



## IDENTIFICACIÓN DE *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* EN PLANTAS CULTIVADAS Y SILVESTRES EN PARRAS, COAHUILA, MÉXICO

## IDENTIFICATION OF *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* IN CULTIVATED AND WILD PLANTS IN PARRAS, COAHUILA, MEXICO

Sandra L. Moya-Hernández<sup>1,2</sup>, Ana M. Hernández-Anguiano<sup>2\*</sup>, J. Abel López-Buenfil<sup>1</sup>, Sergio Aranda-Ocampo<sup>2</sup> y Andrés Aguilar-Granados<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Tecámac, Estado de México, México. <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Posgrado de Fitosanidad-Fitopatología, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

\*Autora de correspondencia (ahernandez@colpos.mx)

### RESUMEN

*Xylella fastidiosa* es una bacteria Gram negativa que infecta plantaciones de vid (*Vitis vinifera* L.) en el municipio de Parras, Coahuila, México. La presente investigación tuvo como objetivo identificar la subespecie de *X. fastidiosa* y determinar su asociación con diferentes especies de plantas cultivadas y silvestres en el municipio. Durante el verano y otoño de 2018 se obtuvieron, en dos predios del municipio de Parras, 83 muestras procedentes de árboles frutales (n = 36), incluyendo vid, árboles forestales (n = 4), plantas ornamentales (n = 2) y plantas silvestres (n = 41). Para la identificación de la bacteria se amplificaron por PCR secuencias parciales de los genes *gyrB*, *HL* y *16S rRNA*, así como de los genes de mantenimiento (MLST) *leuA*, *petC*, *malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL* y *gltT*, además del gen de adherencia a superficies *pilU*. La reconstrucción filogenética mostró que las secuencias amplificadas correspondieron a *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*. El clado *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* mostró que las secuencias concatenadas de los genes MLST se agruparon con las secuencias ST1, ST2 y ST3, y las del gen *pilU* con la secuencia ST1. Los resultados confirmaron la presencia de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* en las especies cultivadas de *Carya* sp., *Cydonia* sp., *Ficus carica*, *Olea europaea* y *V. vinifera*, y en las especies silvestres *Celtis pallida*, *Baccharis* sp., *Phragmites* sp. y *Rubus* sp. Sólo en *Cydonia* sp., *O. europaea*, *Phragmites* sp. y *V. vinifera* se registró síntoma de escaldadura en las hojas, característico de *X. fastidiosa*. Los resultados indican que en el municipio de Parras, Coahuila se presentan infecciones recurrentes que representan una fuente de inóculo de la bacteria para los viñedos, principal cultivo de la región. Este es el primer reporte de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* en *Cydonia* sp., la cual se propone como nuevo hospedante de la bacteria.

**Palabras clave:** *Cydonia*, *Olea europaea*, *Phragmites*, *Xylella fastidiosa*, MLST, PCR.

### SUMMARY

*Xylella fastidiosa* is a Gram negative bacterium that infects vine plantations (*Vitis vinifera* L.) in the municipality of Parras, Coahuila, México. This research aimed to identify the subspecies of *X. fastidiosa* and determine its association with different species of cultivated and wild plants in the municipality. During Summer and Autumn 2018, 83 samples of fruit trees (n = 36), including vine, forest trees (n = 4), ornamental plants (n = 2) and wild plants (n = 41) were collected from two sites in the municipality of Parras. For bacterial identification, partial sequences of the *gyrB*, *HL*, and *16S rRNA* genes were amplified by PCR, as well as the housekeeping genes (MLST) *leuA*, *petC*, *malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL* and *gltT*, in addition to the *pilU* adherence to surface gene. Phylogenetic reconstruction showed that the amplified sequences corresponded to *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*. Clade *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* and that the

concatenated sequences of the MLST genes were grouped with the sequences ST1, ST2 and ST3, and those of the *pilU* gene with ST1. Results confirmed the presence of *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* in the cultivated species of *Carya* sp., *Cydonia* sp., *Ficus carica*, *Olea europaea* and *V. vinifera*, and in the wild species *Celtis pallida*, *Baccharis* sp., *Phragmites* sp. and *Rubus* sp. Only in *Cydonia* sp., *O. europaea*, *Phragmites* sp. and *V. vinifera* scalding symptom was registered on the leaves, a characteristic of *X. fastidiosa*. Results show the presence of recurrent infections in the municipality of Parras, Coahuila, that represent a source of inoculum of the bacteria for the vineyards, the main crop in the region. This is the first report of *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* in *Cydonia* sp., which is proposed as a new host for the bacterium.

**Index words:** *Cydonia*, *Olea europaea*, *Phragmites*, *Xylella fastidiosa*, MLST, PCR.

### INTRODUCCIÓN

*Xylella fastidiosa* es un grupo heterogéneo de bacterias Gram negativas, limitadas al xilema de las plantas, con capacidad de infectar diversas especies de plantas herbáceas, arbustivas o leñosas, cultivadas o adventicias (EFSA, 2018; Marco-Noales *et al.*, 2017) y de ocasionar numerosas enfermedades, entre las que destacan la enfermedad de Pierce en vid (*Vitis vinifera*), phony en durazno (*Prunus persica*), clorosis variegada de los cítricos en naranjo dulce (*Citrus sinensis*), decaimiento súbito del olivo en olivo (*Olea europaea*) y quemadura de la hoja de la rosa laurel (*Nerium oleander*) (Baldi y La Porta, 2017). Aunque algunas de las especies de plantas desarrollan síntomas y otras no, todas ellas son de importancia por el papel que juegan en la epidemiología de las enfermedades que ocasiona la bacteria (IPPC, 2018).

Actualmente, con base en el tipo de secuencia (Sequence Type, ST) obtenido mediante el genotipado de secuencias multilocus (Multilocus Sequence Typing, MLST) (Yuan *et al.*, 2010), los aislados de *X. fastidiosa* se clasifican en las subespecies *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, *X. fastidiosa* subsp. *pauca* y *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (Baldi y La Porta, 2017), pero

independientemente del genotipo, *X. fastidiosa* se transmite de forma persistente por insectos vectores especializados considerados como los principales responsables de la dispersión natural de la bacteria (Morente y Fereres, 2017).

En 2005 se detectó por primera vez la presencia de *X. fastidiosa* en el municipio de Parras, Coahuila, por lo que se ha implementado la Campaña Nacional Contra la Enfermedad de Pierce para el manejo de la enfermedad y sus vectores, así como medidas estratégicas para reducir y evitar la dispersión de la bacteria hacia zonas libres de la enfermedad (SENASICA, 2019); sin embargo, a pesar de que durante el periodo de 2016 a 2018 en el municipio de Parras se registró un aumento en la superficie sembrada con un incremento del 64 % en la producción, el rendimiento por unidad de superficie mostró una reducción del 17 % respecto a lo registrado en los seis años anteriores a este periodo (SIAP, 2019).

Lo anterior indica que aún con la implementación de la campaña, es posible que la enfermedad de Pierce continúe afectando los rendimientos por unidad de superficie de la producción de uva en el estado (SENASICA, 2017; Com. Pers.)<sup>1</sup>, debido a que *X. fastidiosa* es un factor limitante para la producción de vid y que las zonas donde se siembra este cultivo están rodeadas por árboles frutales y forestales, además de plantas silvestres que podrían ser hospedantes de la bacteria. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue identificar la subespecie de la bacteria presente en Parras, Coahuila, y determinar su asociación con diferentes especies de plantas cultivadas y silvestres, a fin de contribuir al entendimiento de la epidemiología y manejo de las enfermedades ocasionadas por *X. fastidiosa* en el municipio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolecta de muestras

Las muestras de plantas cultivadas y silvestres se recolectaron en los meses de junio, agosto, septiembre y octubre de 2018 en los predios La Encantada (4 ha) y San Lorenzo (10 ha) del municipio de Parras, Coahuila (25° 26' 13" latitud N, 102° 11' 01" longitud O). Se obtuvieron 83 muestras correspondientes a diferentes géneros y especies de árboles frutales (n = 36), que incluyeron vid, árboles forestales (n = 4), plantas ornamentales (n = 2) y

plantas silvestres (n = 41). Se muestrearon secciones de tallo con cinco a 20 hojas de plantas de vid durante la etapa de fructificación, de cinco a 10 hojas con peciolo de árboles frutales y forestales y de plantas ornamentales.

De plantas silvestres se obtuvieron ejemplares completos en etapa vegetativa y floración, ubicadas entre las hileras o adyacentes a los viñedos o cercanas a cuerpos de agua. Algunas de las muestras presentaban síntomas de clorosis, marchitez o escaldadura (quemadura de tejido). Estas muestras se colocaron entre toallas de papel secante, se guardaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se almacenaron en frío hasta su análisis en el laboratorio. La identificación de plantas silvestres se hizo tomando como referencia el catálogo de Malezas de México (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>).

En el mes de agosto en el predio de San Lorenzo se instaló por 4 días una trampa de panel amarillo en la vegetación silvestre aledaña a un viñedo, donde se capturaron seis ejemplares de insectos para determinar la presencia de vectores de *X. fastidiosa*. La detección de la bacteria se realizó después de la identificación de los insectos con la clave taxonómica de Young (1968).

### Detección de *Xylella fastidiosa*

#### Extracción de DNA total

La extracción se llevó a cabo a partir de peciolos y nervaduras centrales de cinco a 10 hojas de frutales, forestales y ornamentales; de 0.5 a 0.8 g de hojas de plantas silvestres y de la cabeza (sin ojos) de insectos (Loconsole *et al.*, 2014). El tejido se colocó en morteros estériles y se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se depositaron 0.5 g del macerado en un tubo estéril (2.0 mL, Eppendorf®), se adicionaron 1.5 mL de CTAB 2 % (20.0 g de bromuro de hexadecil-trimetil-amonio, 82.0 g de NaCl, 2.42 g de tris base, 1.46 g de EDTA en 1 L de agua destilada) y 100 µL de dodecil sulfato sódico 10 %, se mezcló en un vórtex por 60 s, se incubó a 80 °C por 20 min y 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 × g por 15 min. Posteriormente, 1 mL del extracto se transfirió a un tubo estéril (2.0 mL, Eppendorf®), se adicionaron 500 µL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, Sigma-Aldrich®), se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,000 × g por 15 min. Se transfirieron 600 µL del sobrenadante a un tubo estéril y se adicionó medio volumen de etanol:metanol:ácido acético glacial (9:3:1, Sigma-Aldrich®), se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,000 × g por 10 min.

<sup>1</sup>SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2017) Programa de trabajo de la campaña de enfermedad de Pierce, del incentivo de prevención de plagas fitosanitarias reglamentadas del Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria 2017 del Estado de Coahuila. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Ciudad de México. 7 p. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/300089/00269\\_Programa\\_de\\_Trabajo\\_Coahuila\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/300089/00269_Programa_de_Trabajo_Coahuila_2017.pdf) (Diciembre 2020).

El DNA se precipitó con 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla fría de etanol:agua:metanol:acetato de sodio 3 M (30:9:5:1, Sigma-Aldrich®) y 500  $\mu\text{L}$  de etanol frío 70 % (Sigma-Aldrich®) y se centrifugó a  $13,000 \times g$  por 5 min. La pastilla de DNA se secó a temperatura ambiente por 1 h y se re-suspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular (Sigma-Aldrich®). La pureza y cantidad del DNA se estimó por espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, USA) previo a las amplificaciones por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### PCR-punto final

Se amplificaron las secuencias parciales de los genes *gyrB* y *HL* con los iniciadores XYgyr499/XYgyr907 y HL5/HL6, respectivamente (Francis *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2003). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  con 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer de PCR 10X, 0.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTP's (10 mM) 1  $\mu\text{L}$  por iniciador (10  $\mu\text{M}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerasa (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ , Invitrogen®, USA), 5  $\mu\text{L}$  de DNA (100 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y 13.95  $\mu\text{L}$  de agua. Para los controles se prepararon mezclas con DNA de la cepa ATCC® 35879™ de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* para el positivo y para los negativos se utilizó el DNA de una planta de vid sana y otro con agua (sin DNA molde).

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5 %, se consideró una muestra positiva cuando la banda de DNA del tamaño esperado se visualizó en un fotodocumentador (Gel Doc EZ Imager, BioRad®, Hercules, California, EUA). Los amplicones correspondientes a los genes *gyrB* (429 pares de bases, pb) y *HL* (221 pb) se secuenciaron en un equipo Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems®, Foster City, California, EUA) mediante la química BigDye Terminator v 3.1. Las secuencias sentido (F) y antisentido (R) se analizaron y editaron con el programa BioEdit® v 7.0.9.0 (Hall, 1999). Las secuencias consenso se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### PCR-tiempo real

Se amplificó la secuencia parcial del gen *16S rRNA* con los iniciadores XF-F/XF-R y la sonda XF-P Taqman (Harper *et al.*, 2010). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 22  $\mu\text{L}$  que consistió en 2.2  $\mu\text{L}$  de buffer de PCR 10x, 1.76  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.6  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTP's (10 mM), 0.6  $\mu\text{L}$  por iniciador (10  $\mu\text{M}$ ), 0.4  $\mu\text{L}$  de

*Taq* DNA polimerasa (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 0.1  $\mu\text{L}$  de sonda (10  $\mu\text{M}$ ), 4  $\mu\text{L}$  de DNA (80 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y 11.64  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular. Para los controles se prepararon mezclas como se indicó anteriormente. La reacción se estableció en un sistema de PCR-tiempo real CFX96™ (BioRad®, Hercules, California, EUA). Se consideró una muestra positiva cuando la fluorescencia alcanzó valores de  $C_q < 35.00$ .

### Identificación de la subespecie de *X. fastidiosa*

Se amplificaron secuencias parciales de los genes MLST de mantenimiento: *leuA*, *petC*, *malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL*, *gltT* y del gen de adherencia a superficies *pilU* (Harris y Balci, 2015; Yuan *et al.*, 2010). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  y consistió en 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer de PCR 10X, 0.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTP's (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  por iniciador (10  $\mu\text{M}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerasa (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 5  $\mu\text{L}$  de DNA y 13.95  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular. Las bandas de DNA esperadas se visualizaron en un fotodocumentador como se indicó anteriormente.

Para obtener el perfil alélico se secuenció el fragmento amplificado de una muestra positiva de *Baccharis* sp., *Carya* sp., *Celtis pallida*, *Cydonia* sp., *Ficus carica*, *Olea europaea*, *Phragmites* sp., *Rubus* sp., *Salsola kali*, *Tribullus terrestris* y un pasto (familia Poaceae), así como de tres muestras de *V. vinifera* y el fragmento de un insecto positivo. Las secuencias F y R de cada gen se analizaron, editaron y ensamblaron con el programa BioEdit® v. 7.0.9.0 (Hall, 1999). Las secuencias consenso se compararon con las secuencias de las subespecies de *X. fastidiosa* de la base de datos *Xylella fastidiosa* PubMLST Database (<https://pubmlst.org/xfastidiosa/>). A cada alelo de un gen se le asignó un número y con la combinación de números generada se determinó el tipo de secuencia (ST).

### Análisis filogenético

Se elaboraron dos árboles filogenéticos de *X. fastidiosa* con el método de máxima verosimilitud. Para el primer árbol se utilizaron 30 secuencias concatenadas de los siete genes MLST, de acuerdo con el orden indicado en *Xylella fastidiosa* PubMLST Database; para esto, las secuencias se editaron previamente y se alinearon con el ClustalW incluido en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6) (Tamura *et al.*, 2013). El segundo árbol se construyó con 12 secuencias de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* correspondientes al gen *pilU*; posteriormente, se determinó la confiabilidad de los clados con 1000 repeticiones bootstraps (Tamura, 1992). En ambos árboles se utilizó a *X. taiwanensis* como grupo externo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ocurrencia de *X. fastidiosa*

De 83 muestras en estudio, se detectaron 22 positivas a *X. fastidiosa* con los iniciadores XYgyr499/XYgyr907 y HL5/HL6. En los frutales de *Carya* sp. (nogal), *Cydonia* sp. (membrillo), *F. carica* (higuera), *O. europaea* (olivo) y *V. vinifera* (vid) se identificaron por secuenciación 14 muestras positivas, y en las especies silvestres de *Baccharis* sp. (jarilla), *C. pallida* (acebuche), *Phragmites* sp. (carrizo gigante), *Rubus* sp. (mora silvestre), *S. kali* (rodadera), *T. terrestris* (torito) y un pasto (familia Poaceae) se identificaron ocho muestras positivas para la bacteria. Del total de muestras sólo 12 resultaron positivas a *X. fastidiosa* cuando se analizaron con los iniciadores XF-F/XF-R y la sonda XF-P Taqman. Estas muestras correspondieron a *Carya* sp., *Cydonia* sp., *F. carica*, *Phragmites* sp. y *V. vinifera* (Cuadros 1 y 2). En el caso de los insectos capturados pertenecientes a especies de *Aphis* sp. (n = 1), *Chrysoperla* sp. (n = 2), *Empoasca* sp. (n = 1) y *Homalodisca* sp. (n = 2) se detectó con los iniciadores XYgyr499/XYgyr907, HL5/HL6, XF-F/XF-R y la sonda XF-P Taqman un solo insecto de *Homalodisca* positivo a *X. fastidiosa* (Cuadro 1). Las especies del género *Homalodisca* se han considerado entre los principales vectores de *X. fastidiosa* (Morente y Fereres, 2017), por lo que estudios futuros que incluyan mayor número de colectas (espacio-temporal) son necesarios para dilucidar el papel que pudieran tener insectos de este género en la dispersión de *X. fastidiosa* en la región.

Las secuencias de los productos de amplificación de las muestras positivas de plantas y las del insecto *Homalodisca* sp. se alinearon con las secuencias de los genes *gyrB* y *HL* de *X. fastidiosa* CP006740.1 y CP002165, respectivamente, con un porcentaje de identidad mayor a 97 %, excepto las de las muestras de *Cydonia* sp. (M2), *F. carica* (M48 y M49) y *Rubus* sp. (M11 y M63) (Cuadro 4). Es posible que el gen *HL* de estas muestras no estuviera bien amplificado o secuenciado (Baldi y La Porta, 2017).

En este estudio se registró casi el doble de muestras de especies frutales (39 %) que de plantas silvestres (20 %) positivas a *X. fastidiosa*, lo que sugiere que la presencia de la bacteria en el municipio de Parras, Coahuila puede deberse a introducciones de material propagativo de frutales infectados provenientes de otras regiones. En México, la mayor parte del material propagativo de *V. vinifera* proviene de los Estados Unidos de América, país que reporta desde 1880 la presencia de *X. fastidiosa* (Nunney et al., 2010) y con quien se tiene el mayor intercambio de este material vegetal. El movimiento de material propagativo mediado por personas es uno de los

principales factores responsables de la introducción de *X. fastidiosa* en áreas libres de la bacteria y de su aparición en nuevas especies de plantas hospedantes (Sicard et al., 2018).

Se observaron síntomas similares a los ocasionados por *X. fastidiosa* (Appel et al., 2010) sólo en las muestras de las siguientes especies: en *Cydonia* sp. y *Phragmites* sp. se observó escaldadura en el ápice de las hojas, y en *O. europaea*, escaldadura en el ápice de las hojas y marchitez en las ramas, similares al síndrome de decaimiento súbito del olivo (Loconsole et al., 2014) (Figura 1). En *V. vinifera* se detectaron plantas con clorosis, marchitez y defoliación prematura, escaldadura de la hoja, pasificación de frutos, síntoma de cerillo e islas verdes. Estos resultados indican que los viñedos están rodeados por especies de árboles perennes y de plantas silvestres infectadas, a partir de las cuales los insectos vectores pueden adquirir a *X. fastidiosa*, debido a que la dispersión de la bacteria generalmente se origina desde fuentes externas que sirven como alimento a los insectos vectores hacia el interior de los viñedos (Purcell y Saunders, 1999).

Con excepción de *Phragmites* sp., las plantas silvestres positivas a *X. fastidiosa*, pero con síntomas no visibles, pudieron estar actuando sólo como reservorios que contribuyen al mantenimiento y dispersión de la bacteria (Sicard et al., 2018). Los aislados de *X. fastidiosa* que ocasionan la enfermedad de Pierce en *V. vinifera* pueden también infectar a otras especies de plantas sin causar enfermedad debido a que en plantas con ausencia de síntomas las poblaciones de la bacteria declinan con el tiempo, tienen poca capacidad para multiplicarse y moverse sistémicamente en comparación con las de plantas sintomáticas (Purcell y Saunders, 1999); sin embargo, es necesario establecer estudios con los postulados de Koch para definir el papel de las plantas silvestres estudiadas en la región.

Por otro lado, las especies leñosas que permiten la reproducción de *X. fastidiosa* desarrollan síntomas típicos de enfermedad (Appel et al., 2010). En el caso de *Cydonia* sp. se observaron síntomas de escaldadura similares a los ocasionados por *X. fastidiosa* en otras especies vegetales (Harris et al., 2014), por lo que se propone a *Cydonia* como un hospedante de *X. fastidiosa* y candidata a integrarse en la lista de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2018). Posiblemente, la ausencia de síntomas en *Carya* sp. y *F. carica* se deba a una baja reproducción de la bacteria en el tejido de estas plantas, o bien, se trata de infecciones latentes como ocurre en árboles de roble rojo (*Quercus rubra*) y roble escarlata (*Q. palustris*) que no desarrollan síntomas cuando son atacados por la bacteria (Harris et al., 2014).

**Cuadro 1. Detección por PCR de *Xylella fastidiosa* en plantas cultivadas y silvestres e insectos en el predio San Lorenzo, municipio de Parras, Coahuila.**

Especie	Muestra (M) <sup>†</sup>	Iniciadores <sup>**</sup>		
		XYgyr499/907	HL5/HL6	XF-F/XF-R
<i>Salsola kali</i>	<b>M3</b>	+	+	-
<i>Celtis pallida</i>	<b>M2</b>	+	+	-
Pasto Poaceae <sup>†</sup>	<b>M55</b>	+	+	-
<i>Tribullus terrestris</i>	<b>M57</b>	+	+	-
<i>Rubus</i> sp.	<b>M11, M63</b>	+	+	-
<i>Aphis</i> sp.	I'5	-	-	-
<i>Empoasca</i> sp.	I'6	-	-	-
<i>Homalodisca</i> sp.	<b>I'1, I'2</b>	+ / -	+ / -	+ / -
<i>Chrysoperla</i> sp.	I'3, I'4	-	-	-
<i>Vitis vinifera</i>	<b>M52</b>	+	+	+
<i>Vitis vinifera</i>	M53, M54	-	-	-
Pasto Apocynaceae	M51	-	-	-
<i>Vitis vinifera</i>	<b>M50</b>	+	+	+
<i>Vitis vinifera</i>	M56, M58	-	-	-
<i>Vitis</i> sp.	De M74 a M83	-	-	-
<i>Carya</i> sp.	<b>M60, M61</b>	+ / -	+ / -	+ / -
<i>Lepidium</i> sp.	M59	-	-	-
<i>Setaria</i> sp.	M64	-	-	-
<i>Vitis vinifera</i>	M71, M72, M73	-	-	-
<i>Verbena</i> sp.	M69	-	-	-
<i>Vitis vinifera</i>	<b>M65, M66, M67</b>	+	+	+
<i>Vitis vinifera</i>	M68	-	-	-
<i>Lagerstroemia indica</i>	M62	-	-	-
<i>Lavandula</i> sp.	M5	-	-	-
<i>Vitis vinifera</i>	M1, M14, M15	-	-	-
<i>Vitis</i> sp.	M6, M7	-	-	-
<i>Malva sylvestris</i>	M4	-	-	-
<i>Vitis vinifera</i>	M20, M24	-	-	-
Pasto (Poaceae)	M38, M39, M41	-	-	-
<i>Taraxacum officinale</i>	M37	-	-	-
<i>Malva sylvestris</i>	M21	-	-	-
<i>Portulaca</i> sp.	M36	-	-	-
<i>Setaria</i> sp.	M40	-	-	-
<i>Eucalyptus</i> sp.	M23, M42	-	-	-
<i>Olea europaea</i>	<b>M10, M12, M16, M17</b>	+	+	+
<i>Olea europaea</i>	M13	-	-	-
<i>Cynodon</i> sp.	M25	-	-	-

<sup>†</sup>Muestra organizada en orden ascendente de acuerdo con su posición en el predio (georreferenciación de 25.48440 a 25.51815 N, y de 102.17508 a 102.20222 O), <sup>\*\*</sup>Muestras positiva por iniciador (+, en negrita) o negativa (-), <sup>†</sup>Familia.

**Cuadro 2. Detección por PCR de Xylella fastidiosa en plantas cultivadas y silvestres en el predio La Encantada, municipio de Parras, Coahuila.**

Especie	Muestra (M) <sup>†</sup>	Iniciadores <sup>††</sup>		
		XYgyr499/907	HL5/HL6	XF-F/XF-R
<i>Baccharis</i> sp.	<b>M10'A</b>	+	+	-
<i>Cyperus</i> sp.	M6'A	-	-	-
<i>Cynodon</i> sp.	M1'A, M7'A	-	-	-
<i>Phragmites</i> sp.	<b>M3'A</b>	+	+	+
Pasto (Poaceae) <sup>‡</sup>	M2'A, M4'A, M5'A	-	-	-
<i>Rumex</i> sp.	M8'A, M9'A	-	-	-
<i>Cupressus</i> sp.	M18, M19	-	-	-
<i>Cydonia</i> sp.	<b>M2, M70</b>	+	+	+
<i>Malus domestica</i>	M9, M44, M45	-	-	-
<i>Prunus armeniaca</i>	M46, M47	-	-	-
<i>Persea americana</i>	M8	-	-	-
<i>Populus</i> sp.	M43	-	-	-
<i>Ficus carica</i>	<b>M48, M49</b>	+	+	+

<sup>†</sup>Muestra organizada en orden ascendente de acuerdo con su posición en el predio (georreferenciación de 25.48751 a 25.49183 N, y de 102.17304 a 102.17658 O), <sup>††</sup>Muestras positiva por iniciador (+, en negrita), o negativa (-), <sup>‡</sup>Familia



**Figura 1. A) hojas de Cydonia sp., B) O. europaea y C) Phragmites sp. con síntoma de escaldadura.**

### Identificación de la subespecie

En general, las muestras positivas de frutales (n = 14) y silvestres (n = 8) y la del insecto *Homalodisca* sp., amplificadas y secuenciadas con los siete genes MLST y el gen *pilU*, correspondieron a *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (Cuadro 3). Las secuencias de las amplificaciones mostraron identidad con el alelo 1, por lo que se les agrupó en la secuencia tipo ST1, la cual está relacionada con *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* de *V. vinifera*, originaria de los Estados Unidos de América. Con excepción de la secuencia de la muestra de *F. carica*, se registraron diferencias en las secuencias de los genes *cysG* y *nuoL* de las muestras cuando se compararon con las depositadas en la base de datos *Xylella fastidiosa* PubMLST Database (Cuadro 3). Las sustituciones encontradas en dichos genes proponen la aparición de nuevos alelos en los aislamientos de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* presentes

en el municipio de Parras, tomando en cuenta que al existir cambios en alguna de las bases de la secuencia de algún locus se considera como un nuevo alelo (Scally *et al.*, 2005). Estudios futuros que impliquen la obtención de cultivos axénicos de la bacteria y la secuenciación de genes en los que se observan variaciones son requeridos para confirmar la aparición de nuevas secuencias ST.

### Análisis filogenético

El árbol filogenético de *X. fastidiosa* construido con las secuencias concatenadas de los siete genes MLST obtenidas en este estudio, que incluyen 30 ST, mostró que los aislamientos presentes en el municipio de Parras se agrupan con las secuencias ST1, ST2 y ST3, identificadas como *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (Yuan *et al.*, 2010), lo que confirma la presencia de esta subespecie en el municipio (Figura 2). Similarmente, el árbol filogenético

del gen *pilU* mostró la agrupación de todas las secuencias obtenidas en el presente estudio en un clado, el de la subespecie *fastidiosa*, y las secuencias de las subespecies *pauca* y *multiplex*, y la de *X. taiwanensis* en clados diferentes (Figura 3).

Las secuencias consenso se agruparon con la secuencia ST1 (alelo 1) del gen *pilU* del aislamiento PD0001 de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*. Así mismo, se determinó la presencia del alelo 1 del gen *pilU* en *V. vinifera* identificado previamente en plantaciones de vid infectadas con la bacteria en EUA (Yuan et al., 2010). Las diferencias entre

las subespecies de *X. fastidiosa* están en concordancia con la variabilidad mostrada por la bacteria que tiene amplio espectro de hospedantes (Scally et al., 2005). Las secuencias de los genes de este estudio se depositaron en la base de datos del GenBank-NCBI con los números de accesión *gyrB* y *HL* indicados en el Cuadro 4; así mismo, las de los genes MLST y *pilU* con los números de accesión *leuA*, MT674718-MT674732; *petC*, MT674747-MT674761; *malF*, MT674733-MT674746; *cysG*, MT674691-MT674705; *holC*, MT674706-MT674717; *nuoL*, MT674762-MT674776; *gltT*, MT674789-MT674803 y *pilU*, MT674777-MT674788.

**Cuadro 3. Perfil alélico de subespecie y secuencia tipo (ST) de *Xylella fastidiosa* presente en el municipio de Parras, Coahuila.**

Predio / Muestra <sup>†</sup>	Gen multilocus								Subespecie	ST
	<i>leuA</i>	<i>petC</i>	<i>malF</i>	<i>cysG</i> <sup>††</sup>	<i>holC</i>	<i>nuoL</i> <sup>††</sup>	<i>gltT</i>	<i>pilU</i>		
<b>Predio San Lorenzo</b>										
Silvestres: <i>Salsola kali</i> , M3	1*	1	1	<sup>62</sup> C=G	1	<sup>495</sup> A=C <sup>497</sup> G=A	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
<i>Celtis pallida</i> , M22	1	1	1	<sup>62</sup> C=G	1	<sup>495</sup> A=C <sup>497</sup> G=A	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
Pasto Poaceae, M55	1	1	1	<sup>62</sup> C=G	1	<sup>495</sup> A=C <sup>497</sup> G=A	1	-	<i>fastidiosa</i>	1
<i>Tribullus terrestris</i> , M57	1	1	1	<sup>62</sup> C=G	1	<sup>495</sup> A=C <sup>497</sup> G=A	1	-	<i>fastidiosa</i>	1
<i>Rubus</i> sp., M63	1	1	1	<sup>62</sup> C=G	1	1	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
Insecto: <i>Homalodisca</i> sp., I'1	1	1	1	1	1	<sup>241</sup> G=A <sup>460</sup> T=C	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
Frutales: <i>Vitis vinifera</i> , M52	1	1	1	1	-	<sup>241</sup> G=A <sup>460</sup> T=C	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
M50	1	1	1	1	1	<sup>241</sup> G=A <sup>460</sup> T=C	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
<i>Carya</i> sp., M60	1	1	1	1	-	<sup>241</sup> G=A <sup>460</sup> T=C	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
<i>Vitis vinifera</i> , M65	1	1	1	1	1	<sup>241</sup> G=A <sup>460</sup> T=C	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
<i>Olea europaea</i> , M10	1	1	1	<sup>62</sup> C=G	1	<sup>495</sup> A=C <sup>497</sup> G=A	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
<b>Predio La Encantada</b>										
Silvestres: <i>Baccharis</i> sp., M10'A	1	1	1	<sup>62</sup> C=G	1	<sup>495</sup> A=C <sup>497</sup> G=A	1	-	<i>fastidiosa</i>	1
<i>Phragmites</i> sp., M3'A	1	1	1	1	-	<sup>241</sup> G=A <sup>460</sup> T=C	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
Frutales: <i>Cydonia</i> sp., M70	1	1	-	1	1	1	1	1	<i>fastidiosa</i>	1
<i>Ficus carica</i> , M48	1	1	1	1	1	1	1	1	<i>fastidiosa</i>	1

<sup>†</sup>La muestra se presenta en orden ascendente de acuerdo con la posición geográfica en la que se tomó (georreferenciación de 25.48751 a 25.49183 N, y de 102.17304 a 102.17658 O). <sup>††</sup>Gen con sustitución en alelo 1. \*Alelo 1. El símbolo negativo (-) indica no amplificación de la banda esperada.

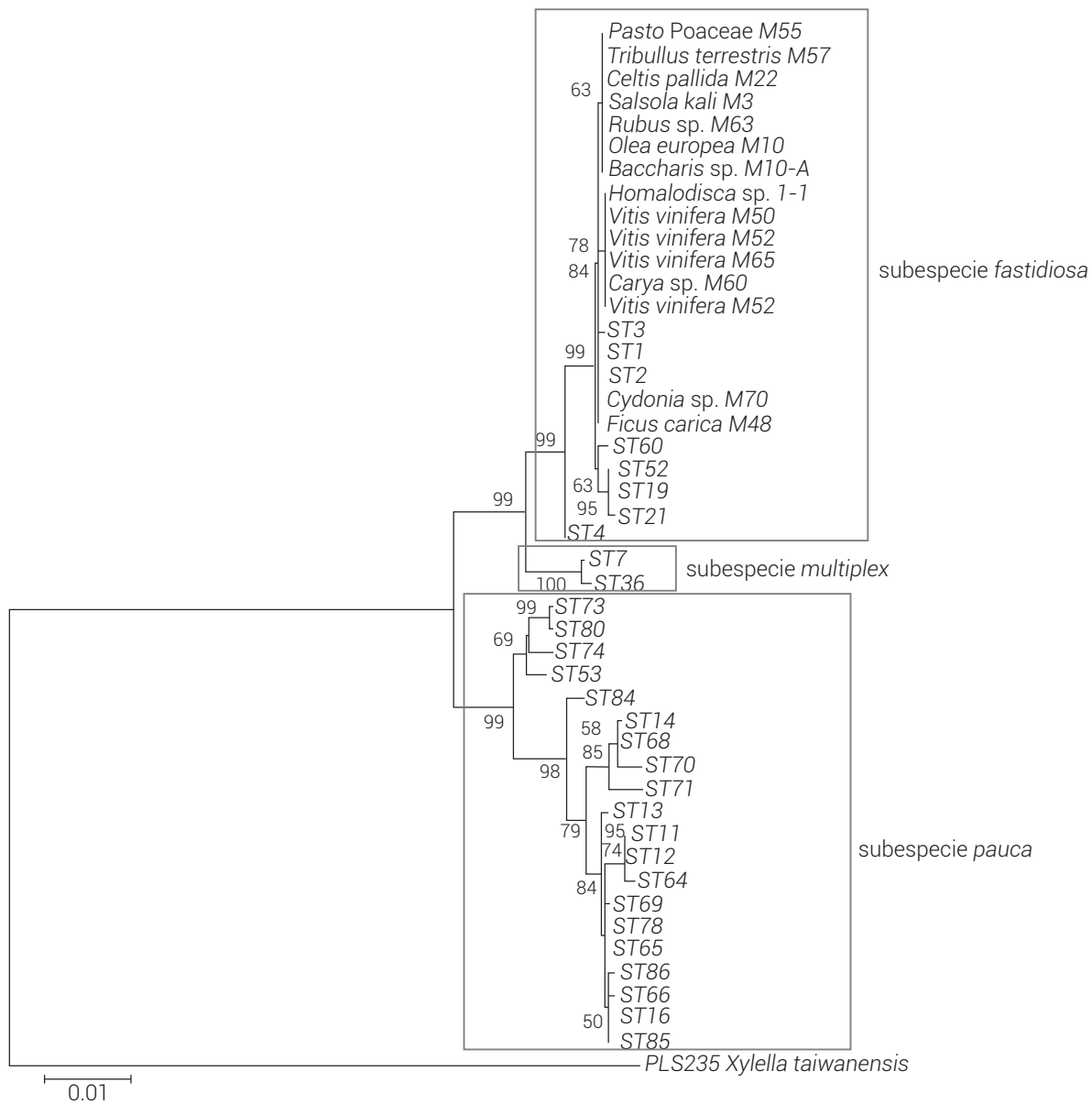


Figura 2. Árbol filogenético de *Xylella fastidiosa* construido con 30 secuencias Tipo (ST) con el método de máxima verosimilitud. El árbol se generó a partir de una matriz concatenada con siete genes MLST procedente de 15 muestras obtenidas del municipio de Parras, Coahuila. La barra de la escala indica el número de sustituciones por sitio.

### CONCLUSIONES

*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* se encuentra establecida en el municipio de Parras, Coahuila y está asociada con las especies frutales *Carya* sp., *Cydonia* sp., *Ficus carica*, *Olea europaea* y *Vitis vinifera*, y las especies silvestres de *Baccharis* sp., *Celtis pallida*, *Phragmites* sp., *Rubus* sp., *Salsola kali*, *Tribullus terrestris* y un pasto (familia Poaceae). Este documento constituye el primer

reporte de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* en *Cydonia* sp., la cual se propone como nuevo hospedante de la bacteria.

### AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PM17-4048 Colegio de Postgraduados-SENASICA que hizo posible los estudios de maestría de la primera autora. Al personal técnico de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Parras de la Fuente, relativo a la



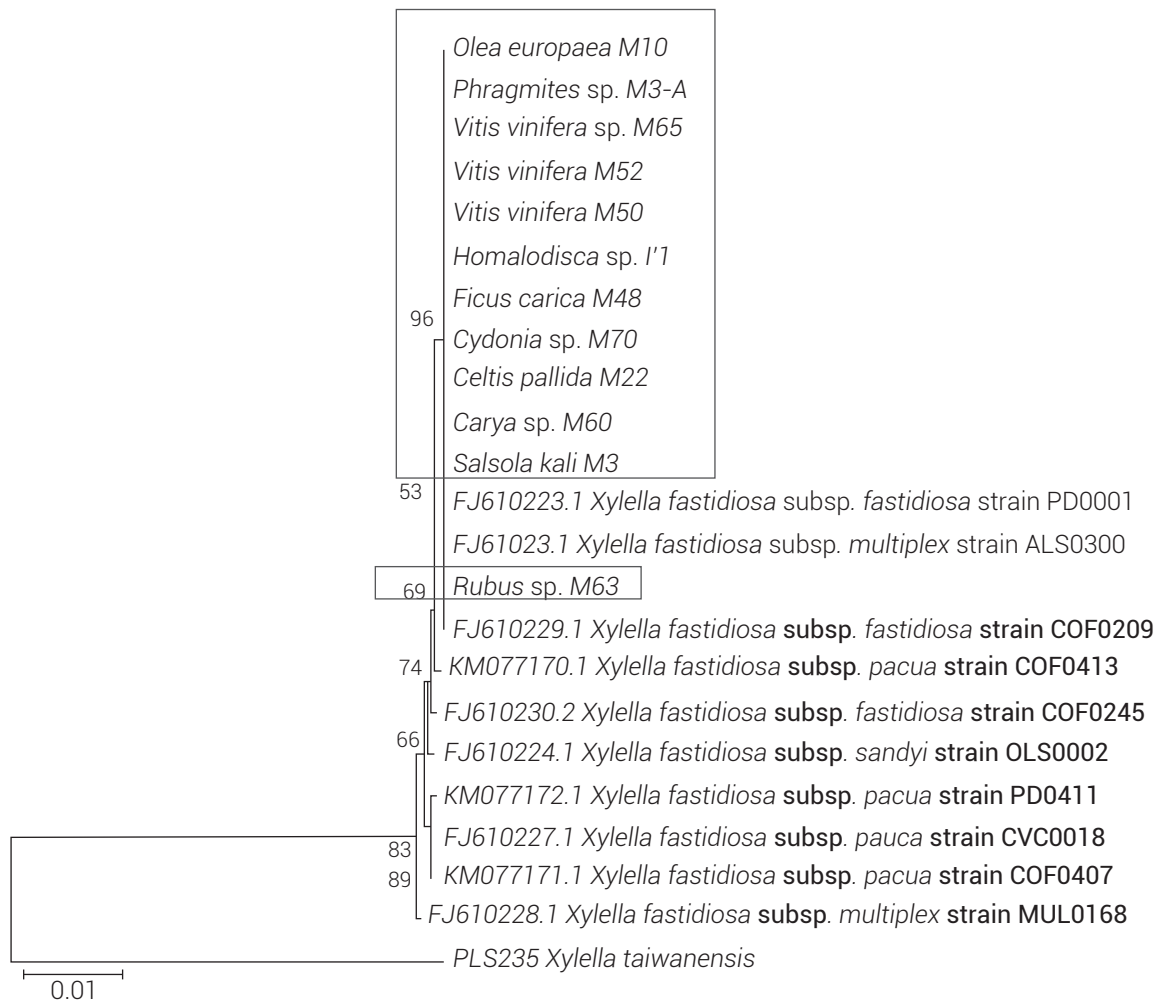


Figura 3. Árbol filogenético de *Xylella fastidiosa* construido con el método de máxima verosimilitud con las secuencias del gen *pilU* de 12 muestras obtenidas en el municipio de Parras, Coahuila. La barra de la escala define el número de sustituciones por sitio. En rectángulo se indican las secuencias obtenidas en la presente investigación.

Campaña Nacional contra la Enfermedad de Pierce, por el apoyo durante las colectas, así como del Laboratorio de Malezas del CNRF por la identificación de las plantas silvestres.

## BIBLIOGRAFÍA

- Appel D., M. Black, A. Labay, J. Lewis, J. Kamas and L. Morano (2010) Pierce's Disease Overview and Management Guide. A Resource for Grape Growers in Texas and other Eastern U. S. Growing Regions. Texas A&M Agri Life. College Station, Texas, USA. 103 p.
- Baldi P. and N. La Porta (2017) *Xylella fastidiosa*: host range and advance in molecular identification techniques. *Frontiers in Plant Science* 8:944, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00944>
- EFSA, European Food Safety Authority (2018) Update of the *Xylella* spp. host plant database. *EFSA Journal* 16:5408, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5408>
- Francis M., H. Lin, J. Cabrera-La Rosa, H. Doddapaneni and E. L. Civerolo (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* 115:203, <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9009-4>
- Hall T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Harper S. J., L. I. Ward and G. R. Clover (2010) Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 100:1282-1288, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-10-0168>
- Harris J. L. and Y. Balci (2015) Population structure of the bacterial pathogen *Xylella fastidiosa* among street trees in Washington D. C. *PLoS ONE* 10:e0121297, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121297>
- Harris J. L., P. L. Di Bello, M. Lear and Y. Balci (2014) Bacterial leaf scorch in the District of Columbia: distribution, host range, and presence of *Xylella fastidiosa* among urban trees. *Plant Disease* 98:1611-1618, <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0158-SR>
- IPPC, International Plant Protection Convention (2018) ISPM 27. Diagnostic Protocols for Regulated Pests. DP 25: *Xylella fastidiosa*. Adopted 2018, Published 2018. Commission on Phytosanitary Measures. Rome. 32 p.
- Loconsole G., O. Potere, D. Boscia, G. Altamura, K. Djelouah, T. Elbeaino, ... and M. Saponari (2014) Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *Journal of Plant Pathology* 96:1-8, <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1.041>

**Cuadro 4. Porcentaje de máxima identidad (MI)<sup>†</sup> y número de accesión de secuencias obtenidas en el presente estudio.**

Hospedante	Muestra	Gen <i>gyrB</i>		Gen <i>HL</i>	
		% de MI	Número de Accesión	% de MI	Número de Accesión
<i>Carya</i> sp.	M60	98.38	MN853301	99.54	MN853308
<i>Cydonia</i> sp.	M2	99.07	MN735934	96.52	MN755928
	M70	99.30	MN755922	99.55	MN853304
<i>Ficus carica</i>	M48	99.53	MN735935	84.62	MN853309
	M49	99.30	MN755910	84.62	MN853310
<i>Olea europaea</i>	M10	99.07	MN755923	99.55	MN755933
	M12	98.83	MN755924	97.80	MN853305
	M16	98.83	MN755925	99.53	MN853306
<i>Vitis vinifera</i>	M50	99.53	MN755915	98.82	MN755932
	M52	99.53	MN755916	100.00	MN755931
	M65	99.53	MN755917	99.54	MN853311
	M66	99.53	MN755913	99.53	MN755930
	M67	99.30	MN755912	99.54	MN755929
<i>Baccharis</i> sp.	M10'A	99.06	MN755914	99.54	MN853312
<i>Celtis pallida</i>	M22	97.92	MN755919	98.65	MN853313
<i>Phragmites</i> sp.	M3'A	99.53	MN755921	99.05	MN853315
Pasto (Poaceae)	M55	97.46	MN853302	98.23	MN853314
<i>Rubus</i> sp.	M11	97.26	MN755908	96.92	MN853316
	M63	99.53	MN755909	96.91	MN853317
<i>Salsola kali</i>	M3	99.07	MN755927	98.65	MN853318
<i>Tribullus terrestris</i>	M57	99.07	MN853303	99.54	MN853319
<i>Homalodisca</i> sp.	I'1	99.53	MN755918	99.52	MN853320

<sup>†</sup>Genes *gyrB*, y *HL* de *X. fastidiosa* CP006740.1 y CP002165, respectivamente. <sup>\*\*</sup>Número, Banco NCBI

- Marco-Noales E., B. Landa y M. M. López (2017) *Xylella fastidiosa* y las enfermedades que causa: un problema global. In: Enfermedades Causadas por la Bacteria *Xylella fastidiosa*. B. B. Landa, E. Marco-Noales y M. M. López (coords.). Cajamar Caja Rural. Almería, España. pp:19-45.
- Morente M. y A. Fereres (2017) Vectores de *Xylella fastidiosa*. In: Enfermedades Causadas por la Bacteria *Xylella fastidiosa*. B. B. Landa, E. Marco-Noales y M. M. López (coords.). Cajamar Caja Rural. Almería, España. pp:73-93.
- Nunney L., X. Yuan, R. Bromley, J. Hartung, M. Montero-Astúa, L. Moreira, ... and R. Stouthamer (2010) Population genomic analysis of a bacterial plant pathogen: novel insight into the origin of Pierce's disease of grapevine in the U.S. *PLoS ONE* 5:e15488, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015488>
- Purcell A. H. and S. R. Saunders (1999) Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. *Plant Disease* 83:825-830, <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.9.825>
- Rodrigues M. J. L., M. E. Silva-Stenico, J. E. Gomes, J. R. S. Lopes and S. M. Tsai (2003) Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4249-4255, <http://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4249-4255.2003>
- Scally M., E. L. Schuenzel, R. Stouthamer and L. Nunney (2005) Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8491-8499, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8491-8499.2005>
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2019) Enfermedad de Pierce *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* Well et al., 1987. Ficha Técnica No. 26. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México. 14 p.
- SIAP, Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera (2019) Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Enero 2019)
- Sicard A., A. R. Zeilinger, M. Vanhove, T. E. Scharstel, D. J. Beal, M. P. Daugherty and R. P. Almeida (2018) *Xylella fastidiosa*: insights into an emerging plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology* 56:181-202, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045849>
- Tamura K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729, <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Young D. A. (1968) Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 1: Proconiini. *Bulletin of the United States National Museum* 261:1-287, <https://doi.org/10.5479/si.03629236.261.1>
- Yuan X., L. Morano, R. Bromley, S. Spring-Pearson, R. Stouthamer and L. Nunney (2010) Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology* 100:601-611, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-6-0601>