LA ZONA DE PREPARACIÓN

Llevar la muestra a la zona de preparación para obtener el extracto antes de que el tejido vegetal se deteriore.



Preparación de muestras vegetales

Una vez recolectadas las hojas, el siguiente paso consiste en obtener el extracto de las mismas. Este procedimiento puede llevarse a cabo en las instalaciones del jardín botánico, ya que no requiere el uso de materiales exclusivos de laboratorio.

MATERIALES NECESARIOS PARA LA EXTRACCIÓN:

- Material vegetal: Hojas
(la cantidad dependerá del tamaño de las hojas, ver [Tabla en la Página 5](#)).



- Tijera o cuchilla



- Guantes



- Pipetas Pasteur



- Bolsas BIOREBA (para extracto)



- Tubos 2 ml



- Hoja de registro
(disponible en la [Página 10](#))



- Balanza de precisión
(si está disponible)



- Utensilio para macerar el material vegetal
(mortero, martillo o martillo de goma)



- Rotulador permanente



- 8 pastillas de PBS
(Tampón)



- Caja para soporte de tubos



- Parafilm



Vídeo - *Como obtener muestras del extracto de las hojas y preparar el envío.*
<https://vimeo.com/1069751176?share=copy>



¡Haz click para ver el video!

En las próximas páginas encontrarás el paso a paso para la extracción y el envío de las muestras.

Como obtener el extracto de las hojas:



1 PREPARAR EL MATERIAL VEGETAL

Cortar la hoja para quedarnos con el pecíolo y el nervio central usando tijeras o cuchilla.



Una vez cortados, el material obtenido debe pesar entre 0.5-1 g.



2 INTRODUCIR EL MATERIAL EN LA BOLSA PARA EXTRACTO



Introducir el material vegetal cortado en uno de los lados de la malla central de la bolsa para proceder a la extracción.

Rotular la bolsa con el nombre de la especie y fecha de recogida del extracto.

3 PREPARAR EL TAMPÓN



Disolver 1 pastilla de PSB con 100 ml de agua, remover hasta la disolución completa de la pastilla.

4 INTRODUCIR EL TAMPÓN EN LA BOLSA PARA EXTRACTO



Utilizando una pipeta Pasteur, extraer 5 ml de la mezcla de PSB disuelto y transferirlos a la bolsa para extracto. Dado que la pipeta Pasteur tiene una capacidad de 2.5 ml, repetir el proceso dos veces.

Asegurarse de introducir el PSB disuelto en el mismo lado donde se encuentra el material vegetal.

5 OBTENER EL EXTRACTO



Sobre una superficie adecuada, machacar el material vegetal dentro de la bolsa, con un mortero o martillo, hasta que el tampón tome color. Machacar con cuidado durante, como mínimo, 1 minuto.

Como preparar el envío de muestras:



DUPLICAR LAS MUESTRAS: = a + b

Por cada muestra, es decir, por cada bolsa de extracto obtenida, se recomienda obtener dos réplicas, que se llamarán "a" y "b".

Se recomienda enviar una de las réplicas al laboratorio para su análisis y conservar la otra como respaldo, en caso de que surjan inconvenientes durante el proceso analítico.

1

ROTULAR CADA TUBO

Usando el rotulador permanente, escribir el código del jardín, número de muestra y replica.

Rotular tanto en la tapa como en el lateral de cada tubo.



2

PREPARAR LA HOJA DE REGISTRO

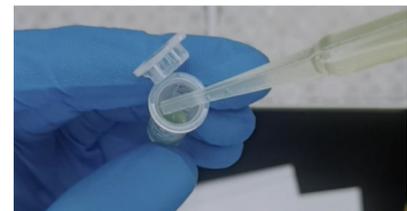
Registrar el código de muestra en la hoja de registro proporcionada para cada ejemplar de planta muestreado: El número de muestra (e.g., M1, M2, M3...), fecha de extracción (DD/MM/AA), código del tubo del extracto (e.g., J1M1A y J1M1B).

Especie	Número de accesión	Muestra	Código del tubo	Fecha extracción
		M1	J1M1A J1M1B	DD/MM/AA
		M2	J1M2A J1M2B	DD/MM/AA
		M3	J1M3A J1M3B	DD/MM/AA
		M4	J1M4A J1M4B	DD/MM/AA

3

COLOCAR EL EXTRACTO EN EL TUBO

Introducir mínimo un 1 ml de la bolsa de extracto en cada tubo, obteniendo así dos tubos (A y B) para cada extracto.



4

SELLAR LOS TUBOS CON PARAFILM

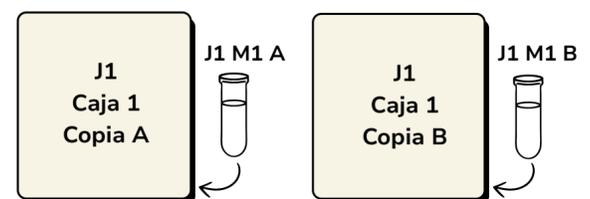
Para evitar derrames y evaporación de la muestra, sellar los tubos con Parafilm una vez llenos. Corte el Parafilm siguiendo el método ilustrado en la imagen.



5

COLOCAR EL TUBO EN SU CAJA CORRESPONDIENTE

Colocar el tubo con la replica A en la caja 'Copia A'. Colocar el tubo con la replica B en la caja 'Copia B'.



6

RECOMENDACIÓN: ALMACENAMIENTO EN FRÍO (-20°C)

Se recomienda almacenar las cajas con las muestras en un congelador (de -20°C) por al menos 15 días. Esto sirve para inactivar la bacteria (en caso de que estuviera presente) antes de realizar el envío.



7

ENVÍO DE LAS MUESTRAS

Envíe las muestras "A" al laboratorio mas cercano para el analisis de las mismas. Guarde las muestras "B" como respaldo hasta obtener los resultados del analisis.





IPSN
International Plant
Sentinel Network



IAS  CSIC



Funded by
the European Union



BEXYL
B E Y O N D X Y L E L L A

Este documento ha sido elaborado con el propósito de facilitar la recolección de muestras vegetales para la detección de la bacteria *Xylella fastidiosa*, en el marco del proyecto BeXyl: ‘Beyond Xylella, Integrated Management Strategies for Mitigating Xylella fastidiosa Impact in Europe’, una iniciativa de investigación financiada por la Unión Europea (UE).

www.bexylproject.com

[@BexylP](#)

[@EU_ScienceHub](#)

[@REA_research](#)

Referencias de imágenes:

- Mapa *Xylella fastidiosa* (Página 1):
 - EPPO 2024. EPPO Global Database. *Xylella fastidiosa* Distribution. Online: <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/distribution>
- Vectores de *Xylella fastidiosa* (Página 1):
 - Zielonka, M.W. 2021. *Biology and Integrated Management of Xylella fastidiosa subsp. pauca* (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae) on the olive tree, *Olea europaea* L. (Lamiales: Oleaceae). Agriculture & Environment Department, Harper Adams University, Newport, Shropshire TF10 8NB, UK.
- Síntomas de *Xylella fastidiosa* (Página 2):
 - EPPO 2024. EPPO Global Database. *Xylella fastidiosa* Photos. Online: <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>
 - POnTE 2024. Pesy Organisms Threatening Europe. Symptom-Xylella. Online: <https://www.ponteproject.eu/symptom-xylella/>
 - Johnson, K.A., Brannen, P.M. & Bock C.H. 2022. *Phony Peach Disease*. University of Georgia, USA. Online: <https://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=C1253&title=phony-peach-disease>
 - CDFA 2024. California Department of Food and Agriculture. Citrus variegated chlorosis Pest Profile. Online: https://www.cdfa.ca.gov/citrus/pests_diseases/cvc.html#collapse6