

## Resumen

Tras la declaración oficial del primer brote de *Xylella fastidiosa* (*Xf*), en 2013, en Italia y la aparición de la bacteria en otros países del sur de Europa; Francia (2015) y España (2016), se consolidaron las prospecciones periódicas a gran escala en los demás países mediterráneos para el diagnóstico precoz de *Xf* en plantas potencialmente hospedadoras y en los vectores principales. Debido a las numerosas muestras procesadas en un plazo temporal limitado, las técnicas moleculares constituyen una solución rápida y sensible para el diagnóstico de la enfermedad. Con el objetivo de reducir los costes de análisis molecular y de disponer de metodologías de trabajo más sencillas, rápidas y eficientes, tanto en campo como en el laboratorio, se ensayaron dos técnicas de preparación previa de muestras vegetales, tanto inoculadas como naturalmente infectadas (*Olea europea*, *Prunus dulcis* y *Polygala myrtifolia*) en papel de filtro Whatman, empleando como método de referencia la extracción de ADN genómico por CTAB para PCR en tiempo real (Harper y cols., 2010; EPPO, 2016). Los resultados preliminares, revelaron que; i) no hay diferencia significativa, en término de sensibilidad de detección por PCR en tiempo real entre la técnica de preparación previa de muestras por fijación/secado (*spots*) de extractos vegetales naturalmente infectados en comparación con el protocolo de referencia; ii) El método de impresión/aplastamiento es menos sensible que lo de *spots*, quizá debido a la baja concentración de la bacteria y a la heterogeneidad de distribución de la misma dentro las muestras naturalmente infestadas; iii) El olivo exhibió una inhibición menor que en demás matices vegetales para la detección de *Xf*. Por todo ello, las dos técnicas podrían ser recomendadas en un primer diagnóstico selectivo de muestras positivas para *Xf*.

**Palabras claves:** *Xylella fastidiosa*, diagnóstico precoz, PCR en tiempo real, sensibilidad, fijación/secado, impresión/aplastamiento

## Abstract

When the first outbreak of *Xylella fastidiosa* (*Xf*) became formally confirmed in 2013 in southern Italy with sightings in other countries of southern Europe such as France (2015) and Spain (2016), periodic and large-scale checks have been consolidated in the rest of the Mediterranean regions for early diagnosis of *Xf* in potentially host plants and vectors. The molecular diagnosis represents an advantageous solution for proceeding numerous samples routinely due to the higher disposable tools sensitivity and rapid execution of real-time PCR protocols. In order to reduce costs and simplifying on-field and laboratory efficient methodologies, we compared two based-technics of preview samples preparation in Whatman filter paper with CTAB genomic DNA extraction protocol as reference method for real-time PCR analysis (Harper y cols, 2010; EPPO, 2016). Preliminary results revealed that; i) there wasn't a significant difference, in terms of sensitivity of detection by real time PCR, between the "fixing/drying" (spots) technic in membrane of naturally infected plant extracts (*Olea europea*, *Prunus dulcis* and *Polygala myrtifolia*) and the reference protocol; ii) The tissue-print/squash" method seemed to be less sensitive than "spots" one, probably due to the low titer and distribution heterogeneity of bacteria in infested plant; iii) Low inhibition phenomena had been observed in olive than other plants tested. Therefore, both filter paper-based methods could be recommended in the framework of the first-step molecular diagnosis selection for *Xf* positives samples.

**Key words:** *Xylella fastidiosa*, early diagnosis, filter paper, real time PCR, sensitivity, tissue-print/squash, fixing/drying/spots

## Résumé

L'annonce officielle de la détection du premier foyer de *Xylella fastidiosa* (*Xf*) en Italie, en 2013, et son apparition au sud de l'Europe notamment en France (2015) y en Espagne (2016), a été un précurseur pour les prospections périodiques et à grande échelle dans d'autres pays méditerranéens pour le diagnostic précoce de *Xf* aussi bien sur plantes hôtes qu'au niveau des vecteurs. Due à l'échantillonnage massif, routinier et en un temps réduit, l'approche moléculaire se considère comme la solution la plus recommandée en termes de sensibilité et rapidité. Dans le but de simplifier la méthodologie du travail sur champs comme au laboratoire et réduire les charges d'analyse, on s'est proposé de comparer deux techniques basées sur une étape de préparation préalable des échantillons sur papier filtre en comparaison avec le protocole de référence basé sur l'extraction d'ADN génomique par CTAB pour la détection de *Xf* par PCR en temps réel (Harper y cols., 2010 ; EPPO, 2016). Les résultats préliminaires ont révélé, que ; i) il n'y a pas de différence significative en terme de sensibilité de détection par PCR en temps réel entre la technique de fixation/séchage des extraits (*spots*) de plantes naturellement infestés (*Olea europea*, *Prunus dulcis* et *Polygala myrtifolia*) sur membrane de papier filtre en comparaison avec le protocole de référence ; ii) la méthode d'impression/écrasement des pétioles serait moins sensible que celle de fixation/séchage, probablement due à la faible concentration et à l'hétérogénéité de distribution de la bactérie dans la plante infectée ; iii) L'olivier montrait moins d'inhibition que les autres matrices dans la détection de *Xf*. Ainsi, les deux techniques étudiées pourraient être recommandées dans le cadre d'un premier diagnostic moléculaire sélectif d'échantillons positifs à *Xf*.

**Mots clefs :** *Xylella fastidiosa*, diagnostic précoce, papier filtre, PCR en temps réel, sensibilité, impression/écrasement, fixation/séchage.