

Foto 1. Almendro afectado por Almond leaf scorch causado por *Xylella fastidiosa* en Alicante (E. Marco-Noales, IVIA).

Ester Marco-Noales

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

Blanca B. Landa

Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Córdoba

Origen de las introducciones de *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* en Europa

Un trabajo colaborativo entre investigadores de diferentes países europeos y americanos, que se recoge en la revista *Applied and Environmental Microbiology* (Landa y col., 2020), trata de arrojar luz sobre el modo en que *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex*, la subespecie más frecuente en Europa, puede haber llegado al viejo continente. Para ello se compararon las secuencias de los genomas completos de numerosas cepas, realizándose análisis filogenéticos que han permitido establecer relaciones de parentesco entre ellas. Los resultados indican que *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* ha sido introducida al menos en cinco ocasiones distintas en diferentes países europeos, probablemente desde California, situándose el ancestro común a las introducciones europeas y a las propias introducciones en California en el área sudoriental de Estados Unidos.

El riesgo asociado a una enfermedad infecciosa está de máxima actualidad porque lo estamos viviendo en primera persona con la pandemia Covid-19. La tasa de introducción de organismos patógenos exóticos se ha ido incrementando con el paso de los años debido al aumento vertiginoso de viajes, intercambios y transacciones comerciales -la llamada globalización-. Existen numerosos ejemplos de este fenómeno de infecciones emergentes en cualquier parte del mundo. En el caso de las plantas, la introducción de organismos fitopatógenos se ha relacionado con más de la mitad de las nuevas enfermedades o grandes epidemias descritas en los últimos años, y esto supone una amenaza para la seguridad alimentaria y los ecosistemas agrarios y forestales en general. La introducción de insectos vectores, capaces de vehicular determinados patógenos de plantas, constituye otro importante riesgo de dispersión.

Las pérdidas que producen las enfermedades tienen consecuencias no solo económicas sino también sociales y medioambientales. En el ámbito de la Unión Europea (UE), las medidas de protección contra la introducción de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, y contra su propagación en el interior de la Comunidad, se recogen en la Directiva 2019/523, que revisa las medidas ya establecidas por la Directiva 2000/29/CE y establece la lista de organismos de cuarentena en la UE. La concienciación sobre la amenaza que las enfermedades vegetales pueden suponer ha sido mayor desde 2013, debido a la devastación de millones de olivos causada por *Xylella fastidiosa* (OQDS, *olive quick decline syndrome*) en la principal zona productora de Italia, la región de Apulia. Posteriormente, se han ido detectando brotes de *X. fastidiosa* en distintos países de Europa meridional en otros cultivos agrícolas, como almendro y vid, y también en especies endémicas de ecosistemas forestales naturales y en plantas ornamentales.

X. fastidiosa es una bacteria restringida al xilema de la planta hospedadora, y se propaga a través de insectos vectores que se alimentan de la savia bruta. Cerca de seiscientos especies de plantas están catalogadas como

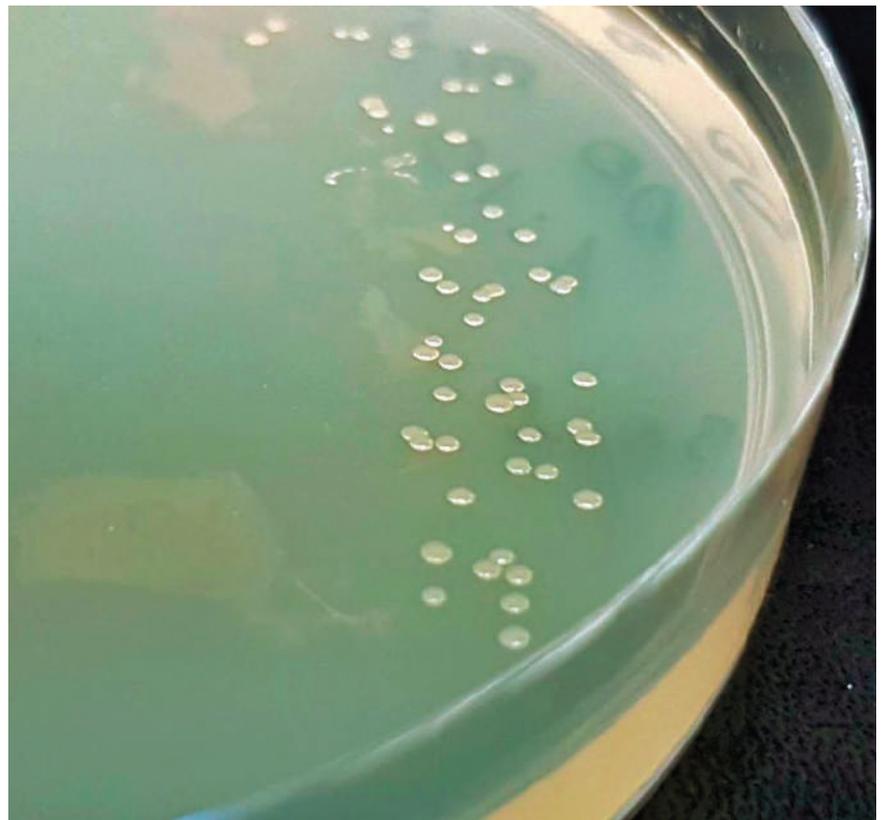


Foto 2. Colonias, en un medio de cultivo de laboratorio, de una cepa de *Xylella fastidiosa* aislada de almendro en el brote de Alicante (A. Monterde y S. Barbé, IVIA).

susceptibles de infección por este patógeno, posiblemente en relación con su elevada diversidad genética. Dicha diversidad se agrupa, por un lado, en tres subespecies principales: *fastidiosa*, *multiplex* y *pauca*, aunque también se han descrito otras como *morus*, *sandyi* y *tashke*, menos extendidas y estudiadas que las primeras; y, por otro, en lo que se denominan tipos de secuencia (ST, *sequence types*), basados en el análisis simultáneo de siete genes de mantenimiento de funciones celulares básicas. Mediante este análisis MLST (*multilocus sequence typing*) se asignan cepas a grupos genéticos o STs, no solo con la intención de clasificarlas sino de obtener información sobre qué especies vegetales pueden ser susceptibles a las mismas. Sin embargo, cepas de una misma subespecie o un mismo ST pueden tener un importante grado de diversidad, ya que los datos que pueden obtenerse del análisis de pequeños fragmentos del genoma, en comparación con la secuencia de los genomas completos, son muy sesgados. Sin embargo, las estrategias diseñadas por la Comisión Europea para hacer frente a

los brotes de *X. fastidiosa* y tratar de evitar su diseminación se basan, hoy por hoy, en la subespecie detectada en cada zona.

Las subespecies de *X. fastidiosa* se originaron cada una en un área geográfica distinta de América, pero a lo largo del tiempo se han dispersado y establecido varias veces, y tanto el norte, como el centro y el sur del continente han sido origen y destino de introducciones de la bacteria. La emergencia de *X. fastidiosa* en el sur de Italia se debió a una cepa de la subespecie *pauca*, probablemente a través de comercio de material vegetal infectado procedente de América Central, ya que mediante estudios genéticos se comprobó la elevadísima similitud con una cepa de *X. fastidiosa* aislada de una planta ornamental de aquella región.

En los brotes europeos se han identificado las subespecies *pauca*, *multiplex*, *fastidiosa* y *sandyi*, y hasta 9 STs distintos. El conocimiento de las posibles vías de dispersión que ha seguido la bacteria puede contribuir a evitar futuras introducciones y, por consiguiente, nuevos daños, y también a dirigir los esfuerzos de gestión

dosier

| *Xylella fastidiosa* |

de un modo más certero. Es en este contexto donde surge la necesidad de comparar los genomas completos de cepas de *X. fastidiosa* aisladas en distintas áreas geográficas tanto de América como de Europa.

Estrategias para conocer el origen de los brotes de *X. fastidiosa* en Europa

En un trabajo conjunto entre centros de investigación americanos y europeos, científicos de España, Italia, Estados Unidos y Brasil hemos realizado un estudio comparativo con las secuencias del genoma completo de 45 cepas de *X. fastidiosa*, quince de ellas de los brotes españoles de Baleares y Alicante, tres de Córcega (Francia), tres de la Toscana (Italia), 23 de distintas procedencias de Estados Unidos y una de Brasil, a fin de inferir los posibles orígenes de todas ellas y las vías de introducción en cada uno de los dos continentes. Cuatro cepas eran de la subespecie *fastidiosa*: una aislada de almendro en California, y dos de vid y una de cerezo en Mallorca. Las cepas de la subespecie *fastidiosa* se utilizaron a modo de referencia, pero el estudio se centró en la subespecie *multiplex*, la más abundante y extendida en Europa, con aislados obtenidos de diversos hospedadores: almendro, retama, polígala, siempreviva, aladierno e higuera, procedentes de los brotes de España, Francia y norte de Italia; y almendro, ciruelo, ciruelo japonés, arándano, olivo, plátano de sombra, roble americano, olmo americano, pecán y girasol, entre otros, de California y de diversas localizaciones sudorientales de Estados Unidos; la cepa de Brasil era de ciruelo. De este modo, la representatividad de los diferentes brotes estaba garantizada. Se analizaron también pequeños cambios en la secuencia del genoma debidos a nucleótidos aislados (SNP, *Nucleotide Single Polymorphism*), una herramienta adicional para explorar la diversidad genética de los organismos.

Con la secuencia de los genomas completos de cada una de las cepas de *X. fastidiosa*, se realizaron análisis filogenéticos para comprobar la relación de parentesco entre ellas, intentando en cierto modo localizar lo que llamaríamos ancestros o antepa-

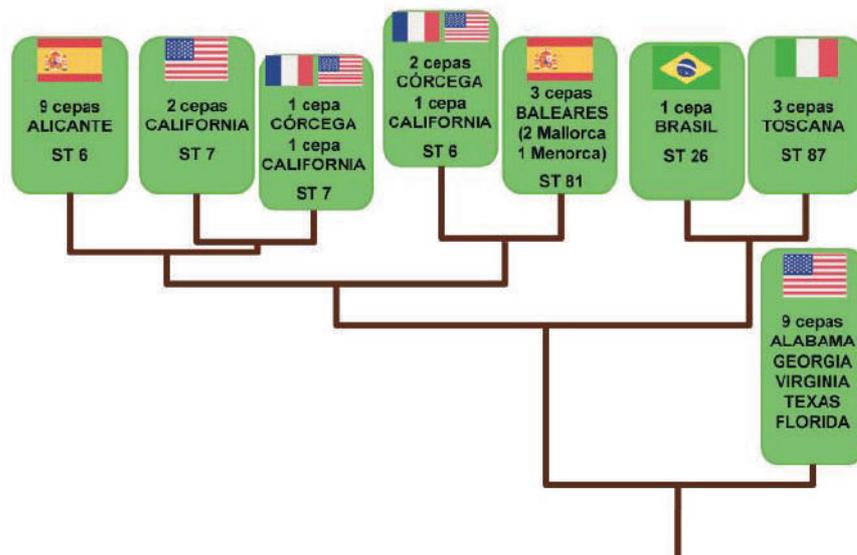


Figura 1. Árbol filogenético simplificado de las relaciones entre cepas de *Xylella fastidiosa* de Europa y América (ver la información completa en la Figura 1 de Landa y col., 2020. <https://doi.org/10.1128/AEM.01521-19>).

sados. En función de las semejanzas y diferencias, tanto entre las secuencias como entre los SNPs, se construyeron árboles filogenéticos, en los que las cepas se sitúan en ramas que se van separando por puntos de bifurcación o nodos, según el grado de divergencia, y más o menos largas como aproximación al tiempo desde que las cepas empezaron a divergir.

Origen de la aparición de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* en Europa

En la Figura 1 podemos ver un árbol filogenético simplificado de las relaciones que se han podido establecer en función del análisis de los genomas completos, partiendo de que las poblaciones ancestrales y/o endémicas tienden a ser más diversas genéticamente que las introducidas. Los ancestros de las cepas de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* parecen provenir del sudeste de los Estados Unidos, puesto que las cepas de Georgia, Florida, Alabama y Texas presentan secuencias más diversas y podrían haber dado lugar a las secuencias de las demás cepas. Incluso las cepas de esta subespecie de California, que no presentan una gran diversidad genética, parecen tener sus ancestros en aquella región del otro lado del país. La baja diversidad de nucleótidos, tanto de las cepas de California como de las de Europa, es similar, lo que apoya la hipótesis de que ambas

poblaciones son relativamente jóvenes. Por consiguiente, tanto las cepas de California como las de Europa, y también la de Brasil, tienen probablemente un ancestro común en la zona suroriental de Estados Unidos. No obstante, en todos los casos no es fácil determinar el origen y el destino; por ejemplo, las cepas de la Toscana, Italia, podrían haberse originado tanto en California como en el sudeste de los Estados Unidos, porque están en ramas no muy distantes de las cepas presentes a un lado y otro del árbol filogenético.

La comparación indica también que ha habido múltiples introducciones de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* en Europa (Figura 2), porque las secuencias de las cepas analizadas son suficientemente distintas como para proceder de eventos de entrada independientes. Y la mayoría de introducciones debieron ser probablemente desde California, que a su vez, como hemos comentado, procedían del sudeste de los Estados Unidos, donde puede que la subespecie *multiplex* sea endémica. Se podría decir que son, de algún modo, introducciones desde el sudeste de Estados Unidos vía California. Las cepas europeas del ST6, ST7 y ST81 indican cuatro eventos de introducción en tres áreas distintas: dos en la isla de Córcega (uno representado por las cepas del ST6 y otro por la cepa del ST7), uno en Menorca y Mallorca (tres cepas del ST81), y uno en Alicante (nueve cepas del

ST6). Este grupo de cepas de los ST 6, 7 y 81 difieren menos entre ellas que todo el grupo de aislados estudiados de la subespecie *multiplex*. Pero es interesante que, a pesar de ello, las diferencias entre las cepas del ST6 de Francia y de Alicante indican que este ST, que es asignado según el análisis MLST, no tiene un único origen. De hecho, las cepas de Alicante (ST6) se sitúan en ramas del árbol más cercanas a las cepas del ST7 que a las otras cepas del ST6, de California y Francia, más próximas a su vez a las cepas del ST81 de Menorca y Mallorca.

El árbol filogenético construido con los SNPs de las cepas de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* fue muy similar al construido de acuerdo a las secuencias de los genomas completos. Así, las cepas de Alicante por un lado, Mallorca y Menorca por otro, y la Toscana por otro, formaban grupos compactos. Y tanto la longitud de las ramas, que era corta, como el pequeño número de diferencias en los SNPs revelaban una diversidad genética baja dentro de cada uno de estos grupos de cepas, lo que nos lleva a pensar que la introducción de la bacteria en cada una de estas áreas debió ser reciente. Esta hipótesis viene avalada también por el hecho de que las cepas del sudeste de Estados Unidos, de donde se cree que puede proceder el ancestro, son mucho más diversas que los aislados de Europa y también que los de California, que sería el punto de origen más inmediato de las introducciones europeas.

Las plantas asintomáticas son un reservorio para la dispersión de la bacteria a largas distancias

En el estudio se emplearon cepas europeas de *X. fastidiosa* aisladas no solamente de plantas cultivadas sino también de plantas de ecosistemas naturales, con y sin síntomas. Esta bacteria infecta cientos de especies vegetales diferentes, en la mayoría de casos sin producir ningún tipo de sintomatología. Incluso en algunos casos puede que la relación con la planta hospedadora sea de tipo comensalista; es decir, que la presencia de la bacteria no produzca a la planta ningún beneficio, pero tampoco un daño. Así que la bacteria puede

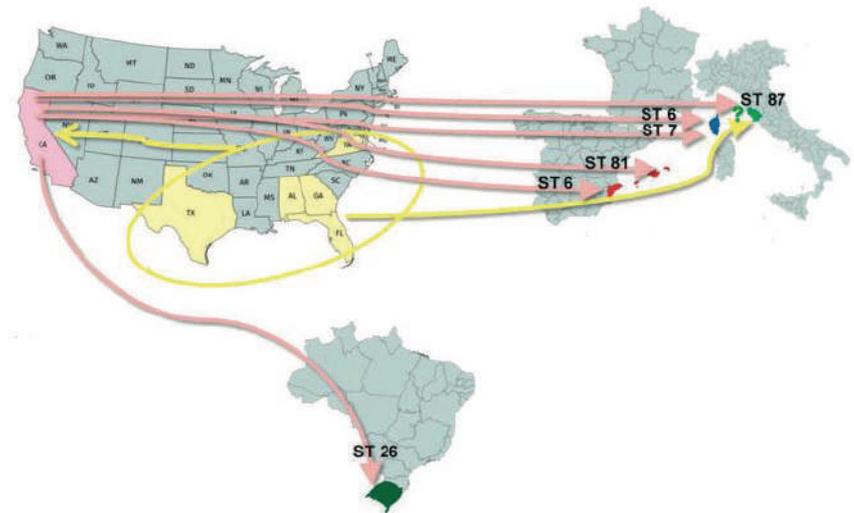


Figura 2. Posibles vías de introducción de *Xylella fastidiosa* en los diferentes brotes de Europa donde se ha identificado la subespecie *multiplex*.

pasar completamente desapercibida en multitud de ocasiones, por lo que, durante décadas y desde hace muchos años, puede haber estado saltando la barrera intercontinental, al no existir los controles que se llevan a cabo en frontera hoy en día después de la epidemia de olivo del sur de Italia. La transmisión de *X. fastidiosa* por insectos vectores es la forma de dispersión más importante a nivel local, pero no entre continentes, así que el comercio de material vegetal asintomático infectado con la bacteria explica, con toda probabilidad, las varias introducciones de *X. fastidiosa* en Europa reveladas por la comparación de los genomas completos.

Recombinación entre las cepas europeas de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*

La recombinación homóloga es un mecanismo por el que las células procariontes intercambian material genético. El efecto de este intercambio es que se incrementa la variabilidad genética sobre la que la selección natural puede actuar, aunque en sí misma no supone un cambio cualitativo en alguna característica de la célula receptora del material genético. Por los estudios que se han hecho en diversas bacterias, también en *X. fastidiosa*, se sabe que la mezcla de formas genéticamente divergentes dentro de una misma especie puede dar lugar a recombinantes capaces de inva-

dir nuevos nichos, que en el caso de *X. fastidiosa* serían nuevas especies vegetales. Por ello, las introducciones continuas de una bacteria patógena en un área pueden desembocar en recombinaciones entre las cepas introducidas, y eso puede complicar cualitativamente el problema creado con la primera introducción.

En el análisis de eventos de recombinación entre las cepas europeas de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* y de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, se identificaron regiones de recombinación con más de cien genes, en el caso de las cepas de la subespecie *fastidiosa*, y más de setenta, en el caso de las cepas de la subespecie *multiplex*, en su mayoría correspondientes a proteínas con funciones desconocidas. Estos eventos de recombinación indican que las cepas donadoras son las de la subespecie *fastidiosa* y las receptoras las de *multiplex*, pero entre estas últimas nunca están las cepas de Alicante, solo las *multiplex* de Baleares, Córcega y la Toscana. Las recombinaciones más numerosas se identificaron entre las cepas de la subespecie *fastidiosa* de Mallorca y Menorca y las de *multiplex* de la Toscana. En esta línea, es curioso que se detectaron más eventos de recombinación entre cepas de poblaciones de distinto lugar geográfico, como las de Mallorca con las de la Toscana italiana, que entre cepas de poblaciones de un mismo lugar, como las varias cepas de Mallorca (el único lugar de Europa donde coexisten las dos

subespecies, *fastidiosa* y *multiplex*). La interpretación más plausible es que esos eventos de recombinación se produjeran en Norteamérica, antes de la introducción de estas cepas en Europa, donde luego, dependiendo del destino de un mismo material inicial, cepas más similares entre sí han llegado a lugares más alejados que cepas más distintas en origen.

Implicaciones de los datos obtenidos y las técnicas utilizadas

El análisis MLST ha sido y es muy utilizado para clasificar la diversidad genética observada en la especie *X. fastidiosa* y en sus subespecies, y para indagar posibles vías de dispersión y potenciales hospedadores. Pero la comparación de las cepas europeas y sus relaciones de parentesco nos han mostrado que el análisis MLST puede no ser suficiente con estos propósitos. Por un lado, las cepas que pertenecen a un mismo ST pueden no tener un mismo origen, como ha quedado patente en el caso de las cepas del ST6 de Alicante y Córcega, que pertenecen a grupos diferentes a pesar de compartir el mismo ST. Esto tiene importantes repercusiones, ya que mediante el ST no siempre se puede identificar la posible gama de hospedadores a los que ese grupo genético puede infectar. Por tanto, las medidas para hacer frente a los brotes de la bacteria o las relacionadas con el comercio de material vegetal no pueden basarse simplemente

en inferencias realizadas a partir de los diferentes grupos genéticos, porque esto podría comprometer la eficacia de las medidas a adoptar.

Conclusiones

La subespecie *multiplex* ha sido introducida varias veces en Europa, en la mayoría de casos vía California, a donde probablemente llegó desde el sudeste de Estados Unidos, área en que se sitúa el ancestro de las cepas de esta subespecie. En California se dispersó, principalmente por los cultivos de almendro y por plantas del entorno natural, posteriormente fue introducida en Europa a través del comercio de material vegetal y se ha establecido con éxito en nuestro continente.

La baja diversidad de las cepas europeas apoya la hipótesis de introducciones recientes, múltiples en el caso de Córcega y únicas en cada uno de los brotes de Italia (Toscana) y España (Mallorca y Menorca por un lado y Alicante por otro). Esta hipótesis está avalada también por las escasas huellas de eventos de recombinación entre cepas, que, además, no se detectan en poblaciones de una misma zona, por lo que debieron ocurrir antes de la entrada de la bacteria en Europa.

Aunque por ahora no estamos en condiciones de datar con precisión cada introducción, podemos suponer que se produjeron antes de la aplicación de los estrictos reglamentos que desde hace años rigen el comercio de

plantas. Si fueran posteriores, estas introducciones tendrían que haberse producido a través de especies de plantas consideradas no susceptibles o mediante introducciones ilegales.

Los riesgos del comercio de material vegetal a escala mundial requieren minimizar la probabilidad de dispersión de organismos patógenos. Y, en este contexto, la información que proporcionan las secuencias de los genomas completos es fundamental para determinar las vías de dispersión o las relaciones entre las cepas de *X. fastidiosa*, lo que tiene importantes consecuencias no solo para el conocimiento de su ecología sino también para la toma de decisiones por parte de las autoridades competentes y el desarrollo de estrategias de gestión.

Agradecimientos

Parte de la información recogida en este artículo ha sido financiada por el Proyecto 727987 XF-ACTORS (*Xylella Fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy) del Programa de Investigación e Innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea, el Proyecto E-RTA 2017-00004-C02 FEDER INIA-AEI del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español, y la Plataforma Temática Interdisciplinar sobre *Xylella fastidiosa* (SolXyl) del CSIC. Agradecemos a todos los compañeros de esos proyectos su participación o contribución, de diferentes maneras, al desarrollo de los mismos.

Bibliografía

- ! - DIRECTIVA DE EJECUCIÓN (UE) 2019/523 DE LA COMISIÓN de 21 de marzo de 2019 por la que se modifican los anexos I a V de la Directiva 2000/29/CE del Consejo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad.
- Hyatt-Twynam, S.R., Parnell, S., Stutt, R.O., Gottwald, T.R., Gilligan, C.A., Cunniffe, N.J. 2017. Risk-based management of invading plant disease. *New Phytologist* 214(3): 1317-1329.
- Landa, B.B., Castillo, A.I., Giampetruzzi, A., Kahn, A., Román-Écija, M., Velasco-Amo, M.P., Navas-Cortés, J.A., Marco-Noales, E., Barbé, S., Moralejo, E., Coletta-Filho, H.D., Saldarelli, P., Saponari, M., Almeida, R.P.P. 2020. Emergence of a plant pathogen in Europe associated with multiple intercontinental introductions. *Appl. Environ. Microbiol.* 86: e01521-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01521-19>.
- Landa, B.B., Marco-Noales, E., López, M.M. 2017. Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Cajamar Cajamarul ediciones, 320 p.
- Sicard, A., Zeilinger, A.R., Vanhove, M., Schartel, T.E., Beal, D.J., Daugherty, M.P., Almeida, R.P.P. 2018. *Xylella fastidiosa*: insights into an emerging plant pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56: 181-202. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045849>.