



**Govern de les
Illes Balears**

Conselleria d'Agricultura,
Pesca i Medi Natural



**Illes
Sostenibles**

**Síntesis del proyecto
diseño e implementación
de estrategias de control
frente *Xylella fastidiosa*
en las Illes Balears**



ÍNDICE

Síntesis del proyecto diseño e implementación de estrategias de control frente <i>Xylella fastidiosa</i> en las Illes Balears	5
1. Caracterización de las poblaciones de la bacteria fitopatógena <i>Xylella fastidiosa</i> en las Islas Baleares.....	9
2. Detección de la bacteria fitopatógena <i>Xylella fastidiosa</i> en los diferentes vegetales de las Islas Baleares.....	29
3. Detección y efectos de <i>Xylella fastidiosa</i> sobre la vegetación silvestre de les Illes Balears	41
4. Insectos vectores de <i>Xylella fastidiosa</i> en las islas Baleares: distribución, ciclo, huéspedes vegetales e infectividad	61
5. Puesta a punto de un sistema de detección de la incidencia de <i>Xylella fastidiosa</i> en el cultivo del almendro mediante imágenes aéreas en la isla de Mallorca	75
6. Incidencia y sensibilidad varietal de la bacteria <i>Xylella fastidiosa</i> en los bancos de germoplasma de vid, almendro y olivo de la isla de Mallorca	93

Edición:

Govern de les Illes Balears
Conselleria d'Agricultura, Pesca i Medi Natural
Direcció General d'Agricultura, Ramaderia i Desenvolupament Rural.

Maquetación e impresión:

Terrasa Artes Gráficas
graficasterresa.com

ISBN: 978-84-09-61645-9

DL: PM 00404-2024

Síntesis del proyecto diseño e implementación de estrategias de control frente *Xylella fastidiosa* en las Illes Balears

Coordinadores: Eduardo Moralejo⁵, Andreu Juan Serra⁴, Marta López Serra⁴, Juan de Dios García López⁴, Diego Olmo García⁶, Francesc Adrover Adrover⁶, David Borràs Borràs⁶, Marina Montesinos Martorell⁵, Ana Pedrosa Gálvez⁵, Bàrbara M. Quetglas^{1,5}, Alicia Nieto López⁶,

Autores: Juan Rita Larrucea¹, María Cañellas Cifré¹, Mauricio Ruiz Pérez¹, Margarita Gomila Ribas¹, Juan A. Navas-Cortés², Miguel Román², José L. Trapero Casas², Guillermo León Ropero², Miguel Montes Borrego², Manuel Anguita-Maeso², Concepción Olivares García², María Pilar Velasco Amo², Blanca B. Landa², Tomás Poblete⁷, Carlos Camino⁸, Victoria González-Dugo², Rocío Calderón⁹, Alberto Hornero^{2,10}, Rocío Hernández-Clemente¹⁰, Pieter S.A. Beck⁸, Pablo J. Zarco-Tejada^{2,7}, Jordi Sabaté Rabella³, Miquel Llompart Cifre⁵, Antonio Busquets¹, Guillem Seguí Daniel Sacristán¹¹, Bàrbara M. Quetglas^{1,5}, Pere A. Gost¹, Joana Maria Fontclara¹, Catalina Cabot¹, John V. Sibole¹, Antònia Romero¹, Analía Perelló¹, Jaume Vadell¹, Josep Cifre¹

1-Universitat de les Illes Balears (UIB)

2-Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC (IAS-CSIC)

3- Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA)

4- Servicio de Agricultura de la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación

5- Empresa de Transformación Agraria (TRAGSA, Delegación de Baleares)

6- Instituto de Investigación y Formación Agroalimentaria y Pesquera de las Illes Balears (IRFAP)

7- University of Melbourne, Australia.

8-European Commission, Joint Research Centre (JRC)

9- Cornell University, NY, USA

10- Swansea University, UK

11- Universitat de València.

12- Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

El paisaje rural tradicional de las Islas Baleares está siendo afectado por la reciente irrupción de la bacteria fitopatógena, *Xylella fastidiosa*. Su huella se deja ver con cierta intensidad en forma de campos enteros de árboles muertos, generando cierta alarma social y preocupación no solo a los agricultores sino también en el sector turístico. Para dar respuesta a este desafío, el Gobierno de las Illes Balears, a través del Impuesto del Turismo Sostenible (ITS), ha financiado el proyecto de investigación compuesto de seis lotes y con el título “Diseño e implementación de estrategias de control frente *Xylella fastidiosa* en las Illes Balears”. El objetivo principal del proyecto es profundizar en el conocimiento de aspectos diversos del patógeno y los insectos vectores que lo transmiten, tales como el diagnóstico, la genética de poblaciones, la implementación de sistemas de detección precoz, la transmisión, la resistencia genética de plantas huésped o la conservación de plantas silvestres amenazadas. En esta presentación intentamos sintetizar los resultados más destacados del proyecto en el contexto agrícola y forestal.

Una pregunta hasta ahora no resuelta es cuál ha sido el impacto y grado de penetración de la bacteria en los ecosistemas naturales. En el lote “Detección y efecto de *X. fastidiosa* sobre la vegetación silvestre de las Illes Balears” se ha visto que hay un importante gradiente negativo en la incidencia de las infecciones de acebuches desde los cultivos agrícolas hacia zonas forestales. Aun así, la bacteria afecta a 18 especies silvestres (10 nuevos hospedadores), algunas de ellas en peligro de extinción. Esta menor incidencia en ecosistemas forestales podría estar relacionada con las migraciones estacionales del insecto vector principal, *Philaenus spumarius*, desde los cultivos hacia los árboles forestales a medida que aumenta la sequía en los meses estivales, como se indica en el lote “Contribución al conocimiento de las especies de insectos vectores de *Xylella fastidiosa* en las Illes Balears, así como su capacidad de transmisión en las plantas huéspedes”. El potencial hídrico de las plantas determina el hábitat de los estadios ninfales y de los adultos de *P. spumarius*, una de las razones de por qué los ecosistemas naturales más aislados están más protegidos y

también de cómo el cambio climático repercutirá en una progresiva reducción de la transmisión de *X. fastidiosa*. Sin embargo, las poblaciones de vectores son actualmente todavía suficientes para producir brotes epidémicos en plantaciones nuevas de almendro, viñedos u olivares. Es por ello importante obtener métodos de detección precoz a gran escala de infecciones antes de que se manifiesten los síntomas y se desarrollen los brotes. Los resultados del lote “Puesta a punto de un sistema de detección de la incidencia de *Xylella fastidiosa* en el cultivo del almendro mediante imágenes aéreas en la isla de Mallorca” dan una idea del potencial de esta metodología para la gestión y manejo de enfermedades como el chamuscado de las hojas del almendro.

Desgraciadamente, el clima de las Illes Balears es bastante adecuado para todas las subespecies de *X. fastidiosa*, aunque no tanto para los insectos vectores. Por ello debemos estar atentos a la llegada de nuevos perfiles genéticos a las islas que puedan suponer nuevas enfermedades o la intensificación de las ya existentes. Es por esta razón de suma importancia no solo detectar las nuevas infecciones de *X. fastidiosa*, sino también caracterizar los perfiles genéticos de muestras representativas que puedan incluir la mayor diversidad genética posible. En este cribado de asignar la subespecie, tipificar los secuetipos (MLST) o descifrar la secuencia de los genomas han contribuido los lotes “Caracterización de las poblaciones de la bacteria fitopatógena *Xylella fastidiosa* en las Illes Balears” y “Detección de la bacteria fitopatógena *Xylella fastidiosa* en los diferentes vegetales de las Illes Balears”. Toda esta información nos da una perspectiva de la genética de las poblaciones de las distintas subespecies y secuetipos de *X. fastidiosa*, en cada isla, que nos permite entender la epidemiología de enfermedades como la de Pierce de la vid o el chamuscado de las hojas de almendro. Así, por ejemplo, se sabe ahora que *X. fastidiosa* entró en Mallorca antes de 1993, que la transmisión de almendro a vid puede ser importante, que los almendros infectivos pueden durar más de 14 años, o que el decaimiento de los almendros en Ibiza es debido a las infecciones de la subespecie *pauca*. También nos ha servido para relativizar un

paradigma bien establecido: la diversidad genética del hospedador no ha sido suficiente para detener el brote epidémico del ALSD que afecta a más del 80% de los almendros en Mallorca. En el lote “Estudio de la resistencia/tolerancia/susceptibilidad varietal en los cultivos del almendro, la viña y el olivo frente a *Xylella fastidiosa* en las Illes Balears” se da cuenta de la respuesta de un gran número de variedades de almendros, vides y olivos de las islas al patógeno. Finalmente se dan pautas de qué variedades son mejores para cada cultivo.

Los resultados de este proyecto confirman la percepción previa de que los daños causados por *X. fastidiosa* en las Illes Balears se pueden controlar. El cambio climático, en este caso, es un aliado importante que favorece la disminución progresiva de su incidencia y transmisión. No obstante, se debe estar vigilante ante nuevos acontecimientos que puedan perturbar la convivencia con la bacteria.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Investigación ITS2017-095: Diseño e implementación de estrategias de control frente *Xylella fastidiosa* en las Illes Balears.

Finalmente, no podemos dejar de agradecer el apoyo incondicional y constante al equipo del Servicio de Agricultura de los responsables políticos que durante estos años han tutelado la contención de esta bacteria fitopatógena, el Sr. Vicenç Vidal Matas (consejero de Medio Ambiente, Agricultura y Pesca), la Sra. Mae de la Concha (consejera de Agricultura, Pesca y Alimentación) y muy especialmente al Sr. Mateu Ginard Sampol (director general de Agricultura y Ganadería).

1. Caracterización de las poblaciones de la bacteria fitopatógena *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares

Concepción Olivares García¹, Miguel Montes Borrego¹, María Pilar Velasco Amo¹, Juan A. Navas-Cortés¹, Blanca B. Landa¹

¹Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Av. Menéndez Pidal S/N. Campus Alameda del Obispo, 14004 Córdoba, España.

Antecedentes

El presente proyecto fue adjudicado al Laboratorio de Biología y Ecología de la Microbiota del suelo del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el año 2019, y se desarrolló entre mayo de 2019 a marzo de 2022. Para llevar a cabo las actividades propuestas en el Lote 1, en el momento de inicio del proyecto nos ajustamos a la normativa que a la fecha de concesión regulaba al organismo fitopatógeno *Xylella fastidiosa* y que incluía 1) la Decisión de Ejecución (UE) 2017/2352 de la Comisión de 14 de diciembre de 2017, por la cual se modificaba la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789, sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells y col.), 2) la Orden APM/21/2017, de 20 de enero, por la que se establecen medidas específicas de prevención en relación a la bacteria *Xylella fastidiosa* (Wells y col.), y 3) la Resolución del Consejero de Medio ambiente, Agricultura y Pesca de 7 de febrero de 2018, por la cual se prorrogan las medidas fitosanitarias cautelares adoptadas contra la plaga *Xylella fastidiosa* (Wells y col.) en las Islas Baleares.

El objetivo de este Proyecto fue caracterizar las poblaciones de la bacteria fitopatógena *X. fastidiosa* en las Islas Baleares mediante una metodología de diagnóstico molecular basada en la técnica de análisis Multilocus o MLST (de inglés ‘*multilocus sequence typing*’) descrita por Yuan y col., (2010) y que asigna la subespecie y grupo genético o secuetipo (ST) en base a las secuencias de siete genes mantenedores o conservados. Este análisis fue llevado a cabo a partir de muestras vegetales diagnosticadas como positivas para *X. fastidiosa*, bien por el Laboratorio Oficial

de Sanidad Vegetal de las Islas Baleares (LOSVIB) o por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares, que resultó adjudicatario del Lote 2 por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. El envío de material genético (ADN) desde las Islas Baleares al IAS-CSIC, por tanto, no supuso ningún riesgo en materia de bioseguridad.

Muestras analizadas

El total de muestras analizadas en este proyecto se presenta en la Tabla 1, especificando la especie vegetal e isla de procedencia, y el año de envío de la muestra. En total se analizaron 413 muestras obtenidas de un total de 32 plantas huésped diferentes. La mayor parte de las muestras se recibieron en el año 2020 (44%), seguidas de 2019 y 2021 con un número de muestras similar (28% y 27%, respectivamente), mientras que en 2022 solo se recibieron cuatro muestras (1%) (Figura 1). La distribución en función de la de origen por islas, fue 14% de muestras de Menorca, 30% de Ibiza, y 56% de Mallorca (Figura 1). Cabe recordar, que hasta la fecha no ha habido ningún caso de detección de *X. fastidiosa* en Formentera, entre más de 1600 muestras analizadas.

Tabla 1. Distribución del número de muestras analizadas por planta huésped, isla de origen y año de envío para análisis.

Planta huésped	Ibiza				
	2019	2020	2021	2022	N
<i>Cistus albidus</i>	3	2			5
<i>Calicotome spinosa</i>					
<i>Cistus monspeliensis</i>					
<i>Clematis cirrhosa</i>					
<i>Eleagnus angustifolia</i>			1	2	3
<i>Ficus carica</i>					
<i>Fraxinus angustifolia</i>					
<i>Genista hirsuta</i>			2		2
<i>Genista valdes-bermejoi</i>					
<i>Helichrysum stoechas</i>					
<i>Lavandula angustifolia</i>			2		2
<i>Lavandula dentata</i>					
<i>Nerium oleander</i>					
<i>Olea europaea europaea</i>	7	28	48		83
<i>Olea europaea sylvestris</i>	6		5		11
<i>Phagnalon saxatile</i>					
<i>Phillyrea angustifolia</i>					
<i>Phlomis italica</i>					
<i>Polygala myrtifolia</i>	1				1
<i>Prunus dulcis</i>	5	5			10
<i>Rhamnus alaternus</i>					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	3				3
<i>Ruta chalepensis</i>					
<i>Salvia officinalis</i>					
<i>Santolina chamaecyparissus</i>					
<i>Santolina magonica</i>					
<i>Spartium junceum</i>					
<i>Teucrium capitatum</i>					
<i>Thymus vulgaris</i>				1	1
<i>Ulex parviflorus</i>		2			2
<i>Vitex agnus-castus</i>					
<i>Vitis vinifera</i>					
Total general	25	37	58	3	123

N= Número total de muestras analizadas por isla.

2019	Mallorca				N	Menorca				Total	
	2020	2021	2022	2019		2020	2021	N	N	%	
1	1			2			3	3	10	2.4	
1	1	1		3					3	0.7	
		1		1					1	0.2	
					1			1	1	0.2	
									3	0.7	
2	1			3					3	0.7	
1	10			11					11	2.7	
									2	0.5	
		1		1					1	0.2	
		2		2			4	4	6	1.5	
1				1					3	0.7	
1				1					1	0.2	
			1	1					1	0.2	
3	6			9					92	22.3	
10	19			29	11	12	16	39	79	19.1	
1				1					1	0.2	
1				1					1	0.2	
							2	2	2	0.5	
		1		1					2	0.5	
48	82	13		143					153	37.0	
4	3			7		1		1	8	1.9	
	1			1		1		1	5	1.2	
	2			2					2	0.5	
		1		1					1	0.2	
		4		4		3	2	5	9	2.2	
						1		1	1	0.2	
		2		2					2	0.5	
2				2					2	0.5	
									1	0.2	
									2	0.5	
							1	1	1	0.2	
2		1		3					3	0.7	
78	126	27	1	232	12	18	28	58	413		

N= Número total de muestras analizadas por isla.

Muestras recibidas para la determinación de las subespecies y grupos genéticos (ST) de *Xylella fastidiosa*

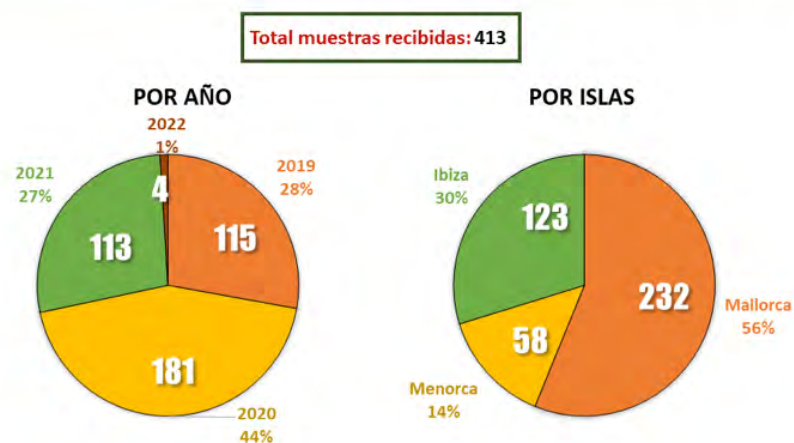


Figura 1. Muestras recibidas para la determinación de las subespecies y grupos genéticos (ST) de *Xylella fastidiosa* por isla de origen y año de envío para análisis.

En función de la planta huésped de origen el mayor número de muestras analizadas correspondió a almendro (*Prunus dulcis*) con un 37% de las muestras, seguido de olivo cultivado (22%) y acebuché (19%) (Tabla 1).

Metodología de caracterización genética

La aproximación que se ha llevado a cabo para los análisis MLST ha sido similar a la que se ha utilizado en la Encomienda de Gestión para la determinación de la subespecie de *X. fastidiosa* de las muestras de los vegetales y productos vegetales introducidos en España que el IAS-CSIC ha venido manteniendo con el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación entre los años 2017 a 2023, y que queda recogido en la Figura 2.

La determinación de la subespecie de *X. fastidiosa* se basó en el análisis MLST descrito por Yuan y col., (2010). Este análisis MLST utiliza datos de siete genes de mantenimiento que están distribuidos por todo el cromosoma bacteriano y la combinación del conjunto de los siete alelos individuales se emplea para asignar los aislados a subespecie y ST. Estos siete genes codifican para la 2-isopropilmalato sintetasa (*leuA*); subunidad

C1 de la ubiquinol citocromo c oxidoreductasa C1 (*petC*); ABC permeasa transportadora de azúcares (*malF*); sintasa del gen sirohemo (*cysG*); subunidad chi de la holoenzima DNA polimerasa III (*holC*); subunidad NQO12 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (*nuoL*); y proteína simporte del glutamato (*gltT*) (Tabla 2). El tamaño de los productos amplificados es de 708 pb para *leuA*, 533 pb para *petC*, 730 pb para *malF*, 600 pb para *cysG*, 379 pb para *holC*, 557 pb para *nuoL* y 654 pb para *gltT*. En ciertos aislados, en ocasiones faltan 6 pb en la secuencia del gen *cysG*, o 30 pb en el gen *nuoL*. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo lo descrito en el Anexo 12 del protocolo MLST descrito en la versión 4 del protocolo de diagnóstico sobre *X. fastidiosa* de la EPPO (2019).

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores a utilizar para análisis MLST según Yuan y col., (2010)

Iniciador directo		Iniciador reverso	
<i>leuA</i> -for	5'-GGTGCACGC-CAAATCGAATG-3'	<i>leuA</i> -rev	5'-GTATCGTTGTGGCGTCACTG-3'
<i>petC</i> -for	5'-GCTGCCATTC-GTTGAAGTACCT-3'	<i>petC</i> -rev	5'-GCACGTCCTCCAATAAGCCT-3'
<i>malF</i> -for	5'-TTGCTGGTCCT-GCGGTGTTG-3'	<i>malF</i> -rev	5'-GACAGCAGAAGCACGTCCCAGAT-3'
<i>cysG</i> -for	5'-GCCGAAGCAGT-GCTGGAAG-3'	<i>cysG</i> -rev	5'-GCCATTTTCGATCAGTGCAAAAG-3'
<i>holC</i> -for	5'-ATGGCACGCGC-CGACTTCT-3'	<i>holC</i> -rev	5'-ATGTCGTGTTTGTTCATGTGCAGG-3'
<i>nuoL</i> -for	5'-TAGCGACTTAC-GTTACTGGGC-3'	<i>nuoL</i> -rev	5'-ACCACCGATCCACAACGCAT-3'
<i>gltT</i> -for	5'-TCATGATC-CAAATCACTCGCTT-3'	<i>gltT</i> -rev	5'-ACTGGACGCTGCCTCGTAAACC-3'

Como paso inicial antes del análisis MLST, en cada muestra se amplificó el gen *cysG* del panel MLST (Figura 2). El tipo de secuencia de estos genes se correlacionan con la subespecie de *X. fastidiosa*, y el límite de

detección para este gen permite determinar el posible éxito en la amplificación del resto de genes del panel MLST. Además, el gen *cysG* junto al *malF* son los que proporcionan más información sobre la caracterización de la secuencia tipo (EPPO, 2019).

Posteriormente, en función de los resultados de amplificación del gen *cysG* el proceso seguido fue el siguiente para cada una de las muestras (Figura 2):

Quando se obtuvo amplificación para el gen *cysG* se prosiguió con todas las amplificaciones restantes de los seis genes constitutivos de referencia utilizados en el análisis MLST de *X. fastidiosa*, siguiendo el protocolo de la EPPO (2019) para llevar a cabo el análisis MLST completo (Figura 1).

Quando no se obtuvo amplificación para el gen *cysG* se utilizó directamente con todos los genes una **nueva estrategia mediante la utilización de un sistema de análisis MLST-anidado** (Cesbron y col., 2020) basado en PCR anidada desarrollado en el laboratorio de la Dra. M. A. Jacques (INRA-Francia) en colaboración con el Laboratorio de 'Biología y Ecología de la Microbiota del suelo' del IAS-CSIC. Mediante este nuevo protocolo de MLST-anidado se tiene más éxito en la amplificación de los genes del panel de MLST. Esta técnica se basa en la realización de dos reacciones de PCR secuenciales en las que el producto de amplificación de la primera PCR sirve como ADN molde de la segunda PCR. Para ello en el MLST-anidado se amplifican los siete genes del panel MLST con catorce parejas de iniciadores nuevas (siete parejas para la primera PCR y otras siete parejas distintas para la segunda PCR; Tabla 3) y presenta mayor sensibilidad en la detección (hasta 100 x) y mejor amplificación de los productos PCR correspondientes a los mismos genes y fragmentos de secuencias del panel MLST de Yuang y col., (2010) (Figura 1).

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores y temperatura de hibridación utilizada para el análisis MLST mediante PCR anidada.

Gen	Nombre	Secuencia	T° PCR1 y PCR 2	Tamaño amplicón
<i>leuA</i>	<i>leuAnest-F</i>	CGAAGGTGCAAACAAAGTGA		886
	<i>leuA-F-yuan</i>	GGTGACGCAAAATCGAATG	58	774
	<i>leuAnew-R</i>	ACTGGTCCCTGTACCTTCGT	60	
	<i>leuAnest-rev</i>	CGCACTGGCTTCGATAATGTCT		
<i>cysG</i>	<i>cysG_newF</i>	CCAAACATAGAAGCACGCCG		776
	<i>cysG-yuanF</i>	GCCGAAGCAGTGCTGGAAG	64	642
	<i>cysG-yuanR</i>	GCCATTTTCGATCAGTGCAAAG	56	
	<i>cysGnest-rev</i>	GCGAGTGTTTTTCAGCGTTCC		
<i>petC</i>	<i>petCnew_f</i>	TCAATGCACGTCTCCCAAT		582
	<i>petCyuan-modified-F</i>	ACGTCCTCCAATAAGCCT	60	551
	<i>petCnest-R</i>	CGTTATTCACGTATCGCTGC	56	
	<i>petCnew-R</i>	GGCTGCCATTCGTTGAAGTA		
<i>holC</i>	<i>holC_F</i>	CCGATGGTGAAGAACAGTAGACA		559
	<i>holCnest-F</i>	GGTCACATGTCGTGTTTGTC	60	424
	<i>holCnest-R</i>	CACGCGCCGACTTCTATTT	58	
	<i>holCnew-R</i>	GCTCGAGAAACTSGATTAATGG		
<i>nuoL</i>	<i>nuoLnew-F</i>	TTGGTACGTTGGCTTTGGTG		845
	<i>nuoLyuan-modified-F</i>	GCGACTTACGTTACTGGGC	60	597
	<i>nuoLyuan-R</i>	ACCACCGATCCACAACGCAT	64	
	<i>nuoLnew-R</i>	GACAAAACAGATTGCGTGC		
<i>gltT</i>	<i>gltTnest1-F</i>	GGTGCCATCCAATCCGTTTT		916
	<i>gltTnest2-F</i>	TCATGATCCAAATCACTCGCTT	60	700
	<i>gltTnest2-R</i>	TTACTGGACGCTGCCTCG	58	
	<i>gltTnest1-R</i>	TCAGGATGTCCAATTCACAG		
<i>malF</i>	<i>malFnew-F</i>	AACGTCGTACCCCAAGAA		845
	<i>malFyuan_modified-rev</i>	AGCAGAAGCACGTCCAGAT	60	767
	<i>malFnew-R</i>	CTGGTCCTGCGGTGTTGG	57	
	<i>malFnew-R2</i>	ATGAGGCGGGCTTCTTTGG		

Finalmente, aquellos genes que no amplificaron con el sistema de MLST convencional en la primera fase se analizaron mediante el sistema de MLST-anidado (Figura 2).

Tabla 4. Correspondencia entre secuetipos (ST) y subespecie de *Xylella fastidiosa* basada en los números de alelos obtenidos para los diferentes genes del panel MLST en la base de datos pubMLST (<http://pubmlst.org/xfastidiosa>) de genes MLST para *X. fastidiosa*

Procedimiento seguido para la determinación de las subespecies y Grupos genéticos (ST) de *Xylella fastidiosa*

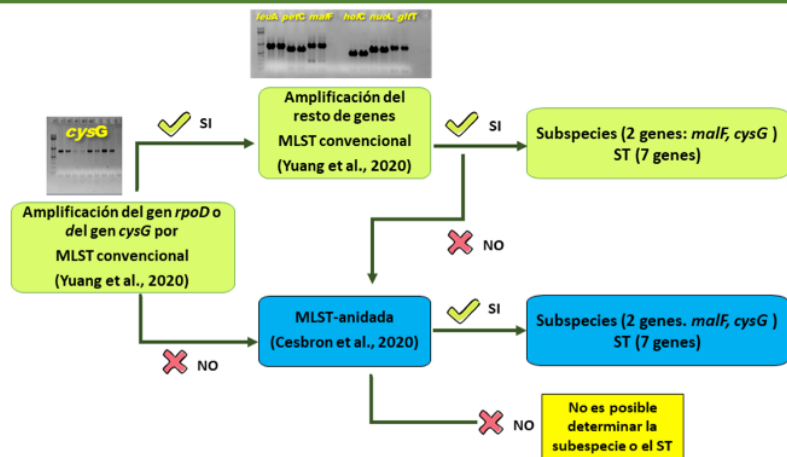


Figura 2. Procedimiento seguido para la determinación de las subespecies y secuetipos (ST) de *Xylella fastidiosa*.

Resultados de la caracterización de la diversidad genética de las poblaciones de la bacteria fitopatogena *Xylella fastidiosa* en las islas Baleares

En la Figura 3A se presenta el porcentaje de reacciones de PCR realizadas y el éxito de amplificación de las mismas para cada uno de los genes del panel MLST llevadas a cabo mediante amplificación por MLST convencional o MLST anidado. Como puede observarse el gen *cysG* fue el que presentó mayor éxito de amplificación en PCR simple seguido de *nuoL* y *hoIC*, mientras que el gen *malF* fue el que presentó mayor dificultad de amplificación mediante MLST convencional. En la Figura 3B se muestra el porcentaje de éxito total de genes secuenciados a partir de los productos obtenidos mediante MLST convencional o MLST anidado. Se puede observar como la combinación de ambos procedimientos permitió amplificar en el 100% de las muestras los genes *cysG*, *nuoL* y *petC*, mientras que para el resto de genes el porcentaje fue también muy alto y estuvo comprendido entre 97% para *malF* y más del 99% para el resto de genes.

ST	Gen del panel MLST							Subespecie
	<i>leuA</i>	<i>petC</i>	<i>malF</i>	<i>cysG</i>	<i>hoIC</i>	<i>nuoL</i>	<i>gltT</i>	
1	1	1	1	1	1	1	1	<i>fastidiosa</i>
2	1	1	4	1	1	1	1	<i>fastidiosa</i>
3	1	1	1	20	1	1	1	<i>fastidiosa</i>
4	1	1	1	4	1	1	1	<i>fastidiosa</i>
5	2	2	2	2	2	2	2	<i>sandyi</i>
6	3	3	3	3	3	3	3	<i>multiplex</i>
7	3	3	3	7	3	3	3	<i>multiplex</i>
8	3	3	5	5	4	3	7	<i>multiplex</i>
9	3	3	5	5	4	3	4	<i>multiplex</i>
10	5	4	3	3	6	3	5	<i>multiplex</i>
11	7	7	7	9	10	8	8	<i>pauca</i>
12	7	7	7	9	13	8	8	<i>pauca</i>
13	7	6	7	9	10	7	8	<i>pauca</i>
14	8	8	8	11	12	9	9	<i>pauca</i>
15	5	3	3	3	4	3	5	<i>multiplex</i>
16	7	6	8	10	11	8	8	<i>pauca</i>
17	1	1	10	12	18	10	1	<i>fastidiosa</i>
18	9	1	9	13	14	5	10	<i>fastidiosa</i>
19	10	1	10	14	15	11	1	<i>fastidiosa</i>
20	1	1	10	12	17	11	11	<i>fastidiosa</i>
21	10	1	10	14	15	11	12	<i>fastidiosa</i>
22	3	3	5	12	4	3	3	<i>multiplex</i>
23	3	3	5	3	6	3	3	<i>multiplex</i>
24	3	3	5	3	4	3	7	<i>multiplex</i>
25	3	3	3	17	3	3	3	<i>multiplex</i>
26	5	3	3	3	6	3	5	<i>multiplex</i>
27	6	3	5	6	7	3	7	<i>multiplex</i>

ST	Gen del panel MLST							Subspecie
28	6	3	5	18	7	4	7	<i>multiplex</i>
29	4	3	6	18	5	4	3	<i>morus</i>
30	4	5	6	8	5	4	3	<i>morus</i>
31	4	3	6	18	8	6	3	<i>morus</i>
32	4	3	5	12	4	4	3	<i>multiplex</i>
33	11	9	14	15	19	13	10	<i>fastidiosa/sandyi</i>
34	3	3	3	3	3	3	6	<i>multiplex</i>
35	3	10	3	3	3	3	3	<i>multiplex</i>
36	5	3	5	19	6	3	5	<i>multiplex</i>
37	3	3	5	21	4	3	3	<i>multiplex</i>
38	3	3	5	16	4	3	7	<i>multiplex</i>
39	3	3	5	19	4	3	7	<i>multiplex</i>
40	6	3	5	18	7	3	7	<i>multiplex</i>
41	3	3	5	18	9	3	3	<i>multiplex</i>
42	6	3	5	12	4	3	3	<i>multiplex</i>
43	3	3	5	18	4	3	7	<i>multiplex</i>
44	3	3	5	5	6	3	4	<i>multiplex</i>
45	3	3	5	3	4	3	3	<i>multiplex</i>
46	5	3	3	3	6	3	3	<i>multiplex</i>
47	13	1	10	23	20	5	1	<i>fastidiosa</i>
48	3	3	12	3	6	3	3	<i>multiplex</i>
49	3	3	5	3	6	3	7	<i>multiplex</i>
50	3	11	13	22	21	14	13	<i>multiplex</i>
51	3	3	5	3	4	15	3	<i>multiplex</i>
52	10	1	10	14	18	10	1	<i>fastidiosa</i>
53	7	6	16	24	10	16	14	<i>pauca</i>
54	11	9	11	25	19	12	1	<i>fastidiosa/sandyi</i>
55	1	1	10	12	18	10	10	<i>fastidiosa</i>
56	11	9	11	15	17	12	10	<i>fastidiosa/sandyi</i>
57	1	1	10	12	18	11	11	<i>fastidiosa</i>
58	6	3	5	12	4	3	7	<i>multiplex</i>
59	9	1	9	13	14	5	1	<i>fastidiosa</i>
60	9	1	1	13	14	5	1	<i>fastidiosa</i>

ST	Gen del panel MLST							Subspecie
61	11	9	11	15	16	12	10	<i>fastidiosa/sandyi</i>
62	4	3	6	18	5	6	3	<i>morus</i>
63	5	6	3	3	6	3	5	<i>multiplex</i>
64	7	7	7	9	10	7	8	<i>pauca</i>
65	7	6	7	9	10	8	8	<i>pauca</i>
66	7	8	8	10	11	8	8	<i>pauca</i>
67	5	3	8	3	12	3	5	<i>multiplex</i>
68	14	8	8	11	12	9	8	<i>pauca</i>
69	7	6	7	9	23	17	8	<i>pauca</i>
70	14	7	8	11	22	9	8	<i>pauca</i>
71	5	8	8	11	12	9	9	<i>pauca</i>
72	12	12	15	26	24	18	1	<i>sandyi</i>
73	7	6	8	27	10	16	8	<i>pauca</i>
74	7	6	8	28	25	16	8	<i>pauca</i>
75	9	1	10	29	1	19	1	<i>fastidiosa</i>
76	12	13	15	26	24	18	1	<i>sandyi</i>
77	1	1	6	30	26	5	1	<i>fastidiosa</i>
78	7	6	7	9	23	8	8	<i>pauca</i>
79	3	3	3	26	3	3	3	<i>multiplex</i>
80	7	6	17	31	10	16	15	<i>pauca</i>
81	3	3	3	32	3	3	3	<i>multiplex</i>
82	3	3	5	12	4	3	16	<i>multiplex</i>
83	6	3	5	33	7	4	7	<i>multiplex</i>
84	7	6	7	34	10	20	8	<i>pauca</i>
85	7	6	8	10	10	8	8	<i>pauca</i>
86	7	6	8	10	11	20	8	<i>pauca</i>
87	5	3	5	3	3	21	3	<i>multiplex</i>
88	3	3	19	7	3	3	3	<i>multiplex</i>
89	6	2	5	18	4	23	7	<i>multiplex</i>
90	16	15	20	36	27	24	18	<i>pauca</i>

(*) En negrita se indican las subespecies y STs identificados hasta marzo de 2022 en las Islas Baleares.

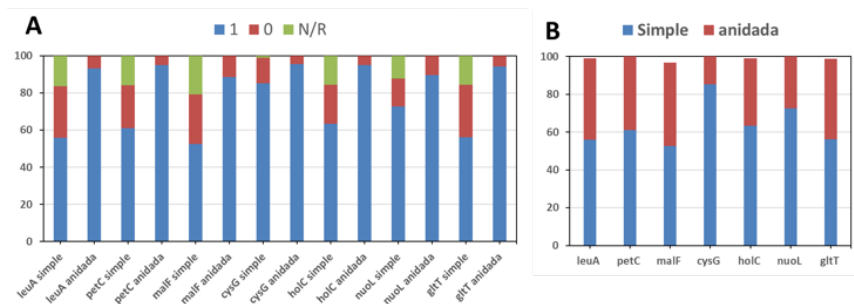


Figura 3. A) Porcentaje de reacciones de PCR llevadas a cabo con éxito (1), fallidas (0), o no realizadas (N/R) mediante el procedimiento de MLST convencional o MLST-anidado para cada uno de los siete genes del panel en base a la metodología descrita en la Figura 2. B) Porcentaje de éxito en la secuenciación de cada gen mediante el procedimiento de MLST convencional o MLST-anidado.

Una vez obtenidos los productos de amplificación éstos se enviaron a secuenciar en ambos sentidos mediante la metodología Sanger a un servicio de secuenciación externa. En el caso de secuenciación exitosa de los genes del panel MLST, las secuencias obtenidas se cotejaron mediante la herramienta de alineación y búsqueda BLASTN, disponible en la base de datos pubMLST para genes MLST (<http://pubmlst.org/xfastidiosa>) de *X. fastidiosa*. A cada secuencia se le asignó un número; la combinación de estos números es la que indica la subespecie y grupo genético (hasta un total de 90 posibles en la actualidad) (Tabla 4).

En total, de las 413 muestras, se pudo identificar al menos la subespecie en 399 muestras (99.0%), y el ST en 377 muestras (91.3%); tan solo en cuatro muestras no fue posible amplificar ninguno de los genes (Tabla 5; Figura 4). Estas correspondieron a una muestra de *Calicotome spinosa*, dos de *Cistus albidus* y una de *Teucrium capitatum*. La cantidad de ADN bacteriano de estas plantas no fue muy elevada, unido a la presencia ya conocida de inhibidores de PCR en estas especies hizo que no fuera posible obtener amplificación exitosa mediante PCR convencional o anidada de ninguno de los siete genes del panel MLST (Tabla 5).

Los resultados de éxito para la asignación a nivel de subespecie o ST fue similar para las tres islas (Tabla 5; Figura 4). Sin embargo, las subespecies y STs encontrados en las tres islas fueron similares a los que habían mostrado investigaciones anteriores, mostrando que tres subespecies de *X. fastidiosa* y cuatro STs están presentes en las Islas Baleares: *X. fastidiosa*

subsp. *fastidiosa* ST1 (12% de las muestras) y *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* ST7 (<1% de las muestras) únicamente en Mallorca, *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ST80 (27% de las muestras) en Ibiza, y *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* ST81 (52% de las muestras) en Mallorca y Menorca (Olmo y col., 2021) (Tabla 5; Figura 4).

Resultados de la caracterización a nivel de subespecie y Grupos genético (ST) de *Xylella fastidiosa*

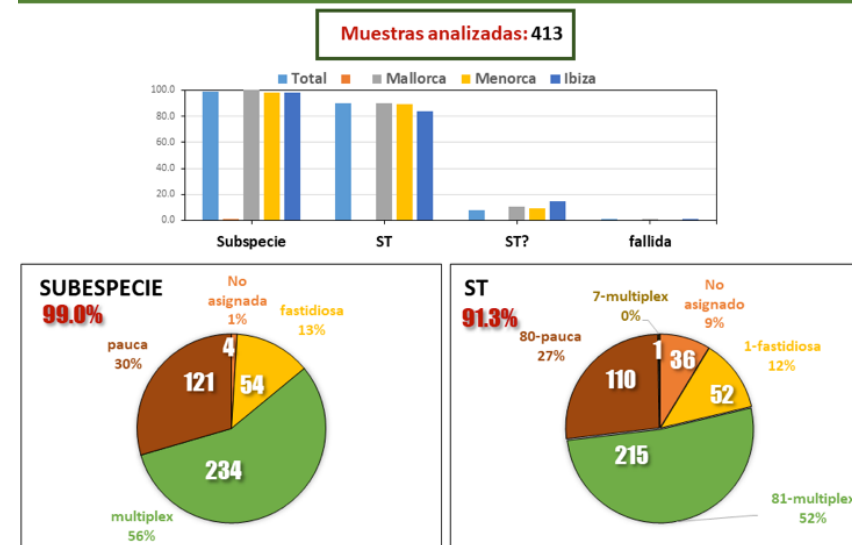


Figura 4. Resultados de la caracterización a nivel de subespecie y secuetipos (ST) de las 413 muestras analizadas en el presente proyecto de distintas plantas huésped infectadas por *Xylella fastidiosa*.

Todas las muestras analizadas procedentes de la isla de Ibiza ($n = 121$) estaban infectadas por *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, y en 110 de ellas se pudo confirmar su pertenencia al ST80. Por otro lado, todas las muestras procedentes de Menorca ($n = 58$) estaban infectadas por *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, y en 52 de ellas se pudo confirmar que éstas pertenecían al ST81. Finalmente, en las muestras de Mallorca, ($n = 232$), un 23,3% estaban infectadas por *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* de las cuales en el 22,4% se identificó el ST1; el 75,8% estaban infectadas por *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, de las cuales en el 69.8% se identificó el ST81, y tan

solo en una muestra se identificó el ST7 (Tabla 5; Figura 4). En la Figura 5 se presentan la localización geográfica y la asignación a subespecie de todas las muestras analizadas en este trabajo. Se puede observar como las muestras infectadas por la subespecie *fastidiosa* se encuentran localizadas desde el centro hacia el este de la isla mientras que las infectadas por la subespecie *multiplex*, están más localizadas hacia el sur y oeste de la isla (Figura 5).

Finalmente, indicar que gracias al estudio llevado a cabo en este subproyecto se han podido identificar 26 nuevas combinaciones para la ciencia de subespecies y grupos genéticos de *X. fastidiosa* con sus plantas huésped (Figura 6).

Tabla 5. Asignación a nivel de subespecie y ST de las muestras de ADN analizadas en el presente proyecto para cada planta huésped.

Planta Huésped	<i>fastidiosa</i>			<i>multiplex</i>				<i>pauca</i>			fallido	Total general
	1	1?	N	7	81	81?	N	80	80?	N		
<i>Calicotome spinosa</i>	1		1		1		1				1	3
<i>Cistus albidus</i>					3	2	5	3		3	2	10
<i>Cistus monspeliensis</i>	1		1									1
<i>Clematis cirrhosa</i>					1		1					1
<i>Eleagnus angustifolia</i>								1	2	3		3
<i>Ficus carica</i>					2	1	3					3
<i>Fraxinus angustifolia</i>					11		11					11
<i>Genista hirsuta</i>								2		2		2
<i>Genista valdes-bermejoi</i>					1		1					1
<i>Helichrysum stoechas</i>					6		6					6
<i>Lavandula angustifolia</i>					1		1	1	1	2		3
<i>Lavandula dentata</i>					1		1					1
<i>Nerium oleander</i>					1		1					1
<i>Olea europaea europaea</i>					7	2	6	76	7	83		89
<i>Olea europaea sylvestris</i>					60	8	68	11		11		79
<i>Phagnalon saxatile</i>						1	1					1
<i>Phillyrea angustifolia</i>					1		1					1
<i>Phlomis italica</i>					2		2					2
<i>Polygala myrtifolia</i>					1		1	1		1		2
<i>Prunus dulcis</i>	41	1	42	1	97	3	101	10		10		153
<i>Rhamnus alaternus</i>	4		4		2	2	4					8
<i>Rosmarinus officinalis</i>					2		2	2	1	3		5
<i>Ruta chalepensis</i>	1	1	2									2
<i>Salvia officinalis</i>					1		1					1
<i>Santolina chamaecyparissus</i>					9		9					9
<i>Santolina magonica</i>					1		1					1
<i>Spartium junceum</i>					2		2					2
<i>Teucrium capitatum</i>	1		1								1	2
<i>Thymus vulgaris</i>								1		1		1
<i>Ulex parviflorus</i>								2		2		2
<i>Vitex agnus-castus</i>					1		1					1
<i>Vitis vinifera</i>	3		3									3
Total general	52	2	54	1	214	19	234	110	11	121	4	413

N= Número total analizado por subespecie. (?)= No fue posible completar los siete genes del panel MLST para la asignación a nivel de ST.

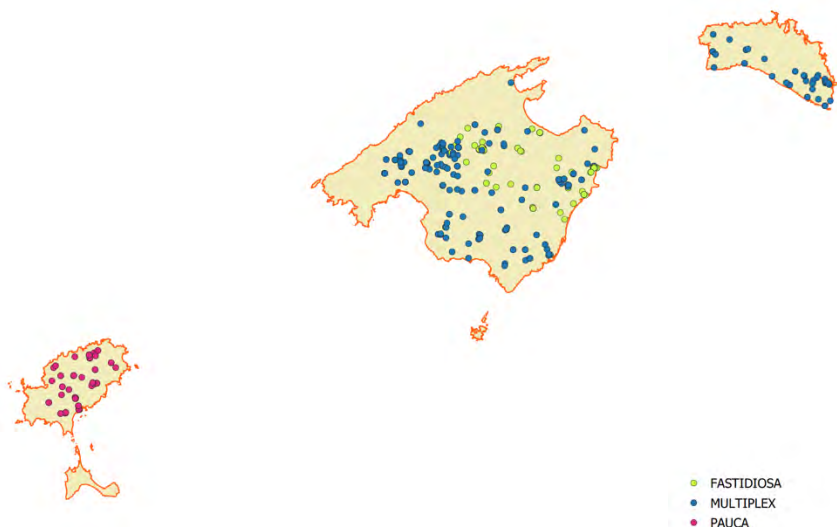


Figura 5. Distribución geográfica de las muestras analizadas en el presente proyecto y su asignación por subespecie de *Xylella fastidiosa* para el total de 413 muestras analizadas en las islas de Ibiza, Mallorca y Menorca hasta marzo de 2022.

Distribución de subespecies y Grupos genéticos (ST) de *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares

Planta huésped	Mallorca	Menorca	Ibiza
<i>Acacia saligna</i>	multiplex ST81 fastidiosa ST1		pauca ST80
<i>Calicotome spinosa</i>	multiplex ST7, ST81		
<i>Cistus albidus</i>	multiplex ST81	multiplex ST81	pauca ST80
<i>Cistus monspeliensis</i>	fastidiosa ST1		
<i>Clematis cirrhosa</i>		multiplex ST81	
<i>Eleagnus angustifolia</i>			pauca ST80
<i>Ficus carica</i>	multiplex ST81		
<i>Fraxinus angustifolia</i>	multiplex ST81		
<i>Genista hirsuta</i>			pauca ST80
<i>Genista lucida</i>	fastidiosa ST1		
<i>Genista valdes-bermejoi</i>	multiplex ST81		
<i>Helichrysum stoechas</i>	multiplex ST81	multiplex ST81	
<i>Juglans regia</i>	fastidiosa ST1		
<i>Laurus nobilis</i>		multiplex ST81	
<i>Lavandula angustifolia</i>	multiplex ST81		pauca ST80
<i>Lavandula dentata</i>	multiplex ST81		pauca ST80
<i>Nerium oleander</i>	multiplex ST81		
<i>Olea europaea europaea</i>	multiplex ST81		pauca ST80
<i>Olea europaea sylvestris</i>	multiplex ST81	multiplex ST81	pauca ST80
<i>Phagnalon saxatile</i>	multiplex ST817		
<i>Phillyrea angustifolia</i>	multiplex ST81		
<i>Phlomis italica</i>		multiplex ST81	
<i>Polygala myrtifolia</i>	multiplex ST7, ST81		pauca ST80
<i>Prunus avium</i>	fastidiosa ST1		
<i>Prunus domestica</i>	multiplex ST81 fastidiosa ST1		
<i>Prunus dulcis</i>	multiplex ST7, ST81 fastidiosa ST1		pauca ST80
<i>Rhamnus alaternus</i>	multiplex ST81	multiplex ST817	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	multiplex ST81	multiplex ST81	pauca ST80
<i>Ruta chalepensis</i>	fastidiosa ST1		
<i>Salvia officinalis</i>	multiplex ST81		
<i>Santolina chamaecyparissus</i>	multiplex ST81	multiplex ST81	
<i>Santolina magonica</i>		multiplex ST81	
<i>Spartium junceum</i>	multiplex ST81		pauca ST80
<i>Teucrium capitatum</i>	fastidiosa ST1		
<i>Thymus vulgaris</i>			pauca ST80
<i>Ulex parviflorus</i>			pauca ST80
<i>Vitex agnus-castus</i>		multiplex ST81	
<i>Vitis vinifera</i>	fastidiosa ST1		

Figura 6. Distribución de subespecies y Grupos genéticos (ST) de *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares para las plantas huésped identificadas en las islas de Ibiza, Mallorca y Menorca hasta marzo de 2022. Subrayados en amarillo se indican aquellas combinaciones nuevas para la ciencia que se han identificado en este proyecto.

Bibliografía

Cesbron S, Dupas E, Beaurepère Q, Briand M, Montes-Borrego M, Velasco-Amo M.P, Landa BB, Jacques MA (2020) Development of a nested-multiLocus sequence typing approach for a highly sensitive and specific identification of *Xylella fastidiosa* subspecies directly from plant samples. *Agronomy* 10, 1099. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081099>

EPPO (2019) PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*. *EPPO Bulletin* 49,175-227. <https://doi.org/10.1111/epp.12575>

Olmo D, Nieto A, Borrás D, Montesinos M, Adrover F, Pascual A, Gost PA, Quetglas B, Urbano A, García JD, Velasco-Amo MP, Olivares-García C, Beidas O, Juan A, Marco-Noales E, Gomila M, Rita J, Moralejo E, Landa BB(2021) Landscape epidemiology of *Xylella fastidiosa* in the Balearic Islands. *Agronomy* 11, 473–488. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030473>

Yuan X, Morano L, Bromley R, Spring-Pearson S, Stouthamer R, Nunney L (2010) Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology* 100, 601–611.



2. Detección de la bacteria fitopatógena *Xylella fastidiosa* en los diferentes vegetales de las Islas Baleares

Maria Cañellas¹, Antonio Busquets², Guillem Seguí¹, Juan Rita³, Margarita Gomila¹

¹ Microbiología (Dpto. Biología), Universitat de les Illes Balears, Ctra. Valldemossa, km. 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Illes Balears.

² Servicios científico-técnicos, Universitat de les Illes Balears, Ctra. Valldemossa, km. 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Illes Balears.

³ Botánica (Dpto. Biología), Universitat de les Illes Balears, Ctra. Valldemossa, km. 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Illes Balears.

En este trabajo se describen los trabajos pertenecientes al lote 2 “Detección de la bacteria fitopatógena *X. fastidiosa* en los diferentes vegetales de las Islas Baleares”. El objetivo de este lote es la detección de la bacteria fitopatógena en distintas muestras vegetales de las Islas Baleares, analizando muestras vegetales procedentes de los lotes 3, 4, 5, y 6 del contrato, , así como abordar el aislamiento y caracterización genética mediante las tecnologías de secuenciación masiva. Todos los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la *Universitat de les Illes Balears*.

La detección de la presencia de *X. fastidiosa* en muestras vegetales se ha realizado mediante PCR a tiempo real (qPCR). A partir de una selección de muestras positivas, se realizaron aislamientos del patógeno para su caracterización e identificación y posterior secuenciación de sus genomas. A lo largo de los tres años del proyecto se han procesado un total de 7.109 muestras, 2.116 en el año 2019, 2.197 en el año 2020 y 2.796 en el año 2021. De estas, alrededor del 27 % resultaron positivas en el diagnóstico de *X. fastidiosa* mediante qPCR.

Las muestras de los lotes 3, 4, 5 y 6, una vez recibidas en el laboratorio se procesaron siguiendo las recomendaciones establecidas por la EPPO (EPPO, 2016). A partir de los extractos vegetales obtenidos en su ma-



yoría de la extracción de nervios centrales de las hojas y/o peciolo, se realizó una extracción de ADN y a partir de ésta, el diagnóstico de *X. fastidiosa* mediante qPCR. Se usaron las pruebas Harper y colaboradores que consiste en el análisis de una región codificante para la proteína *rimR* del gen 16S rRNA (Harper y col., 2010; erratum 2013), y una segunda prueba confirmativa —sólo en aquellas muestras positivas— que tiene como secuencia diana un gen de una proteína hipotética conservada específica de 221 pb denominada HL (Francis y col., 2006). En todas las muestras positivas del lote 3 con suficiente carga bacteriana, se realizó la identificación de las distintas subespecies mediante la adaptación del protocolo de qPCR Tetraplex (Dupas y col., 2019). Cabe mencionar que el laboratorio cumplía con la normativa correspondiente en materia de bioseguridad al ser considerado un organismo cuarentenario y de tipo 2.

Los resultados obtenidos se reportaron a los investigadores principales de los distintos lotes. Por otro lado, una selección de muestras positivas se envió al laboratorio contratado en el Lote 1 para la caracterización de la subespecie y determinación del genotipo (ST) de *X. fastidiosa*. La selección de estas muestras se realizó conjuntamente con la *Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació del Govern Balear*.

Finalmente, en una selección de muestras positivas con suficiente carga bacteriana (valores de Ct inferiores a 30) se intentó obtener aislamientos de *X. fastidiosa* en los medios de cultivo recomendados por la EPPO: medio de extracto de levadura de carbón vegetal (BCYE) (Wells y col., 1987), PWG (Hill y Purcell, 1995) y PD2 (Davis y col., 1978). Los aislamientos se realizaron haciendo un tratamiento previo de las muestras vegetales con el objetivo de desinfectar superficialmente las hojas y evitar el crecimiento de microorganismos saprófitos, debido a que *X. fastidiosa* crece muy lentamente y puede quedar enmascarada en la placa de cultivo por organismos de crecimiento más rápido. Las placas se incubaron a 28 °C durante un mínimo de 15 días. Los aislados susceptibles de ser *X. fastidiosa* una vez identificados y caracterizados mediante técnicas moleculares como la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA (Lane, 1991), y los genes *rpoD* (Minsavage y col., 1994) y *cysG* (Yuan y col., 2010) específicos de *X. fastidiosa*, se seleccionaron para la secuenciación del genoma completo mediante la plataforma de secuenciación masiva Illumina MiSeq y su posterior análisis genómico. A continuación, se desglosan los principales resultados obtenidos en los distintos lotes analizados (lotes 3 a 6), atendiendo a los principales objetivos del proyecto:

1. Diagnóstico del patógeno vegetal *X. fastidiosa*

Lote 3. Detección y efectos de *Xylella fastidiosa* sobre la vegetación silvestre de las Islas Baleares

Con el objetivo de determinar y detectar las especies silvestres de las Islas Baleares, especialmente las endémicas, el grado de afección por *X. fastidiosa*, la prevalencia de la enfermedad en las especies más importantes, evaluar la intensidad de la infección y elaborar un análisis de los patrones espaciales de expansión de la infección a lo largo de tres años del proyecto se recogieron y analizaron muestras con síntomas compatibles con *X. fastidiosa*. El número de muestras analizadas por año y los resultados obtenidos en su diagnóstico se muestran en la Tabla 1. En total se analizaron 1.830 plantas silvestres tanto sintomáticas como asintomáticas, recogidas en Mallorca, Menorca, Ibiza, Formentera, y Cabrera (343 en el año 2019, 651 en el año 2020 y 836 en el año 2021). Un 10 % del total de muestras analizadas dio un resultado positivo, detectándose *X. fastidiosa* únicamente en las muestras recogidas en las islas de Mallorca, Menorca e Ibiza. Algunas muestras se reanalizaron en más de una ocasión para realizar un seguimiento de estas y para algunas plantas huésped se evaluaron distintos métodos para preparar el extracto vegetal a partir del cual se obtuvo el ADN.

En total se analizaron 147 plantas huésped diferentes de las cuales 27 resultaron positivas y se diagnosticaron 13 nuevas plantas huésped para este patógeno, incluyéndose en esta categoría no sólo nuevas plantas huésped sino también plantas huésped ya reportadas pero detectadas por primera vez en alguna de las islas de nuestra comunidad autónoma. Estas muestras se remitieron al Laboratorio Nacional de Referencia para su confirmación y su consecuente declaración como nueva planta huésped. Las nuevas plantas huésped detectadas a lo largo de los tres años de proyecto fueron: *Cistus albidus*, *Elaeagnus angustifolia*, *Genista hirsuta* subsp. *erioclada*, *Genista valdes-bermejoi*, *Helichrysum stoechas*, *Phlomis italica*, *Salvia officinalis*, *Santolina chamaecyparissus*, *Santolina magonica*, *Spartium junceum*, *Thymus vulgaris* subsp. *aestivus*, *Ulex parviflorus* y *Vitex agnus-castus*. En la Tabla 2 se muestran todas las plantas huésped analizadas, indicándose las que mostraron resultado positivo. Una selección de estas muestras positivas se envió al laboratorio responsable del lote 1 para la determinación de subespecie y secuetipo.

Tabla 1. Muestras analizadas para el diagnóstico de *X. fastidiosa* a lo largo de los tres años de proyecto correspondiente al Lote 3.

LOTE 3	2019	2020	2021	Total
+	23	57	105	185
-	320	594	731	1.645
Total	343	651	836	1.830

A su vez, todas las muestras positivas con elevada presencia de la bacteria (valores de Ct inferiores a 32) se analizaron mediante una qPCR Tetraplex que además de diagnosticar la presencia de *X. fastidiosa* permite determinar la subespecie. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en estos análisis. De las 160 muestras analizadas, 140 fueron positivas para *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, tanto en Mallorca como en Menorca, 15 para *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Ibiza) y 5 para *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (Mallorca). Estos resultados sugieren claramente que la subespecie *multiplex* predomina en las plantas silvestres de Mallorca frente a la subespecie *fastidiosa*.

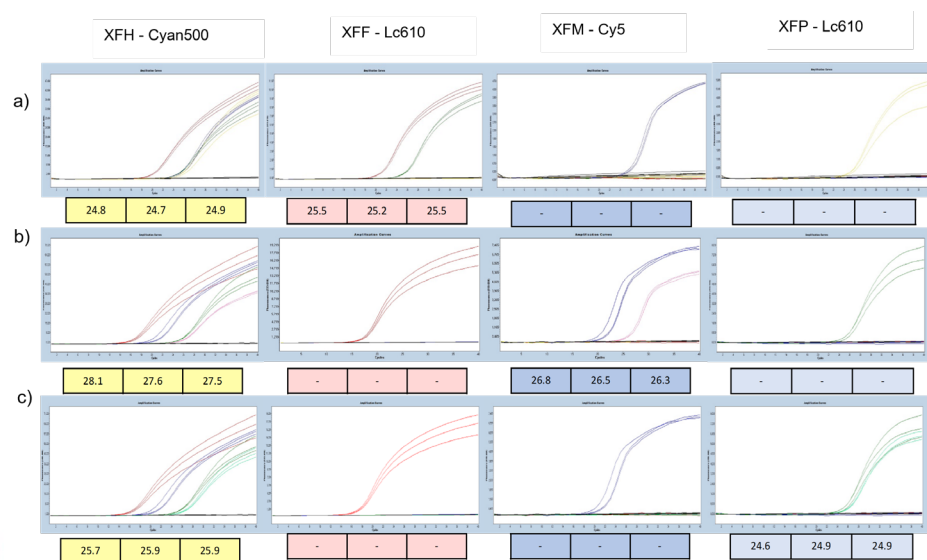


Figura 1. Ejemplo de resultado de la amplificación mediante qPCR Tetraplex para las distintas subespecies en tres muestras distintas. En la muestra a) se ha detectado la presencia de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, en la muestra b) la presencia de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* y en la muestra c) *X. fastidiosa* subsp. *pauca*. Cada una de las subespecies se marca con distintos fluorocromos. En

todas ellas se ponen los cebadores y sonda para detectar la especie *X. fastidiosa* (sonda XFH-Cyan500), la subespecie *fastidiosa* (XFF-Lc610), la subespecie *multiplex* (XFM-Cy5) y la subespecie *pauca* (XFP-Lc610).

Lote 4. Contribución al conocimiento de las especies de insectos vectores de Xylella fastidiosa en las Islas Baleares, así como su capacidad de transmisión en las plantas huéspedes

En este lote el objetivo principal era conocer la biología, ecología, dinámica y fauna útil asociada a las potenciales especies trasmisoras de *X. fastidiosa* en diversos cultivos y condiciones, así como evaluar el potencial de adquisición según las especies de insectos y la eficiencia de transmisión/competencia vectorial. Como parte del estudio, se analizó la presencia de *X. fastidiosa* en distintas muestras vegetales de los principales cultivos susceptibles (olivo, almendro, viña, cítricos y frutales de hueso) de diferentes zonas agroclimáticas representativas y amenazadas por *X. fastidiosa* en las Islas Baleares. Se analizaron muestras de Felanitx, Sos Ferrers, Manacor, Palma (Establiments, Sant Jordi, Ctra. Manacor), Lluçmajor y Santa Margalida. En total se analizaron 317 muestras vegetales (Tabla 3), correspondientes a las siguientes plantas huésped: *Cerastium siliqua*, *Cistus albidus*, *Dittrichia* sp., *Dittrichia viscosa*, *Ficus carica*, *Lavandula dentata*, *Morus alba*, *Olea europaea*, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebrinca*, *Populus* sp., *Prunus dulcis*, *Punica granatum*, *Quercus ilex* subsp. *ilex*, *Rhamnus alaternus*, *Rosmarinus officinalis*, *Rubus ulmifolius*, *Smilax aspera* y *Vinca* sp. Un 20 % de estas muestras dieron positivo, principalmente muestras de *Ficus carica*, *Olea europaea*, *Prunus dulcis* y *Rhamnus alaternus*.

Tabla 3. Muestras analizadas para el diagnóstico de *X. fastidiosa* a lo largo de los tres años de proyecto correspondiente al Lote 4.

LOTE 4	2019	2020	2021	Total
+	9	9	46	64
-	53	66	134	253
Total	62	75	180	317

Lote 5. Puesta a punto de un sistema de detección de la incidencia de *Xylella fastidiosa* en el cultivo del almendro mediante imágenes aéreas en la isla de Mallorca

El principal objetivo de este lote 5 fue evaluar con un sistema de detección mediante imágenes aéreas la incidencia de *X. fastidiosa* en almendros (*P. dulcis*) afectados. Para ello, además de analizar los campos de cultivo con cámaras hiperespectrales y térmicas, se recogieron muestras de almendros para la determinación de la presencia o no del patógeno y confirmar los resultados obtenidos con el grado de infección de las plantas. Se analizaron muestras de almendros en julio del 2019, 2020 y 2021 de distintas parcelas de Mallorca, localizadas en Binissalem, Concell, Felanitx, Lluçmajor, Marratxí, Puigpunyent (Son Cotoner), Santa Maria del Camí (Son Sureda) y Villafranca de Bonany. En total se analizaron 889 muestras, 43,4 % de las cuales dieron positivo para *X. fastidiosa* (Tabla 4). Una selección de muestras positivas se envió al laboratorio responsable del Lote 1 para la determinación de subespecie y secuetipo (ST).

Tabla 2. Listado de todas las especies de plantas huésped silvestres analizadas en el marco del Lote 3. En negrita se indican, las especies diagnosticadas como positivas a lo largo del estudio y con un asterisco, las especies confirmadas como nueva planta huésped de *X. fastidiosa*. En este último grupo se incluyen tanto las nuevas plantas huésped reportadas como las plantas detectadas como hospedadoras por primera vez en nuestra comunidad autónoma.

<i>Acacia saligna</i>	<i>Cistus clusii</i>	<i>Erica multiflora</i>	<i>Juniperus phoenicea</i> subsp. <i>turbinata</i>	<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>	<i>Rhamnus oleoides</i>	<i>Spartium junceum</i> *
<i>Ailanthus altissima</i>	<i>Cistus creticus</i>	<i>Erica scoparia</i>	<i>Lantana camara</i>	<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Suaeda vera</i>
<i>Albizia lophantha</i>	<i>Cistus monspeliensis</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Launaea cervicornis</i>	<i>Ononis crispa</i>	<i>Robinia pseudocacia</i>	<i>Tamarix</i> sp.
<i>Amaranthus retroflexus</i>	<i>Cistus salvifolius</i>	<i>Ficus carica</i>	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Ononis natrix</i>	<i>Rosa canina</i>	<i>Teucrium asiaticum</i>
<i>Anagyris foetida</i>	<i>Clematis cirrhosa</i>	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Ononis ramosissima</i>	<i>Rosa sempervirens</i>	<i>Teucrium capitatum</i> subsp. <i>majoricum</i>

<i>Anthyllis cytisoides</i>	<i>Clematis flammula</i>	<i>Galium creticanum</i>	<i>Lavandula dentata</i>	<i>Passiflora</i> sp.	<i>Rosa</i> sp.	<i>Teucrium dunense</i>
<i>Anthyllis hystrix</i>	<i>Cneorum tricoccon</i>	<i>Genista dorycnifolia</i>	<i>Lavandula latifolia</i>	<i>Phagnalon rupestre</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Teucrium marum</i>
<i>Artemisia arborescens</i>	<i>Convolvulus althaeoides</i>	<i>Genista hirsuta</i> ssp. <i>erioclada</i> *	<i>Limonium biflorum</i>	<i>Phagnalon saxatile</i>	<i>Rubia balearica</i>	<i>Teucrium subspinosum</i>
<i>Asparagus acutifolius</i>	<i>Conyza bonariensis</i>	<i>Genista lucida</i>	<i>Lonelisia cretica</i>	<i>Phillyrea angustifolia</i>	<i>Rubia peregrina</i>	<i>Thymbra capitata</i>
<i>Asparagus albus</i>	<i>Coriaria myrtifolia</i>	<i>Genista majorica</i>	<i>Lonicera implexa</i>	<i>Phillyrea media</i>	<i>Rubus ulmifolius</i>	<i>Thymelaea hirsuta</i>
<i>Asparagus angustifolius</i>	<i>Coris monspeliensis</i>	<i>Genista valdes-bermejoi</i> *	<i>Lonicera japonica</i>	<i>Phlomis italica</i> *	<i>Ruta angustifolia</i>	<i>Thymelaea velutina</i>
<i>Asparagus horridus</i>	<i>Coronilla glauca</i>	<i>Globularia alypum</i>	<i>Lycium intricatum</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Salvia officinalis</i> *	<i>Thymus vulgaris</i> subsp. <i>aestivus</i> *
<i>Asparagus stipularis</i>	<i>Crataegus azarolus</i>	<i>Helianthemum caput-felis</i>	<i>Medicago arborea</i>	<i>Polygala myrtifolia</i>	<i>Santolina chamaecyparissus</i> *	<i>Tilia platyphyllos</i>
<i>Asteriscus maritimus</i>	<i>Crataegus monogyna</i>	<i>Helichrysum ambiguum</i>	<i>Medicago citrina</i>	<i>Populus alba</i>	<i>Santolina magonica</i> *	<i>Tilia</i> sp.
<i>Astragalus balearicus</i>	<i>Crepis vesicaria</i>	<i>Helichrysum rupestre</i> var. <i>latifolium</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Prunus dulcis</i>	<i>Santolina</i> sp.	<i>Ulex parviflorus</i> *
<i>Brachypodium retusum</i>	<i>Daphne gnidium</i>	<i>Helichrysum rupestre</i>	<i>Medicago strasseri</i>	<i>Psoralea bituminosa</i>	<i>Schinus molle</i>	<i>Ulmus minor</i>
<i>Calicotome infesta</i>	<i>Dittrichia viscosa</i>	<i>Helichrysum stoechas</i> *	<i>Micromeria inodora</i>	<i>Punica granatum</i>	<i>Senecio cineraria</i>	<i>Viburnum tinus</i>
<i>Calicotome spinosa</i>	<i>Dorycnium hirsutum</i>	<i>Heliotropium europaeum</i>	<i>Myoporum laetum</i>	<i>Quercus cerrionides</i>	<i>Silene mollissima</i>	<i>Vinca difformis</i>
<i>Celtis australis</i>	<i>Dorycnium pentaphyllum</i>	<i>Hippocrepis grossii</i>	<i>Myrtus communis</i>	<i>Quercus coccifera</i>	<i>Smilax aspera</i>	<i>Viola arborescens</i>
<i>Chronanthus biflorus</i>	<i>Elaeagnus angustifolia</i> *	<i>Hypericum balearicum</i>	<i>Nerium oleander</i>	<i>Quercus ilex</i>	<i>Solanum bonariense</i>	<i>Vitex agnus-castus</i> *
<i>Cistus albidus</i> *	<i>Ephedra fragilis</i>	<i>Juniperus oxycedrus</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Rhamnus alaternus</i>	<i>Sorbus domestica</i>	<i>Withania somnifera</i>

Tabla 4. Muestras analizadas para el diagnóstico de *X. fastidiosa* a lo largo de los tres años de proyecto correspondiente al Lote 5.

LOTE 5	2019	2020	2021	Total
+	187	58	145	386
-	212	42	249	503
Total	395	100	394	889

Lote 6. Estudio de la resistencia/tolerancia/susceptibilidad varietal en los cultivos del almendro, viña y olivo frente a Xylella fastidiosa en las Islas Baleares

Finalmente, en el marco del lote 6 cuyo objetivo principal era caracterizar la dinámica estacional de síntomas y niveles de infección en las variedades de olivo, almendro y vid que presentaban respuesta diferencial a *X. fastidiosa* en condiciones de campo mediante qPCR, se analizaron 4.521 muestras (Tabla 5). Estas muestras provenían de diferentes variedades de distintos bancos de germoplasma de Mallorca que dispone la *Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació*. Concretamente, se analizaron los bancos de germoplasma de almendros de Son Real, Xorrigo y Sa Canova, los de olivo de Sa Granja y los de viña, localizados en Sa Granja y Sa Canova durante los meses de junio, julio y agosto, mayoritariamente. Alrededor del 30 % de las muestras de almendro fueron positivas mostrando en el caso de los almendros una mayor positividad en los meses de agosto, y una diferente afeción según la variedad analizada.

Tabla 5. Muestras analizadas para el diagnóstico de *X. fastidiosa* a lo largo de los tres años de proyecto correspondiente al Lote 6: banco de germoplasma.

LOTE 6	2019	2020	2021	Total
+	354	505	457	1.316
-	962	866	929	2.757
Total	1.316	1.371	1.386	4.073

Para el cultivo de vid se analizaron 60 muestras del banco de germoplasma de Sa Granja y 30 de Sa Canova, correspondientes a distintas variedades, en los meses de julio, agosto y septiembre, durante los tres años. En todas las ocasiones las muestras resultaron negativas para el diagnóstico de *X. fastidiosa*.

Para el cultivo de almendros se analizaron distintas variedades de los bancos de germoplasma de Sa Canova, Son Real y Xorrigo. En total, se analizaron 3.508 muestras vegetales observándose que, en los meses de agosto durante los tres años de muestreo realizado, los almendros presentaron un elevado porcentaje de positividad en comparación con el primer mes de recogida de muestras. Además, se observó una diferencia en la positividad atendiendo a las distintas variedades analizadas. Por ejemplo, las variedades Alzina, Corona, Mardia y Vivot mostraron una mayor detección de este patógeno a lo largo de los distintos muestreos, mientras que en la variedad Vairo prácticamente no se detectó.

El análisis del banco de germoplasma de olivo en Sa Granja, donde se analizaron 12 variedades mediante muestra compuesta de distintos árboles de la misma variedad arrojó siempre un resultado negativo en todos los meses analizados.

En este mismo lote se analizaron 846 muestras provenientes de parcelas agrícolas principalmente de viña y almendros, localizadas en Binissalem, Felanitx, Montuiri, Son Bordils y Xorrigo, con el objetivo de determinar la relación entre la composición de la savia y el desarrollo de la enfermedad ocasionada por *X. fastidiosa* (77 % de estas muestras dieron resultado negativo).

2. Caracterización e identificación de aislados de *X. fastidiosa*, secuenciación de genomas y análisis genómico

Un total de 91 muestras positivas de los distintos lotes que mostraban un elevado nivel de infección, principalmente plantas silvestres del lote 3, se seleccionaron para intentar realizar el aislamiento de cepas de *X. fastidiosa*. Los aislados obtenidos susceptibles de ser este fitopatógeno debían presentar una morfología colonial puntiforme y de coloración blanquecina (Figura 2). Posteriormente a la selección, se aislaron en cultivo puro utilizando agar BCYE incubado a 28°C durante mínimo 15 días. Una vez obtenidos los aislados en cultivo puro, se identificaron a nivel de especie mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA. El gen *rpoD* se usó para determinar la subespecie y el gen *cysG* para confirmar los resultados de las amplificaciones anteriores. Los aislados correspondientes a la subespecie de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* mostraron en general un mejor crecimiento en placa. Una vez confirmados los distintos aislados, una selección de estos se secuenció mediante la plataforma de secuenciación masiva Illumina MiSeq para su posterior análisis.

De las 91 muestras estudiadas se obtuvieron aislamientos en once de ellas, y una vez caracterizados e identificados se secuenciaron sus genomas completos. De estos aislados diez correspondieron a la subespecie *multiplex* y uno a la subespecie *fastidiosa*. Se obtuvieron genomas de *X. fastidiosa* aisladas de las siguientes plantas huésped *Helichrysum stoechas*, *Prunus dulcis*, *Rhamnus alaternus* y *Spartium junceum*.

Los genomas obtenidos una vez ensamblados se compararon con los más de 150 genomas de los que se dispone del género *Xylella* incluyéndose tanto genomas propios como los disponibles en las bases de datos. El análisis del *core* y el pangenoma realizado hasta el momento, así como la comparativa genómica mostró claras diferencias entre las distintas subespecies, aunque se observaron pocos genes exclusivos para cada subespecie, la mayoría de los cuales relacionados con proteínas hipotéticas. Se estudiaron las diferencias en otros genes relacionados con la potencial virulencia o en la formación del pili tipo IV, observándose pequeñas diferencias en la secuencia nucleotídica entre las distintas subespecies. En la formación del pili tipo IV se observaron diferencias tanto en las proteínas del complejo cebador, encargado de la función de quimiotaxis del pili como en las proteínas que forman el pili en sí. En cuanto a las proteínas relacionadas con la virulencia la mayoría de diferencias se encontraron en genes de adhesión bacteriana como las adhesinas, genes relacionados con el *quorum sensing* y enzimas hidrolíticos.

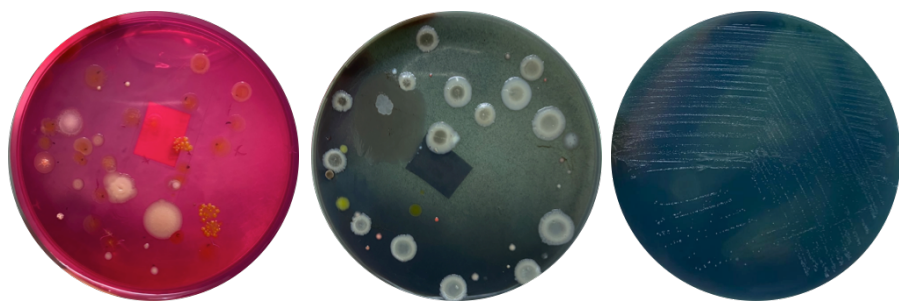


Figura 2. Ejemplos de las distintas morfologías coloniales observadas en placas de agar PWG (izquierda) y agar BCYE (centro) a partir de los extractos vegetales realizados. En la imagen de la derecha se muestra la morfología colonial observada de una cepa de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* en cultivo puro aislada en agar BCYE.

Bibliografía

1. **Davis MJ, Purcell AH & Thomson SV** (1980) Isolation medium for the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology* 70, 425–429.
2. **Delbianco A, Gibin D, Pasinato L, Boscia D & Morelli M** (2023) Update of the *Xylella* spp. host plant database-systematic literature search up to 30 June 2022. *EFSA Journal* 21(1), 7726.
3. **Dupas E, Briand M, Jacques MA & Cesbron S** (2019) Novel Tetraplex Quantitative PCR Assays for Simultaneous Detection and Identification of *Xylella fastidiosa* Subspecies in Plant Tissues. *Frontiers in Plant Science* 10, 1732.
4. **EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization)** (2016) PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*. *EPPO Bulletin* 46 (3), 463–500.
5. **Francis M, Lin H, Cabrera-La Rosa J, Doddapaneni H & Civerolo EL** (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* 115, 203–213.
6. **Harper SJ, Ward LI & Clover GRG** (2010) Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 100(12), 1282–1288.
7. **Lane DJ** (1991) 16S/23S rRNA sequencing In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrand, E. and Good-fellow, M., Eds.). Wiley, Chichester.
8. **Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC & Stall RE** (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 45, 6–461.
9. **Olmo D, Nieto A, Adrover F, Urbano A, Beidas O, Juan A, Marco-Noales E, López MM, Navarro I, Monterde A, Montes-Borrego M, Navas-Cortés JA & Landa BB** (2017) First detection of *Xylella fastidiosa* infecting Cherry (*Prunus avium*) and *Polygala myrtifolia* plants, in Mallorca Island, Spain. *Plant Disease* 101(10), 1820–1820.
10. **Yuan X, Morano L, Bromley R, Spring-Pearson S, Stouthamer R & Nunney L** (2010) Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology* 100(6), 601–611.
11. **Wells JM, Raju BC, Hung HY, Weisburg WG, Mandelco-Paul L & Brenner DJ** (1987) *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37(2), 136–143.

3. Detección y efectos de *Xylella fastidiosa* sobre la vegetación silvestre de les Illes Balears

Juan Rita Larrucea¹, María Cañellas Cifré¹, Mauricio Ruiz Pérez², Margarita Gomila Ribas¹

¹ Dep. de Biologia. Universitat de les Illes Balears.

² Servei de Sistemes d'Informació Geogràfica i Teledetecció. Universitat de les Illes Balears.

Introducción

Xylella fastidiosa afecta a plantas cultivadas de gran interés económico, como es caso del olivo, la viña, el almendro o el naranjo. Precisamente por los daños que causa a los cultivos se ha avanzado mucho en los métodos de detección, descripción de síntomas, detección mediante sensores espectrales, etc. Sin embargo, este conocimiento no ha podido evitar una mortandad masiva de olivos del sur de Italia (Morelli y col., 2021) o de almendros de las islas Baleares (Olmo y col., 2021). El paisaje de estas zonas ha cambiado rápidamente, bien porque se han arrancado los árboles o porque quedan sus restos secos sobre el terreno. Estos escenarios nos muestran hasta qué punto *X. fastidiosa* es un riesgo para las plantas que son sensibles.

Una característica notable de esta bacteria es el amplísimo abanico de plantas que puede infectar. De alguna manera, es un reflejo de la poca especialización de los insectos que la transmiten. Efectivamente, en las islas Baleares, *Philaenus spumarius* es el vector más importante, responsable de la transmisión de la bacteria de una planta enferma a otra sana al alimentarse de la savia de estas plantas (López-Mercadal y col., 2021). Los expertos nos dicen que este insecto es polífago, esto es, puede utilizar un enorme número de plantas diferentes para alimentarse. En consecuencia, muchas especies de plantas, muy diferentes entre sí, pueden recibir inóculos de *X. fastidiosa* al ser picadas por este insecto. Algunas de estas plantas pueden ser sensibles a la infección y desarrollarán la enfermedad o serán

portadoras de la bacteria. Efectivamente, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA y col., 2023) ha reportado 679 especies de plantas, pertenecientes a 88 familias distintas, en las que se ha detectado la presencia de la bacteria por cualquiera de los métodos de detección reconocidos.

Conocemos aquellas plantas cultivadas que son sensibles, pero la mayoría de las plantas que sufren la enfermedad son, de hecho, plantas silvestres de nuestros matorrales y bosques. Y de estas plantas silvestres sabemos muy poco. ¿Cuáles son? ¿Dónde están? ¿En qué medida son afectadas por la infección? ¿Cuáles son sus síntomas? ¿Pueden llegar a desaparecer? Son algunas de las preguntas que podemos hacernos sobre estas plantas y que hasta ahora no tenían una respuesta satisfactoria. Conocerlas es importante porque pueden ser un reservorio de bacterias que pueden transmitirse después a los cultivos. Además, estas plantas silvestres pueden tener un gran valor ecológico, como parte fundamental de las comunidades vegetales de nuestras islas. También pueden tener un valor paisajístico, ya que la vegetación natural es una pieza fundamental del paisaje de un territorio. Finalmente, algunas de estas plantas pueden ser endémicas, o sea que solo viven en nuestras islas y, por lo tanto, tener un enorme valor como parte de nuestro patrimonio natural. La experiencia acumulada sobre las cultivadas nos muestra que también las plantas silvestres más sensibles podrían llegar a desaparecer sin que llegáramos a darnos cuenta de lo que ha sucedido.

Para abordar la problemática de las plantas silvestres en relación a la patología provocada por *X. fastidiosa* en el archipiélago balear, se desarrolló un proyecto de investigación sobre este tema (2019-2022) financiado por la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de las Islas Baleares con los fondos del Impuesto del Turismo Sostenible (ITS). El objetivo general era evaluar hasta qué punto se estaba produciendo una degradación de la vegetación natural debido a esta bacteria, y conocer si algunas especies podían correr algún peligro, especialmente entre aquellas que son endémicas. Este proyecto fue liderado por el Laboratorio de Botánica de la Universidad de les Islas Baleares.

Dicho proyecto se desarrolló siguiendo cuatro objetivos concretos:

1. Conocer las plantas silvestres afectadas, especialmente las endémicas.
2. Averiguar, mediante el uso de imágenes satelitales, si es posible reconocer el decaimiento de la vegetación debido a la infección.
3. Saber el grado de afectación de las plantas que se encuentran en zonas forestales.

4. Averiguar si hay un diferente grado de afectación entre las plantas que se encuentran en el interior de las masas forestales y las que se encuentran en su periferia.

A continuación, presentamos los principales resultados y conclusiones de este trabajo. Se han agrupado en dos bloques. El primero se dedica a describir el impacto de esta enfermedad sobre las especies concretas de plantas silvestres, entre ellas las endémicas, y su distribución en las islas Baleares. En el segundo apartado hemos reunido varios estudios diferentes pero que en su conjunto pretenden conocer la incidencia de esta infección sobre una las comunidades forestales donde el acebuche (*Olea europea* var. *sylvestris*) es el árbol dominante o está al menos presente. Este tipo de vegetación aparentemente es el más afectado por *X. fastidiosa*.

1.- Sensibilidad de las plantas silvestres de las islas Baleares a *X. fastidiosa*.

En esta parte del proyecto se llevó a cabo un amplio muestreo de especies arbustivas que se encuentran en la vegetación natural de las islas. Se muestreó todo el territorio del archipiélago, incluyendo la isla de Cabrera y dos islotes cercanos a Ibiza. Se estructuró el muestreo siguiendo una malla geográfica de 10 x 10 km (Figura 1), para asegurar una prospección global del territorio insular. En total se tomaron 1.857 muestras, de 236 localidades, pertenecientes a 147 especies, 24 de ellas endémicas (ver tabla 2 del capítulo 1). La mayor parte de las muestras se tomaron en el medio natural, pero también en algunas zonas ajardinadas (principalmente rotondas de carreteras) donde se cultivaban plantas autóctonas.

Del total de muestras, 190 dieron positivo a *X. fastidiosa*, lo que supone un 10% aproximadamente. Sin embargo, excluyendo una serie de muestras que se tomaron al azar, independientemente si presentaban síntomas o no, la positividad del resto de muestras tomadas de forma homogénea ascendió al 12%. Estas muestras positivas correspondieron a 24 especies diferentes, 18 de las cuales eran nativas de las Baleares, 3 de ellas endémicas; otras 6 eran especies no nativas (Tabla 1). Diez de estas especies nunca se habían citado hasta ahora como sensibles a *X. fastidiosa* y se han incorporado al catálogo de la EFSA, otras tres se encontraron por primera vez en alguna de las islas.

Tabla 1. Especies que han dado positivo a *X. fastidiosa*. En negrita las especies endémicas. Con * especies no nativas.

<i>Calicotome spinosa</i>	<i>Phagnalon saxatile</i>
<i>Cistus albidus</i>	<i>Phlomis italica</i>
<i>Cistus monspeliensis</i>	<i>Polygala myrtifolia</i> *
<i>Clematis cirrhosa</i>	<i>Rhamnus alaternus</i>
<i>Elaeagnus angustifolia</i> *	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Salvia officinalis</i> *
<i>Genista hirsuta ssp. erioclada</i>	<i>Santolina chamaecyparissus</i> *
<i>Genita valdes-bermejoi</i>	<i>Santolina magonica</i>
<i>Helichrysum stoechas</i>	<i>Spartium junceum</i> *
<i>Lavandula dentata</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
<i>Myoporum laetum</i> *	<i>Ulex parviflorus</i>
<i>Olea europaea</i>	<i>Vitex agnus-castus</i>

Los resultados positivos se distribuyeron por todo el territorio de Menorca y de Ibiza (Figura 2). En Mallorca se encontraron muestras positivas en toda la isla excepto en la zona de la Serra de Tramuntana, Cap de Formentor y península de Andratx. En Formentera, Cabrera y en los dos islotes de Ibiza no se encontraron ninguna muestra positiva, por lo que aparentemente están libres de la infección. Las zonas forestales densas, principalmente pinares y encinares, estaban mayoritariamente libres de esta infección, aunque se encontraron muestras positivas en los márgenes de estas zonas forestales.

Al margen de los resultados analíticos, y tomando como indicador el estado sanitario de los acebuches, la gravedad de la infección no está uniformemente extendida. En Menorca, pese a que se han encontrado plantas infectadas en todo su territorio, la situación está aparentemente peor en ambos extremos (oriental y occidental) de la isla. En Ibiza, la parte aparentemente más afectada es la zona agrícola central de la isla. En Mallorca, la zona agrícola del centro-oeste de la isla está particularmente afectada. Por el contrario, las tierras más cercanas a la Serra de Tramuntana presentan un menor grado de afectación. Esta valoración debería confirmarse con métodos cuantitativos.

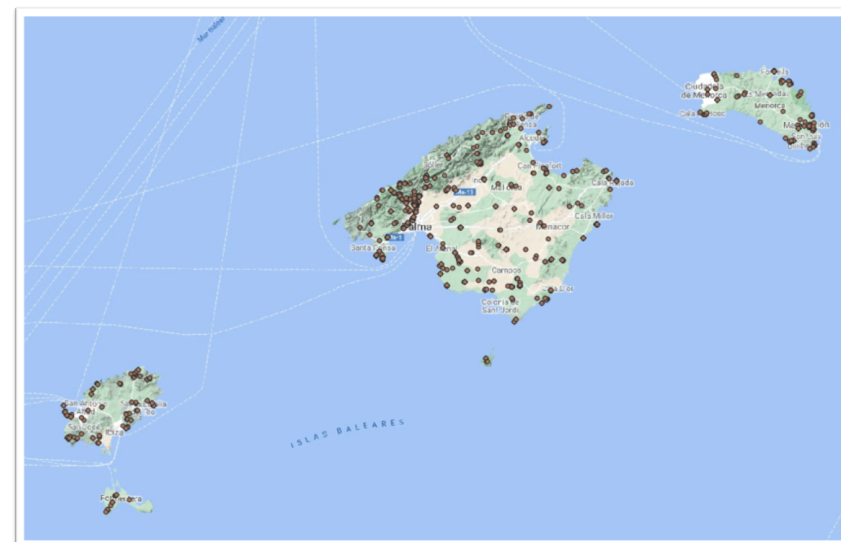


Figura 1. Mapa de las localidades donde se han tomado muestras de plantas para el análisis de *X. fastidiosa*.

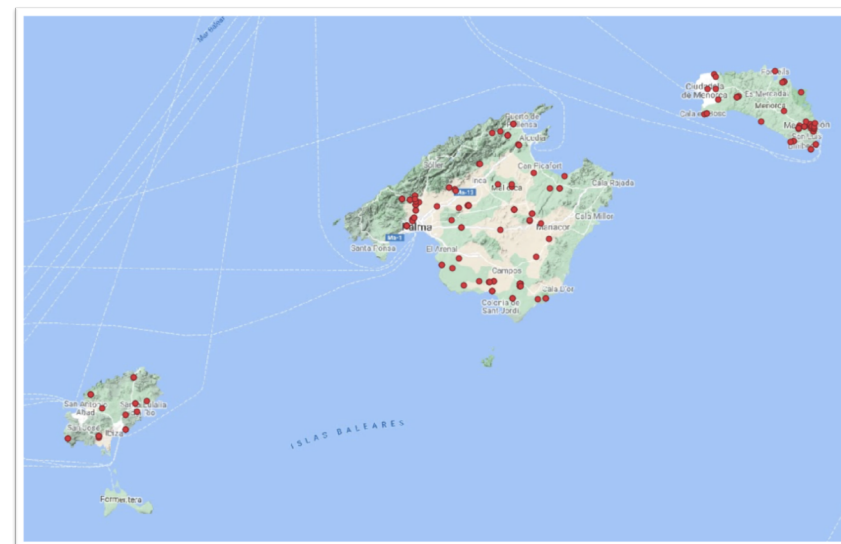


Figura 2. Distribución de las muestras positivas a *X. fastidiosa*.

Síntomas más frecuentes

Los síntomas que provoca la infección por *X. fastidiosa* son muy variables y dependen de cada especie de planta. Por otra parte, la presencia de síntomas compatibles con la enfermedad no garantiza que la planta en cuestión esté infectada. La falta de agua u otras patologías pueden dar lugar a síntomas parecidos. Hemos constatado, mediante recolecciones de varias muestras del mismo individuo, que una planta infectada puede dar un resultado negativo en los análisis de laboratorio, lo que se conoce como un falso negativo, seguramente porque las bacterias no se encuentran uniformemente distribuidas en las plantas. Estos falsos negativos pueden haber distorsionado los resultados que probablemente infravaloran la prevalencia de la infección para algunas especies, y no se puede descartar que en las especies afectadas no haya sido detectada. Dicho esto, hay un conjunto de síntomas que aparecen con frecuencia en las plantas enfermas, y que permiten dirigir la toma de muestras hacia los ejemplares que con mayor probabilidad están afectados por la bacteria. Estos síntomas son los siguientes:

- Arbustos muertos, o con solo algunas ramas vivas, junto a otros individuos completamente sanos (indicador de que la causa de la muerte no es un factor general, como la falta de agua, sino específico del individuo).
- Ramas defoliadas dispersas sin un patrón regular por el conjunto de la planta (Figura 3).
- Ramas con hojas con síntomas de la infección junto con otras ramas con hojas sanas en el mismo individuo.
- Ramas con hojas muertas junto con otras ramas con hojas vivas. Este síntoma es muy característico en los acebuches en el verano y otoño.
- Hojas con diferente grado de necrosis que avanza desde el ápice hacia la base.
- Ramas con hojas más pequeñas de lo normal. La miniaturización de las hojas enfermas es un síntoma compartido por muchas especies.



Figura 3. Acebuches con ramas defoliadas irregularmente repartidas por la copa, acompañadas de ramas sanas, son síntomas de una probable infección por *X. fastidiosa*.

La afectación de las especies endémicas

En este estudio se han encontrado tres especies endémicas sensibles a *X. fastidiosa* (*Santolina magonica*, *Genista valdes-bermejoi* y *Phlomis italica*), a las que hay que añadir otras dos (*Genista lucida* y *Teucrium capitatum* subsp. *majoricum*) conocidas a partir del trabajo de otros autores.

La situación de *S. magonica* es particularmente seria. Esta especie es endémica de Menorca y Mallorca. Hasta el momento solo se han encontrado ejemplares afectados en Menorca. En esta isla se han encontrado dos poblaciones, de las que se han obtenido muestras positivas, ambas en entornos naturales costeros. También se han encontrado plantas infectadas en ajardinamientos, tanto particulares como en rotondas de las carreteras. En los todos casos se observaron numerosas plantas muertas o muy dañadas por lo que la infección afecta muy seriamente a esta especie (Figura 4), es verosímil que localmente pueda llegar a desaparecer. Es muy importante realizar un estudio del estado de conservación de todas las poblaciones de Menorca y continuar el muestreo en Mallorca.



Figura 4. *Santolina magonica* infectada por *X. fastidiosa*, con la mayor parte de las ramas muertas.

El caso de *G. valdes-bermejo* también es remarcable. Esta especie es endémica de Mallorca de la que existen varias poblaciones disjuntas, esto es muy alejadas unas de otras. Vive principalmente en la Serra de Tramuntana pero también, de forma puntual, en otras partes de la isla. Se han encontrado varias plantas que dieron resultado positivo en una población aislada que se encuentra en la parte meridional de la isla. Esta población está en riesgo de desaparecer, ya que la mayoría de los individuos presentan síntomas de la infección por *X. fastidiosa*. Afortunadamente, las muestras de la misma especie tomadas en la parte norte de la isla, donde es más frecuente, dieron resultado negativo.

P. italica es la especie que aparentemente está menos afectada de las tres. Únicamente se han encontrado muestras positivas en plantas cultivadas en las rotondas de las carreteras de Menorca. Finalmente, se puede comentar el caso de *Genista hirsuta* subsp. *eriodlada*, un taxón que en las Baleares solo se encuentra en Ibiza donde es relativamente rara. Estas plantas muestran diferencias morfológicas respecto de las poblaciones de la Península Ibérica por lo que algunos autores la han considerado como una variedad endémica de Ibiza (*Genista hirsuta* var.

trichoacantha), criterio que hoy en día no es mayoritario. Hemos encontrado varias muestras positivas de esta especie, y sus poblaciones muestran síntomas de decaimiento que podrían deberse a la infección por *X. fastidiosa*, que podría estar muy extendida en esta especie. Sería importante hacer un seguimiento de estas plantas para conocer su grado de afectación y el riesgo de corren.

La afectación del resto de plantas silvestres

Algunos arbustos mediterráneos, que son muy frecuentes en la flora de las islas Baleares, son sensibles a *X. fastidiosa*. Entre estas especies podemos citar a *Cistus albidus* (“estepa blanca”), *Cistus monspeliensis* (“estepa llimonenca”), *Rosmarinus officinalis* (“romani”), *Rhamnus alaternus* (“llapúdol”), *Clematis cirrhosa* (“vidalba”), *Helichrysum stoechas* (“flor de tot l’any”), entre otras. Todas estas plantas son componentes habituales en los matorrales, garrigas y bosques de todas las islas. Las muestras que han dado positivo correspondían a plantas que se encontraban en los márgenes de zonas forestales y de zonas degradadas. Todas las plantas con un resultado positivo que han sido monitoreadas han acabado por morir, por lo que la infección por *X. fastidiosa* tiene un riesgo potencial muy serio, y para algunas catastrófico, si se extendiera de forma masiva.

Algunas de estas especies, como los *Cistus* spp., con una capacidad germinativa elevada, pueden de reconstruir la población afectada con relativa rapidez. Otras, como *Rosmarinus officinalis*, no tienen un dinamismo tan veloz y no se puede descartar que puedan llegar a desaparecer de zonas con una prevalencia importante de la infección. En general, la proporción de muestras que han dado positivo, respecto del total es bastante bajo (7,3 % para la *Cistus albidus*, 11,2 % para *Rosmarinus officinalis*). Sin embargo, estos valores se deben tomar con precaución ya que, como se ha comentado antes, se ha constatado que plantas enfermas pueden dar negativo en los análisis. Así, los porcentajes de prevalencia infravaloran el problema en una proporción desconocida.



Figura 5. “Estepa blanca” (*Cistus albidus*) en Ibiza, la planta acaba muriendo por la infección. Es frecuente encontrar individuos muy afectados junto a otros aparentemente sanos.

Otra planta silvestre que están sufriendo la infección de forma severa es *Fraxinus angustifolia* (“fleix”). Se trata de un árbol caducifolio que se encuentra solo en Mallorca. Vive en los márgenes de torrentes y sobre suelos húmedos. Este árbol, frecuente en los torrentes de la Serra de Tramuntana y de los municipios cercanos como Esporles, Puigpunyent, Alaró, Consell, Pollensa, etc., soporta mal la falta de agua y es particularmente sensible a *X. fastidiosa*, una bacteria que dificulta o incluso obstruye el transporte del agua desde las raíces a las hojas. En estas zonas periféricas de la Serra se han visto numerosos árboles afectados e incluso muertos por la infección. La tasa de positividad ha sido muy alta del 37,1%. Seguramente es una de las especies más sensibles y con peor pronóstico de nuestra flora (Figura 6).



Figura 6. *Fraxinus angustifolia*, “fleix”, afectado por *X. fastidiosa*, con síntomas característicos como la presencia de ramas muertas o con pocas hojas junto con ramas aparentemente sanas.

El acebuche, *Olea europea* var. *sylvestris* (“ullastre”), también se está viendo fuertemente afectado por esta patología. El 46,2% de las muestras tomadas de árboles con síntomas dieron positivo, es la tasa más alta del conjunto de especies estudiadas (Figura 7). En esta especie también se han detectado falsos negativos por lo que esta tasa de positividad infravalora los casos que existen en la realidad. Se pueden ver árboles con fuertes defoliaciones, o con ramas con hojas muertas, en cualquier parte de las islas de Menorca y de Ibiza, y en gran parte de Mallorca. El impacto ecológico y paisajístico es notable. En algunas zonas de las tres islas la mayor parte de los individuos manifiestan síntomas, cuando no están completamente defoliados. Sin embargo, y como veremos en otros apartados, este impacto pudiera estar limitado a las zonas periféricas de las masas forestales, así como a los árboles aislados o que se encuentran en la vecindad de campos de cultivo.

La enfermedad es subletal para el acebuche en Menorca y Mallorca. Sin embargo, en Ibiza, donde se encuentra la subespecie de la bacteria que causó la muerte de los olivares de Italia (*X. fastidiosa* subsp. *pauca*), los árboles acaban muriendo o mantienen un débil rebrote en sus bases.

El acebuche es un árbol muy resistente, capaz de rebrotar desde la base incluso cuando ha perdido toda su parte aérea. Produce muchas semillas, que son dispersadas por las aves, lo que le da una enorme capacidad para colonizar tierras abandonadas o suelos vacíos. Gracias a esta resistencia y a su facilidad para reproducirse, el pronóstico a largo plazo es que desarrolle mecanismos adaptativos que le permita convivir con la bacteria. Mientras, muchas zonas de nuestros espacios naturales quedarán marcados por la defoliación de estos árboles.



Figura 7. Acebuche en Menorca afectado por *X. fastidiosa*. Desde principios de verano y hasta inicios de otoño las ramas con hojas muertas, pero aún sobre el árbol son un síntoma de probable infección por esta bacteria.

Un caso completamente opuesto a los dos anteriores es el de la encina, *Quercus ilex* ("alzina"). De las 56 muestras recogidas no se ha encontrado ninguna que diera un resultado positivo a la bacteria. Son buenas noticias, ya que si este árbol fuera seriamente afectado por este patógeno las consecuencias ecológicas y paisajísticas serían muy graves. Afortunadamente, no es este el caso. Algunas de nuestras muestras han dado resultados dudosos, que después no han sido confirmados sobre nuevas muestras de la misma planta. Por ello, es probable que estos ár-

boles reciban inoculaciones de bacterias transmitidas por el vector, pero son capaces de frenar la infección sin que le provoque daños relevantes.

El problema de las plantas de los jardines

Es muy frecuente que se utilicen plantas mediterráneas en los jardines, sobre todo en las vías públicas y rotondas de carreteras, por lo que se tomaron algunas muestras de especies nativas y no nativas cultivadas en estos jardines. También se analizaron algunas especies ornamentales que tienen la capacidad de naturalizarse y aparecer fuera de los confines de los jardines. El análisis de estas muestras nos ha permitido encontrar plantas nativas infectadas de especies como: *Rosmarinus officinalis* ("romañí"), *Santolina magonica* ("camamil·la de Maó"), *Phlomis itálica* ("herba blanera") (fig. 8), *Vitex agnus-castus* ("aloc"), *Thymus vulgaris* ("tem") y *Lavandula dentata* ("garlanda"). Además de otras especies mediterráneas que se utilizan en jardines y huertos como *Salvia officinalis* ("salvia"), *Spartium junceum* ("ginestra"), *Nerium oleander* ("baladre") y *Santolina chamaecyparissus* ("camamil·la"). Esta lista seguramente podría crecer más si se hiciera un muestreo exhaustivo en jardines en general y en los jardines de las rotondas en particular. Es muy importante hacer un estudio que nos permitiría averiguar si estas plantas enfermas se han infectado después de ser plantadas o por el contrario fueron plantadas portando la enfermedad desde su origen.



Figura 8. *Phlomis itálica*, una especie endémica de Menorca y Mallorca afectada por *X. fastidiosa* en el ajardinamiento de una rotonda de Menorca.

2.- El estado sanitario de las maquias de acebuche, *Olea europea* var. *sylvestris*.

Como se apuntó en el apartado anterior, una de las plantas más afectadas por *X. fastidiosa* es el acebuche, *Olea europea* var. *sylvestris*. Los árboles irregularmente defoliados se pueden ver en casi cualquier lugar de las tres islas principales. El acebuche tiene una gran importancia ecológica y paisajística, sobre todo en Mallorca y Menorca, por este motivo se llevó a cabo un estudio más profundo de esta especie y de la comunidad vegetal donde vive. Para ello se escogieron diecinueve zonas en las cuatro islas principales (12 en Mallorca, 3 en Menorca y en Ibiza, y 1 en Formentera) con características forestales, donde el acebuche era un elemento importante o forma parte de la vegetación. En estas zonas se estudió el estado sanitario de la comunidad vegetal en su conjunto abordándolo desde tres aproximaciones diferentes: 1) Analizando del índice NDVI de la vegetación en una serie temporal de imágenes satelitales. 2) Muestreando al azar las principales especies de plantas de esta comunidad para detectar el patógeno. 3) Comparando el estado sanitario de los acebuches dentro y en la periferia de las zonas forestales. A continuación, se presentan los principales resultados de estas líneas de trabajo.

Análisis del índice NDVI de una serie temporal de imágenes satelitales

Se seleccionaron imágenes satelitales (Landsat) desde 1984 hasta 2018 de cada una de estas 19 zonas, unas tomadas en verano y otras en invierno, generando dos series independientes de imágenes. De cada una, se ha calculó el índice NDVI, uno de los más utilizados para conocer el estado fisiológico de la vegetación (Di Nissio y col., 2020). Este índice es alto, si el estado fisiológico es bueno y bajo en caso contrario. Este índice fue calculado para superficies de terrenos homogéneos de 30 m de lado. La tecnología de la época inicial de las series no permitía una mayor resolución. Con este estudio se pretendía conocer si se había producido un decaimiento del estado de la vegetación a lo largo de la serie que pudiera relacionarse con la entrada de *X. fastidiosa*.

Los resultados obtenidos son coincidentes en todas las parcelas y en las dos épocas del año estudiadas. Las tendencias de este índice fueron positivas en todas las parcelas y en todas las islas, tanto en verano como en invierno (Figuras 9 y 10). Las oscilaciones más importantes del estado fisiológico de la vegetación a lo largo de estos años se pueden relacionar más con años secos o húmedos que con otros factores. Así, por

ejemplo, en la mayor parte de las parcelas se puede observar un declive entre los años 1996 y 2001, que fue un período particularmente seco. La línea de tendencia positiva se puede explicar por el propio crecimiento de la vegetación a lo largo del tiempo. En cualquier caso, la evolución de este índice no detecta un problema sanitario que pueda relacionarse con la entrada de *X. fastidiosa*.

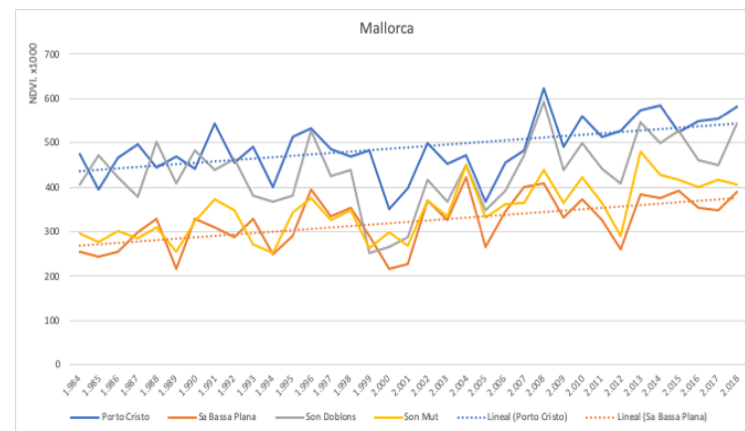


Figura 9. Evolución del índice NDVI de cuatro parcelas de Mallorca, desde el año 1984 hasta el 2018. Se han añadido las líneas de tendencia de las dos parcelas con valores más extremos.

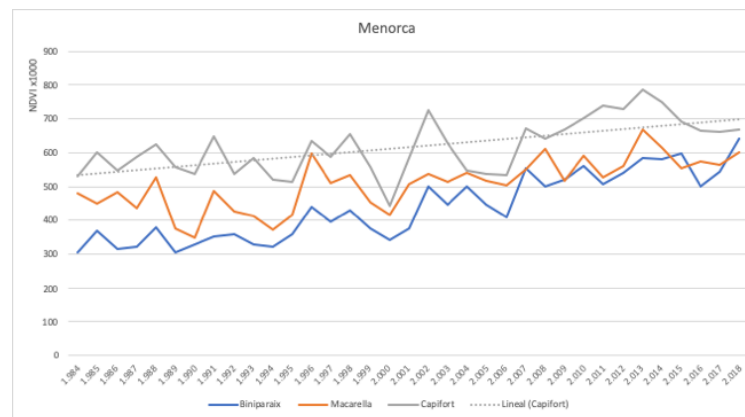


Figura 10. Evolución del índice NDVI de tres parcelas de Menorca, desde el año 1984 hasta el 2018. Se han añadido la línea de tendencia de la parcela con valores más altos.

Grado de afectación de las plantas que se encuentran dentro de las zonas forestales.

En las 19 zonas escogidas de las cuatro islas se tomaron cinco muestras al azar de otros tantos individuos de las especies de plantas leñosas más comunes (*Olea europea* var. *sylvestris*, *Rosmarinus officinalis*, *Cistus albidus*, etc.) que se encontraban en el interior de una vegetación densa. Se pretendía saber la prevalencia de la infección en estas especies y si había diferencias entre localidades e islas. Se tomaron 268 muestras de 32 especies diferentes, aunque 16 de ellas fueron muestreadas con mayor intensidad. El resultado fue que, de todas estas muestras, solo se encontraron dos positivas a *X. fastidiosa*, ambas tomadas en una misma zona del sur de Menorca. Este resultado indica que la incidencia de la infección en el interior de las zonas forestales, o con vegetación leñosa densa, es muy baja. La detección de *X. fastidiosa* en muestras tomadas al azar, como el que se hizo en este caso, es muy difícil por lo que es recomendable llevar a cabo muestreos de plantas con sintomatología compatible con la enfermedad.

Comparación del estado sanitario de *Olea europea* var. *sylvestris* en zonas forestales densas y en la periferia de las mismas.

Algunas plagas de insectos forestales atacan preferentemente a árboles aislados o que se encuentran en los márgenes de los bosques. Es razonable la hipótesis de que el insecto transmisor de la bacteria pudiera tener un comportamiento parecido y afectar preferentemente a los árboles que se encuentran en esas posiciones de contacto con campos de cultivo o espacios abiertos. Una afectación diferenciada en función de donde se encuentran las plantas, en zonas periféricas o en el interior de la vegetación densa, podría explicar la paradoja de que visualmente se observan muchos acebuches defoliados (porque al estar en zonas periféricas se ven más), pero no se detectan plantas enfermas en los muestreos realizados en el interior de la vegetación, ni de que haya observado un decaimiento mediante la serie de imágenes satelitales (tomadas del interior de las zonas forestales).

Para chequear esta hipótesis se escogieron tres de las doce zonas seleccionadas de Mallorca para los otros dos estudios anteriores. En estas tres zonas se trazaron cuatro transectos de unos 100 m de largo dentro de la comunidad de acebuche, otros cuatro en zonas periféricas del mismo con campos de cultivos y cuatro más en masas de

acebuche con estructura lineal con campos de cultivos a ambos lados. En estos transectos se evaluó individualmente el estado sanitario de los acebuches siguiendo una escala de 0 a 5, donde 0 correspondía a un árbol sin síntomas y un 5 correspondía a un árbol muerto. Se tomaron igualmente muestras para analizar la presencia de la bacteria en árboles sintomáticos de varios de estos transectos.

En la figura 11 se muestran los principales resultados. Cuando se evalúan las tres parcelas de forma integrada, no existe una diferencia significativa en el grado de defoliación entre los acebuches que se encuentran en una situación periféricas de los que forman masas lineales, pero los que se encuentran en el interior de las zonas forestales presentan un grado de afectación significativamente inferior.

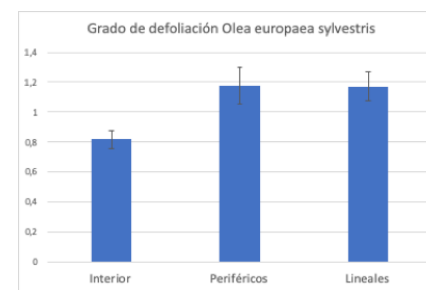


Figura 11. Promedio y error estándar del grado de defoliación de *Olea europea* var. *sylvestris* para las tres zonas estudiadas en función de su posición en la zona forestal.

Por otra parte, ninguna de las muestras que se tomaron de acebuches de las zonas interiores, pese a presentar defoliaciones importantes, dieron un resultado positivo a *X. fastidiosa*. Todas las muestras positivas se encontraron en árboles situados en una posición lineal o periférica. Estos resultados son consistentes con una mayor prevalencia de la patología en árboles que se encuentran en contacto con los campos de cultivo vecinos.

Por otra parte, estos resultados también nos muestran que una fuerte defoliación del acebuche no implica necesariamente una infección por *X. fastidiosa*, sino que hay otras causas que provocan síntomas parecidos.

Conclusiones

X. fastidiosa está afectando a un número significativo de especies de la flora silvestre de las Islas Baleares y está distribuida por la mayor parte de las tres islas principales, salvo la Serra de Tramuntana y, probablemente la península de Andratx. Afortunadamente, ni en Formentera ni en Cabrera se han detectado plantas afectadas. Igualmente, en el interior de las zonas forestales la incidencia de la infección es muy reducida o nula.

Muchos de los arbustos mediterráneos sensibles a esta bacteria son muy frecuentes en nuestra flora: “ullastre”, “romaní”, “estepes”, “ginestes”, “argelagues”, “garlandes”, “tems”, “aladerns”, “llampugols”, etc. se están viendo afectados en diferente grado y extensión. Algunos árboles, igualmente importantes, como *Fraxinus angustifolia* “fleix”, están muriendo en las zonas próximas a la Serra de Tramuntana. Por otra parte, no se puede descartar que algunas de estas especies afectadas estén sufriendo descensos significativos de sus poblaciones, al menos en algunas de las zonas más afectadas, sin que este cambio sea percibido. Es también muy preocupante que se hayan encontrado especies endémicas sensibles a la bacteria. La situación de *Santalina magonica* “cama-mil·la de Maó” en Menorca es particularmente peligrosa, ya que se han encontrado plantas positivas en poblaciones naturales en las cuales se ha observado una fuerte mortalidad. El impacto de esta infección sobre el paisaje es muy notable en algunas zonas de las tres islas principales, debido a la defoliación que provoca en los acebuches. Afortunadamente, las encinas parecen ser resistentes a esta patología.

Se ha detectado una incidencia muy alta de la infección en los ajardinamientos con flora mediterránea, particularmente (pero no solo) en las rotondas de las carreteras. Por lo que es probable que una mala praxis en la jardinería sea una vía de propagación de la enfermedad.

Se ha profundizado más en el estado de las masas forestales de *Olea europea* var. *sylvestris* utilizando diferentes tipos de metodologías (análisis de series de imágenes satelitales, muestreos al azar en zonas forestales, valoración de defoliación dentro de las masas de acebuche y en zonas periféricas). Los resultados muestran que los árboles más afectados se encuentran en contacto con campos de cultivo o zonas abiertas, mientras que los árboles que están en el interior de las masas forestales están poco o nada afectados.

Bibliografía

Di Nisio, A.; Adamo, F.; Acciani, G.; Attivissimo, F (2020) Fast Detection of Olive Trees Affected by *Xylella Fastidiosa* from UAVs Using Multispectral Imaging. *Sensors* 20: 4915. Doi:10.3390/s20174915

EFSA; Delbianco A, Gibin D, Pasinato L, Boscia D, Morelli M (2023) Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2022. *EFSA Journal* 21(1):7726, 90 pp. Doi:10.2903/j.efsa.2023.7726

López Mercadal, J.; Delgado, S.; Mercadal, P.; Seguí, G.; Lalucat, J.; Busquets, A.; Gomila, M.; Lester, K.; Kenyon, D. M.; Ruiz Pérez, M.; Paredes Esquivel, C.; Miranda, MA (2021) Collection of data and information in Balearic Islands on biology of vectors and potential vectors of *Xylella fastidiosa* (GP/EFSA/ALPHA/017/01). EFSA supporting publication: EN-6925. 136 pp. Doi:10.2903/sp.efsa. 2021.EN-6925.

Morelli, M.;García-Madero, J.M.; Jos, Á.; Saldarelli, P.; Dongiovanni, C.; Kovacova, M.; Saponari, M.; Baños Arjona, A.; Hackl, E.; Webb, S.; y col. (2021) *Xylella fastidiosa* in Olive: A Review of Control Attempts and Current Management. *Microorganisms*, 9, 1771. Doi:10.3390/microorganisms9081771

Olmo, D.; Nieto, A.; Borràs, D.; Montesinos, M.; Adrover, F.; Pascual, A.; Gost, P.A.; Quetglas, B.; Urbano, A.; García, J.d.D.; y col. (2021) Landscape Epidemiology of *Xylella fastidiosa* in the Balearic Islands. *Agronomy* 2021, 11, 473. Doi:10.3390/agronomy11030473

4. Insectos vectores de *Xylella fastidiosa* en las islas Baleares: distribución, ciclo, huéspedes vegetales e infectividad

Jordi Sabaté Rabella¹, Miquel Llompart Cifre²

¹IRTA, Intituto de Investigación y Tecnologías Agrarias, Ctra. de Cabrils, Km 2, 08348 Cabrils

²Enginyeria agronòmica i sostenibilitat de sistemes agraris, Departament d'Enginyeria Industrial i Construcció, Universitat de les Illes Balears, 07122 Palma

X. fastidiosa se transmite mediante la propagación vegetativa de material vegetal y de forma natural mediante insectos chupadores de xilema del orden de los hemípteros, en América principalmente de la subfamilia *Cicadellinae* y en Europa de la familia *Aphrophoridae*. La principal especie de insecto transmisora de la enfermedad en los focos europeos es *Philaenus spumarius* seguida de *Neophilaenus campestris*. Ambas especies presentan una generación al año, hibernan en forma de huevo y crecen en primavera como ninfas protegidas por una espuma acuosa sobre plantas herbáceas. *P. spumarius* tiene un rango muy amplio de huéspedes alternando plantas herbáceas en primavera/otoño y leñosas en verano, mayoritariamente fuera de los cultivos y con una gran movilidad (Cavaliere y col., 2018).

Actualmente no se dispone de un tratamiento curativo directo sobre la bacteria, siendo las estrategias indirectas las mejores alternativas de lucha. Las principales herramientas de lucha contra la enfermedad y sus pérdidas son la tolerancia/resistencia en las distintas variedades y/o especies y la prevención de la infección. La disminución de la diseminación de la bacteria se puede conseguir incidiendo simultáneamente en factores, la eliminación de inóculo (plantas infectadas) y el control de las poblaciones de insectos vectores. La reducción de inóculo, tanto en las plantaciones como en la vegetación silvestre, disminuye la capacidad

infectiva de los vectores independientemente de su dinámica poblacional y abundancia. Si esta capacidad infectiva menor se combina con la reducción de las poblaciones de los vectores y su menor acceso a los cultivos, se produce un efecto sinérgico en la disminución de la dispersión de la enfermedad. El control de las poblaciones de vectores se puede establecer por diferentes vías: limitando las plantas huésped y ambientes favorables al vector con el manejo de cubiertas y márgenes, tratando directamente con insecticidas y con control biológico mediante depredadores, parasitoides y agentes patógenos para insectos (EPPO 2019).

Se calcula que durante los últimos años en la isla de Mallorca donde conviven las subespecies *fastidiosa* y *multiplex*, se puede haber perdido hasta un 80 % de la producción de almendra, especialmente en secano. También se han visto muy afectados las higueras y los viñedos especialmente en las zonas de la isla donde la subespecie *fastidiosa* está presente. *X. fastidiosa* también infecta gravemente al acebuche, sobre todo en Mallorca y Menorca, donde es la especie forestal dominante en muchas zonas y cuya afectación daña gravemente al paisaje y la biodiversidad. Otro daño importante de *X. fastidiosa* a la biodiversidad es la infección y muerte de especies vegetales endémicas, ya de por sí muy amenazadas por otros factores.

Con el objetivo último de controlar y entender los mecanismos de dispersión de la bacteria en las Islas Baleares, se han estudiado diversos aspectos de sus vectores para profundizar en el conocimiento de la biología, el ciclo, los huéspedes y su comportamiento en las diferentes islas a través de 3 sub-objetivos:

1. Estudio de la biología, ecología, dinámica y fauna útil asociada a las potenciales especies transmisoras de *X. fastidiosa* en diversos cultivos y condiciones.
2. Evaluación del potencial de adquisición por especies de insectos. Correlación entre capturas, incidencia, huéspedes y subespecies.
3. Eficiencia de transmisión/competencia vectorial y estudio de estrategias de control y transferencia

A través del lote 4 de la licitación del Gobierno Balear para el estudio de *X. fastidiosa* en el archipiélago, los trabajos han sido llevados a cabo por entomólogos y patólogos vegetales del IRTA (Cabriils) en colaboración con la Consejería de Agricultura, el Laboratorio de Sanidad Vegetal de les illes Balears y los participantes en otros lotes de la licitación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de parcelas, captura de insectos e identificación

En colaboración con la Consejería de Agricultura de Baleares, Consejos Insulares, técnicos y productores, se eligieron parcelas representativas de los principales cultivos susceptibles, manejos y agroecosistemas en cada una de las cuatro islas, incluyendo Formentera, donde hasta el momento no se ha detectado la enfermedad. Durante los dos primeros meses del proyecto se prospectaron las poblaciones de ninfas y adultos de afrofóridos en diferentes parcelas de olivo, vid, almendro y cítricos, parcelas que, en función de las capturas, continuaron o no, siendo estudiadas durante el resto del estudio (2019-2021).

En Mallorca se muestrearon quincenalmente de abril a diciembre 8 parcelas repartidas por toda la isla junto con sus cultivos vecinos y márgenes. Se eligieron parcelas con una elevada incidencia de la enfermedad, evidencias de transmisión activa y manejos representativos (laboreo/cubierta, eco/convencional, secano/regadío), principalmente de vid y almendro rodeadas de lindes con acebuchales, algarrobos y lentisco. En Ibiza, Formentera y Menorca se realizaron cuatro prospecciones al año distribuidas geográficamente y por cultivos para representar los ambientes de cada isla, con el objetivo de caracterizar las especies de afrofóridos, el rango de huéspedes vegetales en cada momento y su porcentaje de infección (Figura 1).

Se capturaron los insectos presentes en el cultivo, su cubierta herbácea, márgenes y parcelas colindantes incluyendo herbáceas y leñosas, mediante aspiración (vid y herbáceas) o manguero (olivo, almendro, acebuche, lentisco algarrobo y otras leñosas) (Figura 2). Con el objetivo de poder comparar entre diferentes métodos de captura, especies vegetales y sistemas de formación, se referenciaron las capturas en m² de copa, cubierta, seto o cordón en función de la forma de la especie de planta a muestrear. Como estándar se muestrearon 40 m² por huésped/parcela en puntos repartidos aleatoriamente; si el huésped vegetal era poco abundante (menos de 40 m²) se muestreaban todos los individuos presentes. Como ejemplo, la vid en cordón se muestreaba en unidades de 10 cepas (1m alto espaldera x 10 m lineales = 10 m²) en 4 líneas de captura (40 m²). El Muestreo se realizó en diagonal alternando las dos orientaciones del cordón. En huéspedes silvestres, normalmente con forma de seto (lentisco, acebuche), la unidad de muestreo 2x2 (alto/ancho), 4 m² que por 10 puntos de muestreo sumaban 40 m² por parcela y huésped.

Las bolsas de captura se congelaron, se seleccionaron las especies de insectos interesantes y se limpiaron de restos vegetales. Las especies se identificaron bajo lupa binocular siguiendo las claves de Hodkinson & White, 1979 para psílidos, Ribaut, 1952 y Della Giustina, 1989 para cicadélidos y Holzinger y col., 2003 para afrofóridos, cíxidos, delfácidos y otras familias de *Auchenorrhyncha*. Los insectos fueron congelados de nuevo hasta la extracción de su ADN.

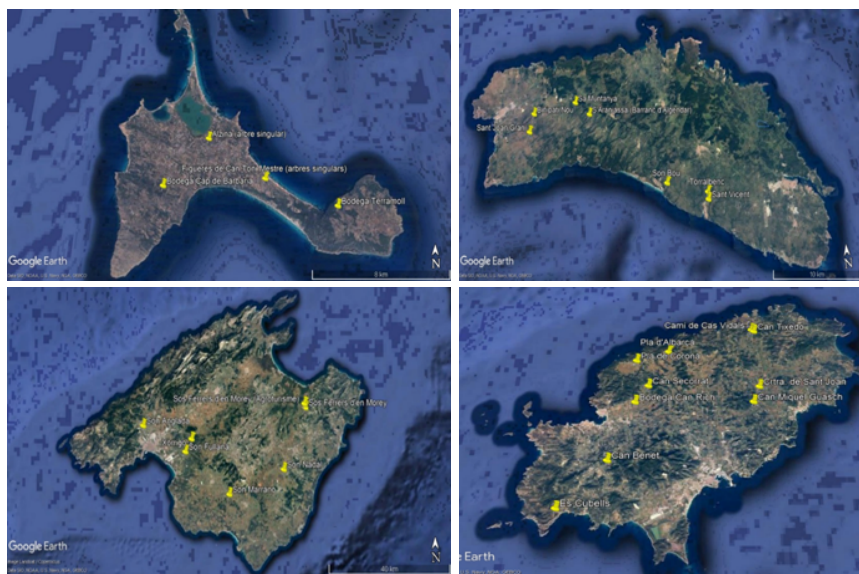


Figura 1. Puntos muestreados en las 4 Islas Baleares.



Figura 2. Parcela de vid en Felanitx representativa de la Isla de Mallorca, cercada por almendros y acebuches con síntomas, lentiscos sanos y pastos.

Extracción de ADN y detección de *X. fastidiosa* por qPCR.

Se purificó individualmente el ADN de las cabezas diseccionadas de los insectos, que fueron trituradas con bolas de tungsteno. Se desecharon los abdómenes y se extrajo el ADN mediante el procedimiento del Ctab/Cloroformo, todo ello siguiendo protocolos estandarizados. Se analizaron plantas de los cultivos afectados y de las lindes para confirmar la enfermedad y determinar sus huéspedes salvajes; se extrajeron mediante el mismo procedimiento Ctab/Cloroformo adaptado para plantas (EPPO 2019). El ADN obtenido de las cabezas de los insectos fue sometido a 3 procedimientos de qPCR con moldes sobre genes distintos para determinar con mayor precisión los insectos positivos y evaluar las capacidades de detección de cada método para insectos infectivos de campo. Se utilizaron 3 métodos EPPO (2019), dos métodos basados en sondas Taqman (Harper y col., (2010) & Erratum (2013) y Li y col., (2013)) y Francis y col., (2006) basado en Sybr. Los insectos de la Isla de Mallorca, donde conviven dos subespecies, también fueron analizados a nivel subespecie mediante qPCR multiplex con sondas Taqman siguiendo Dupas y col., 2019. Se utilizaron como controles positivos extractos de ADN de las tres subespecies aisladas y cultivadas en las mismas islas Baleares.

RESULTADOS Y DISCUSION

Durante los 3 años del estudio se analizaron casi 5000 de los insectos capturados de forma individual, la gran mayoría de ellos de la familia de los Afrofóridos, demostrados como vectores en todos los focos de Europa. Las capturas de afrofóridos fueron muy contrastadas, entre años, parcelas y huéspedes. Las capturas en un año lluvioso como 2020 fueron casi 4 veces superiores a las de un año seco como 2021. Los resultados indican que la especie vectora más abundante y ubicua fue *Philaenus spumarius* con unos 4000 insectos capturados y analizados, con un porcentaje total de positivos de aproximadamente del 10% (406 positivos de 4058 individuos). También se capturaron un total de 300 individuos de *Neophilaenus campestris* de los cuales solo un 2% fueron positivos (7+/301) Ambas especies fueron capturadas en las cuatro islas en proporciones y huéspedes similares. No se capturó ninguna otra especie de afrofórido de las presentes en la península, *Philaenus spp.*, *Neophilanus spp.* o *Lepyronia colepotrata*. Entre las especies de cicadelas floémofagas analizadas, los porcentajes de positivos fueron extremadamente bajos: *Agallia sp.* 0+/52, *Aphrodes sp.* 0+/9, *Thamnotettix sp.* 1+/34 *Cicadula sp.* 0+/9 *Euscelis sp.* 0+/7 *Hyalesthes sp.* 4+/202, *Hysteropterum grylloides* 0+/45 (Figura 3). Ninguno de los pocos positivos entre las especies

floémofagas ha presentado una señal por debajo de los 32 ciclos, es decir eran todos positivos flojos.



Figura 3. De arriba abajo y de izquierda a derecha: *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus campestris*, *Hyalesthes obsoleteus* y *Aphrodes sp.*

En la isla de Menorca se muestrearon básicamente acebuchales en aclareo y prados secos y de pasto representativos de la mayor parte de la isla. se capturaron 388 individuos de *P. spumarius* (46+/388=12%) y 24 *N. campestris* 3+/24=12%. Otra especie remarcable en capturas fue *Hyalesthes sp.*, normalmente ligado a acebuche como en la isla de Mallorca.

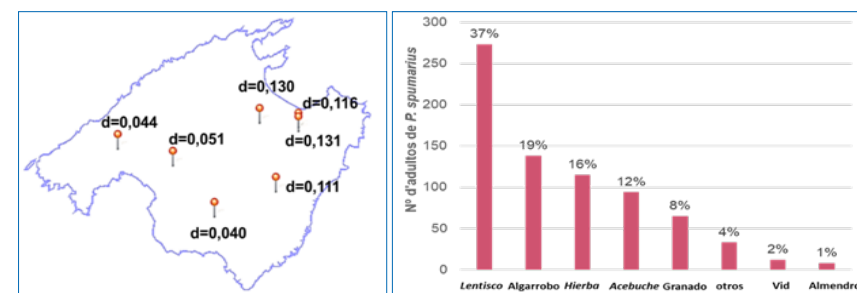
Más de la mitad de las capturas totales de *P. spumarius* se realizaron en las islas Pitiusas: Ibiza (73+/1885=4%) y Formentera (0+/415) donde también se capturaron *N. campestris* (2+/183 y 0+/63) respectivamente. En Ibiza las capturas de adultos sobre herbáceas se concentran hasta principios de junio y a partir de octubre, principalmente en parcelas almendro y olivo manejados con cubiertas herbosas. El paso a adulto de las ninfas y el salto de estos a leñosas es muy variable entre años y en menor medida entre parcelas, y parece ligado a la temperatura de la primavera y al vigor de las hierbas de la cubierta. Las capturas sobre leñosas se concentran en el periodo estival, coincidiendo con el secado genera-

lizado de la vegetación herbácea a partir de junio. Los vectores concentran en 4 especies: almendro, sabina, pino y lentisco. En almendro las capturas se dan al principio del salto en junio y caen drásticamente en julio y en agosto. Los almendros en Ibiza presentan la particularidad que pierden la hoja en verano y vuelven a brotar con la llegada de las lluvias, comportándose a la práctica como un doble caducifolio en invierno y verano, hecho que seguramente condiciona las nulas capturas de *P. spumarius* en verano comparadas con otras leñosas. Hay que destacar que los *P. spumarius* capturados sobre almendro en junio presentan el porcentaje de portadores de *X. fastidiosa* por huéspedes vegetales más elevado de todo el estudio en Ibiza, aproximadamente del 15% (22+/156) pese a ser a principio de estación y tener menos tiempo de adquisición y multiplicación de la bacteria. En julio y agosto las capturas se trasladan a sabina 0% (0+/57), lentisco 8% (12+/154) y sobre todo pino 2% (5+/252). Llama la atención las diferencias en porcentajes de positivos entre huéspedes, muy bajos en pino y sabina y relativamente altos en lentisco. Estos resultados son coherentes con la susceptibilidad de las especies vegetales a *X. fastidiosa*, pino y sabina no son huéspedes y por tanto la infección de los vectores se tiene que haber dado previamente en otras plantas, y el almendro sí está mayoritariamente infectado y por tanto los insectos capturados en él tienen muchas oportunidades de adquisición. El caso del lentisco no es tan coherente, ya que no se ha detectado la bacteria en esta especie. En el caso de Ibiza es muy curioso el bajísimo número de capturas en olivo en parcelas donde los árboles están enfermos y dónde *P. spumarius* ha sido capturado abundantemente en la hierba de su cubierta.

X. fastidiosa no ha sido detectada hasta el momento en Formentera en plantas, hecho que cuadra con los resultados de las analíticas de los vectores, ya que no se ha encontrado la bacteria en ninguno de los 510 *P. spumarius* y los 75 *N. campestris* capturados durante los 3 años. El número de insectos capturados es alto para una isla donde no se tenía clara la presencia de afrofóridos, y por tanto, su negatividad es significativa, corroborando la no detección de la bacteria en planta hasta el momento. Hay que destacar el elevado número de *P. spumarius* capturados en un solo muestreo, más de 200 capturados en un viñedo en La Mola (junio de 2020), muy probablemente por un fenómeno de agregación por la falta de vegetación arbórea en la zona, que hace que se concentren en sobre vid en el inicio de sus movimientos hacia leñosas.

En Mallorca, los niveles poblacionales de *P. spumarius* han presentado

diferencias significativas entre las parcelas, siendo las poblaciones casi 3 veces más altas en el noreste de la isla (Manacor y Santa Margalida) que en la zona suroeste (Palma y Llucmajor), siguiendo un gradiente con Felanitx como punto intermedio con 0,111 individuos capturados por m² (Figura 4). Este hecho puede ser explicado por los distintos paisajes agrarios, pluviometrías y vegetación dominante en las dos zonas. La zona noreste se caracteriza por parcelas rodeadas de acebuchales, almendros y lentiscos como cerramientos y con mucho aprovechamiento de pastos y algarrobos. En la zona sur, por su menor pluviometría y el laboreo, hay menos hierba en general para hospedar a las ninfas, y en las lindes también hay acebuches, pero con más presencia de pinos y sabinas. Muy probablemente, estas mayores poblaciones de vectores en el norte, tengan una clara influencia en una mayor severidad e incidencia de la enfermedad, sin olvidar la dominancia de las subespecies dentro de la isla.



Figuras 4 y 5. Abundancia de *P. spumarius* en Mallorca (d= densidad de población de *P. spumarius* (individuos capturados/m²) y capturas de *P. spumarius* por huésped en Mallorca.

En general los niveles más elevados de capturas de afrofóridos por muestreo se han producido sobre herbáceas en primavera. A partir de mediados de junio las capturas se reparten entre las leñosas hasta bien entrado septiembre, cuando se concentran en las herbáceas de nuevo para la puesta. Las capturas disminuyeron drásticamente en noviembre, pero con algunos individuos sobreviviendo hasta enero (Figura 6).

El huésped vegetal con más capturas fue el lentisco, seguido del algarrobo, el aceбуche y el granado, todos ellos en las lindes. El número de individuos de *P. spumarius* capturados sobre los cultivos de almendra o vid fue inferior al 5% del total, confirmando que los cultivos no son su huésped principal, aunque los visiten en sus movimientos entre plantas leñosas (Figuras 5 y 6).

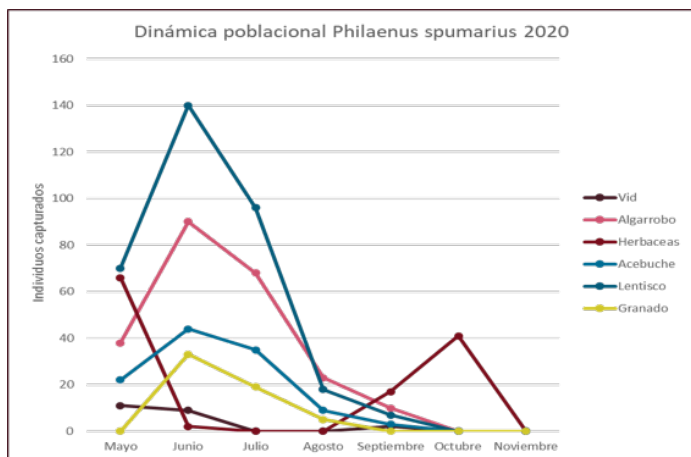
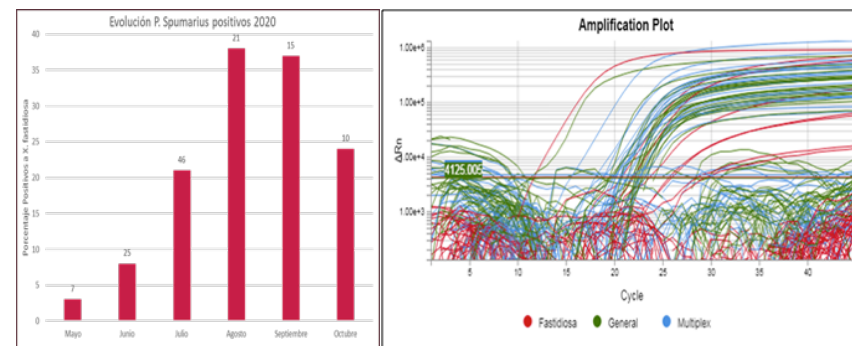


Figura 6. Capturas de *P. spumarius* por huéspedes en Mallorca.

La positividad a *X. fastidiosa* de los *P. spumarius* capturados en Mallorca creció de un 2,5% en mayo hasta un máximo en agosto del 35% de individuos positivos, decreciendo suavemente hasta el fin de ciclo, evolución lógica en una bacteria con modo de transmisión persistente como *X. fastidiosa* (Fig.7). Dada la poca repetitividad y especificidad de los insectos positivos por encima de 35 ciclos de amplificación por qPCR, no se han considerado tales como positivos en el análisis con fines epidemiológicos (Figura 8). Las muestras por encima de 35 ciclos presentaron una repetitividad inferior al 50% entre los tres métodos, mientras que por debajo (mayor concentración de ADN de *X. fastidiosa*) fue prácticamente del 85%, coincidiendo además con temperaturas de melting inestables por encima de 35 ciclos en el método con Sybr. Muy probablemente estos positivos lejanos puedan representar alimentaciones recientes de plantas infectadas o inespecificidades con otras bacterias, pero en ambos casos la capacidad de transmisión de estos insectos sería probablemente muy baja.



Figuras 7 y 8. Evolución de insectos positivos a *X. fastidiosa* en Mallorca y multiplex qPCR para detección de subespecies.

Si no solo tenemos en cuenta el porcentaje de positivos, sino también el tamaño de la población de *P. spumarius*, la máxima concentración individuos infectivos se da en lentisco y en acebuche en el mes de julio con un pico secundario en octubre sobre herbáceas (Figura 9).

La relación entre la subespecie de la bacteria detectada en los insectos y la de su planta de captura no ha sido tan alta como cabría esperar, con muchos insectos capturados sobre olivo con la subespecie fastidiosa y algunos sobre vid con la subespecie multiplex. También se han detectado individuos positivos a las dos cepas, coinfectados. Este hecho indica que la movilidad entre huéspedes es alta i que la adquisición puede no ser un evento reciente. Llama la atención que lentisco y algarrobo, plantas en las que no se ha confirmado la infección por la bacteria, presenten porcentajes de positivos parecidos a los de plantas huésped como el acebuche, y confirma la gran movilidad de estos insectos y la persistencia de su adquisición, ya que la bacteria se habría adquirido en otro huésped.

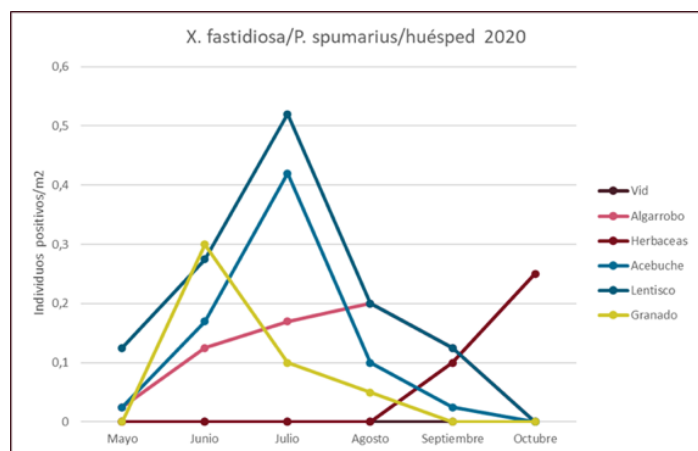


Figura 9. Evolución de insectos infectivos por huéspedes y superficie.

En las parcelas de vid estudiadas donde conviven las dos subespecies: acebuche/*multiplex*, vid/*fastidiosa*, almendro/ambas, se ha constatado un descenso significativo en los insectos infectados por la subespecie *fastidiosa* entre el año 2019 y 2021. Este hecho, probablemente sea atribuible a la muerte y tala de los almendros infectados y al arranque de vides infectadas, y abre una vía de convivencia con la enfermedad en los viñedos. Con el control del inóculo se frena la transmisión y dispersión de la única subespecie de la bacteria que puede afectar la vid, aunque habría que continuar alerta como ocurre con todas las enfermedades endémicas, ya que una desaparición total del inóculo o de los vectores es poco factible. El control de la subespecie *multiplex* por esta vía probablemente se más complicado ya que su más amplio rango de huéspedes y la abundancia del acebuche, junto con la menor severidad de la enfermedad, hacen que sea una fuente de inóculo mayor, más estable y difícil de reducir.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que una estrategia de control basada solamente en el control químico de vectores sobre el cultivo no sería muy efectiva para evitar unas pocas picadas de un vector visitante, muy móvil y ya infectivo.

Con lo que conocemos del ciclo de *P. spumarius* y la enfermedad en Balears, se propone como estrategia el control de puestas, ninfas y adultos remigrantes mediante “push & pull” o concentración y escape, adaptadas a las circunstancias del cultivo, manejo y parcela. Un ejemplo sería sembrar tempranamente franjas de herbáceas para que cuando los vec-

tores adultos retornen a poner los huevos lo hagan lejos del cultivo y en un lugar susceptible de ser labrado o tratado para eliminar los huevos en otoño o las ninfas en primavera. También se puede hacer una siembra de cubierta tardía (noviembre/diciembre) que escape a la puesta. Acciones como estas adaptadas a cada parcela, junto con el control del inóculo, pueden permitir una convivencia productiva con la enfermedad, incluso en manejos sin aplicación de insecticidas.

Bibliografía

CAVALIERI, V., DONGIOVANNI, F., TAURO, D., ALTAMURA, G., DI CAROLO, M., FUMAROLA, G., SAPONARI M., BOSCO D (2018) Transmission of the CoDiRO strain of *Xylella fastidiosa* by different insect species. Proceedings of the XI European Congress of Entomology (ECE 2018), Naples, 2-6 July 2018.

DELLA GIUSTINA, W (1989) Homoptères Cicadellidae (supplément). Faune de France 73; 350 p.

DUPAS, E., BRIAND, M., JACQUES, M.A., CESBRON, S (2019) Novel Tetraplex Quantitative PCR Assays for Simultaneous Detection and Identification of *Xylella fastidiosa* Subspecies in Plant Tissues. Front Plant Sci 2019 Dec 27;10:1732. doi: 10.3389/fpls.2019.01732.

EFSA (2022). «Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2022». EFSA Journal, núm. 21(1), article e07726.

EPPO (2019). PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. EPPO Bulletin, núm. 49(2), p. 175-227.

FRANCIS, M., LIN, H., ROSA, J. C. LA, DODDAPANENI, H., & CIVEROLO, E. L (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. European Journal of Plant Pathology, 115(2). <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9009-4>

HARPER, WARD, L. I., & CLOVER, G. R. G (2010) Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. Phytopathology, 100(12). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-10-0168>

HODKINSON ID, WHITE IM, (1979) Homoptera. Psylloidea. Ed. Royal Entomological Society of London.

HOLZINGER, W.E., KAMMERLANDER, I., NICKEL, H (2003) The Auchenorrhyncha of central Europe. Ed. Brill, Boston.

LI, W., TEIXEIRA, D. C., HARTUNG, J. S., HUANG, Q., DUAN, Y., ZHOU, L., CHEN, J., LIN, H., LOPES, S., AYRES, A. J., & LEVY, L. (2013) Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Journal of Microbiological Methods*, 92(1)

RIBAUT, H. (1952) Homopteres Auchenorrhynches I & II. Ed. Paul Lechevalier, Paris

SAPONARI, M., LOCONSOLE, G., 1 CORNARA, D., YOKOMI, R.D., DE STRADIS, A., BOSCIA, D., BOSCO, D., MARTELLI, G.P., KRUGNER, R., PORCELLI, F. (2014) Infectivity and Transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *J. Econ. Entomol.* 107(4): 1316-1319 (2014); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EC14142>

5. Puesta a punto de un sistema de detección de la incidencia de *Xylella fastidiosa* en el cultivo del almendro mediante imágenes aéreas en la isla de Mallorca

Juan A. Navas-Cortés¹, Miguel Román¹, José L. Trapero Casas¹, Guillermo León Roperó¹, Miguel Montes Borrego¹, Manuel Anguita-Maeso¹, Concepción Olivares García¹, María Pilar Velasco Amo¹, Blanca B. Landa¹, Tomás Poblete², Carlos Camino³, Victoria González-Dugo¹, Rocío Calderón⁴, Alberto Hornero^{1,5}, Rocío Hernández-Clemente⁵, Pieter S.A. Beck³, Pablo J. Zarco-Tejada^{1,2}

¹Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Av. Menéndez Pidal S/N. Campus Alameda del Obispo, 14004 Córdoba, España.

²School of Agriculture and Food (SAF-FVAS) and Faculty of Engineering and Information Technology (IE-FEIT), University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia.

³European Commission, Joint Research Centre (JRC), Ispra, Italy.

⁴Plant Pathology and Plant-Microbe Biology Section, School of Integrative Plant Science, Cornell AgriTech, Cornell University, Geneva, NY, USA.

⁵Department of Geography, Swansea University, Swansea SA2 8PP, UK.

1. ANTECEDENTES

El presente proyecto ha sido llevado a cabo por el Laboratorio de Epidemiología y Control integrado de enfermedades, el Laboratorio de Métodos Cuantitativos de Teledetección (QuantaLab) y el Laboratorio de Biología y Ecología de la Microbiota del suelo del Instituto de Agricul-

tura Sostenible (IAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El objetivo de este Proyecto fue desarrollar un sistema de detección temprana de *Xylella fastidiosa* en almendros mediante imágenes aéreas de alta resolución en la isla de Mallorca utilizando métodos basados en algoritmos de clasificación y aprendizaje automático y cuantificación de rasgos espectrales de banda estrecha relacionados con la fisiología a nivel de árbol, índices espectrales, índices térmicos, fluorescencia cloroflica inducida por el sol (SIF) y eficiencia de fluorescencia (Fi).

2. METODOLOGÍA

2.1. Parcelas experimentales

El estudio se ha llevado a cabo en una selección de 18 parcelas comerciales de almendro en la isla de Mallorca en tres campañas entre 2019 y 2022. Estas parcelas incluyeron diversas variedades de almendro (ej., Marinada, Marta, Soleta, Vairo), edades del cultivo, y regímenes hídricos (12 en regadío y 6 en cultivo tradicional de secano) (Figura 1A). Las parcelas se localizaron en los términos municipales de Binissalem (P8), Consell (P7A, P7B, P9), Felanitx (P20, P21), Lluçmajor (P11, P12, P13, P14), Marratxi (P4, P16), Puigpunyent (P1, P10, P15), Santa María del Camí (P3), y Vilafranca de Bonany (P22 y P23). Cada año se han llevado a cabo varias campañas de campo y una aérea (exceptuando 2020 en que fue suspendida debida a la incidencia de COVID19).

2.2. Evaluación de síntomas de Chamuscado foliar en parcelas de almendro

En cada año y campaña se llevaron a cabo las siguiente actividades: (i) evaluación de la incidencia (porcentaje de árboles enfermos) y severidad de síntomas visuales de Chamuscado foliar característicos de los causados por *X. fastidiosa* en almendro utilizando en una escala de evaluación de 0 a 5 según el porcentaje de dosel afectado por los síntomas de la enfermedad; 0 indica la ausencia visual de síntomas detectables (asintomáticos), 1: $>0 \leq 25\%$, 2: $>25 \leq 50\%$, 3: $>50 \leq 75\%$ y 4 donde la totalidad de la copa presenta síntomas de la enfermedad y 5 es árbol muerto (Figura 1B).

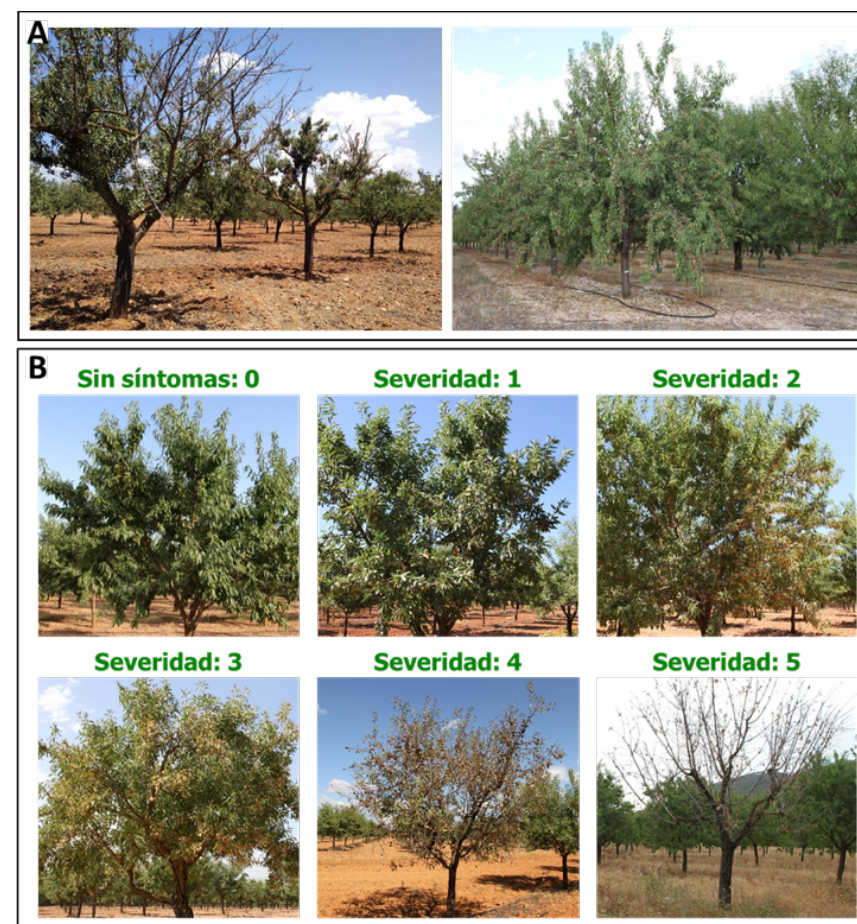


Figura 1. (A) Imagen de parcelas de almendro en régimen de secano (izquierda) y secano (derecha) seleccionadas para el estudio en la isla de Mallorca. (B) Escala de severidad de síntomas de Chamuscado foliar causado por *Xylella fastidiosa* en almendro, donde 0: árboles asintomáticos, y 1: $>0 \leq 25\%$, 2: $>25 \leq 50\%$, 3: $>50 \leq 75\%$; 4 $>75\%$ de la copa muestra síntomas de la enfermedad y 5 es árbol muerto.

2.3. Medidas fisiológicas en árboles asintomáticos o afectados por Chamuscado foliar mediante sensores próximos

Se realizaron medidas fisiológicas en ramas seleccionadas de árboles asintomáticos y sintomáticos en las que se midieron hojas asintomáticas y sintomáticas utilizando sensores próximos que incluyeron:

(i) Dualex 4 (Force-A, Orsay, France) para la estimación del contenido de clorofila, flavonoides y antocianos, así como un índice de balance de nitrógeno (NBI); (ii) PolyPen RP410-UVIS y Polypen RP410-NIR (Photon Systems Instruments, Brno, República Checa) que estima la reflectancia espectral de la hoja el espectro electromagnético entre 380 y 790 nm y entre 640 y 1050 nm, respectivamente, que permiten la estimación de índices de vegetación y (iii) FluorPen FP110 (Photon Systems Instruments, Brno, República Checa) es un fluorómetro que permite la medición de fluorescencia clorofílica. Todas las ramas medidas se muestrearon para determinar su infección *X. fastidiosa* utilizando los métodos moleculares descritos en la sección 2.4.

A partir de los valores de reflectancia obtenidos con los dos sensores PolyPen se calcularon 70 índices de vegetación. Estos índices estiman una serie de parámetros fisiológicos de la planta relacionados con el contenido de clorofila, carotenoides y flavonoides, índices de relación de los valores del espectro visible azul, verde y rojo, fluorescencia de la clorofila, así como otros índices indicadores de estrés en plantas. Con objeto de establecer la posible relación entre los índices de vegetación con la infección por *X. fastidiosa* y su capacidad para discriminar plantas infectadas de plantas sanas no infectadas, se han llevado a cabo análisis multivariantes que incluyeron: (i) análisis de agrupación jerárquica basada en la matriz de correlación de Spearman usando el método de agrupación de Ward, que incluye los 70 índices fisiológicos calculados, junto con los parámetros obtenidos de los sensores Dualex y Fluorpen. Este análisis permite analizar la respuesta global de los distintos grupos de hojas con síntomas y sin síntomas que se han muestreado, tanto en árboles de secano como regadío, y establecer posibles similitudes o diferencias entre los distintos grupos, y (ii) análisis canónico discriminante, que permite determinar la precisión de la clasificación del conjunto de índices de vegetación en función de, en primer lugar si son árboles estaban infectados o no por *X. fastidiosa*, y en segundo lugar, aquellas hojas asintomáticas de una rama infectada diagnosticada como positiva en el análisis molecular para *X. fastidiosa*, seleccionando aquellos índices que permiten discriminar entre ellos, tanto en secano como en regadío.

2.4. Detección de *Xylella fastidiosa* en ramas asintomáticas y sintomáticas afectadas por *Chamuscado foliar* mediante análisis molecular

En cada fecha de evaluación de síntomas se han tomado muestras de ramas de árboles asintomáticos o con diferentes niveles de severidad de síntomas de aproximadamente un 10% del conjunto de ár-

boles para determinar la infección por *X. fastidiosa* mediante métodos moleculares de análisis de ADN basadas en PCR que incluyeron: (i) Harper-qPCR que permite no sólo la detección de la bacteria sino también su cuantificación (Harper y col., 2010; erratum, 2013); (ii) duplex qPCR que utiliza cebadores de la qPCR de Harper y Ouyang (Bonants y col., 2019); y (iii) AmplifyRP® XRT+, que utiliza la amplificación isotérmica de la recombinasa polimerasa (RPA) (Kersting y col., 2014), fundamentado en el protocolo de Li y col., (2016). Las muestras se han analizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares adjudicatario del Lote 2, así como en el Laboratorio Biología y Ecología de la Microbiota del suelo del IAS-CSIC o en el laboratorio del IRFAP durante la misma semana de muestreo en la campaña de 2019 y 2022. La correspondencia entre la presencia de síntomas visuales e infección por *X. fastidiosa* alcanzó una precisión global superior al 90% lo que garantiza su utilización como base de datos para la calibración de las medidas con sensores próximos e imágenes aéreas.

2.5. Imágenes aéreas

Para la toma de imágenes aéreas en la primera semana del mes de julio de 2019, 2021 y 2022 se sobrevolaron varias comarcas de la isla de Mallorca utilizando diversos sensores aerotransportados en un vehículo tripulado que incluyeron: (i) sensor Micro hiperespectral (Micro-Hyperspec VNIR modelo, Headwall Photonics, Fitchburg, MA, USA), que cubre la región espectral del visible y del infrarrojo cercano (400 y 885 nm) con una resolución espacial < 25 cm. La cámara hiperespectral adquiere imágenes con 260 bandas espectrales adquiridas a 1,85 nm/píxel y con una resolución radiométrica de 12 bits, un ancho de banda de 6,4 nm (FWHM) y una rendija de 25µ en la región 400–885 nm. (ii) sensor Micro-Hyperspec NIR-100 (Headwall Photonics) con una configuración de 165 bandas espectrales situadas en la región espectral de 950-1750 nm, a una resolución radiométrica de 16 bits y un FWHM de 6.05 nm con una resolución espacial < 60 cm. (iii) sensor térmico (FLIR SC655, FLIR Systems, Wilsonville, USA) con una respuesta espectral situado en el rango de 7.5 a 13 µm, una resolución de 640×480 píxeles con una distancia focal de 13,1 mm, resolución radiométrica de 16 bits y con una resolución espacial < 40cm. Las imágenes se tomaron a 500 m de altitud sobre el nivel del suelo.

Las imágenes hiperespectrales y térmicas se procesaron y corrigieron radiométrica y espectralmente, siguiendo la metodología propuesta en Zarco-Tejada y col., (2016) y Camino y col., (2018). La orto-rec-

tificación de las imágenes hiperespectrales se realizó con datos GPS adquiridos con una unidad de medición inercial (IMU) instalada a bordo y sincronizada con los sensores hiperespectrales y el sensor térmico. Para la identificación de árboles individuales en las imágenes hiperespectral y térmico se utilizaron métodos de detección y segmentación de copas basadas en objetos (Calderón y col., 2013). Para ello se utilizaron métodos de segmentación (Niblack, 1986; Sauvola y Pietikäinen, 2000) que permitieron el aislamiento de las copas de los árboles del suelo y las sombras. Además, la segmentación de cada copa de árbol se evaluó visualmente para garantizar un mínimo número de píxeles de vegetación pura dentro de cada copa de árbol, así como espectralmente para evaluar la pureza de la reflectancia extraída de la corona para evitar la mezcla espectral con el suelo, las sombras y los componentes de fondo (Zarco-Tejada y col., 2018; Poblete y col., 2020). Finalmente, para los píxeles seleccionados en cada copa se calcularon la radiancia hiperespectral media, la reflectancia y la temperatura.

2.6. Relación entre observaciones de incidencia y severidad de Chamuscado foliar y datos extraídos de imágenes aéreas multiespectrales y térmicas

Los datos obtenidos en las campañas de evaluación visual de incidencia y severidad de síntomas foliares, así como los obtenidos con los diversos sensores aerotransportados se han analizado utilizando un esquema integrado multicapa de rasgos funcionales relacionados con la infección por *X. fastidiosa*, calculados a partir de la inversión de modelos de transferencia radiativa (PROSAIL; Jacquemoud y Baret, 1990; Verhoef, 1984), emisión de fluorescencia (3D-FluorFLIGHT; (Hernández-Clemente y col., 2017) y características fisiológicas, como el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, la degradación de clorofila a través de la feofitización, conductancia estomática y las alteraciones de la transpiración estimados a partir de índices espectrales y térmicos. Para ello, se ha desarrollado un marco operativo de aprendizaje automático (Machine learning, ML) para detectar la detección de árboles infectados por *X. fastidiosa* en parcelas de almendro con dos regímenes de riego. El procedimiento desarrollado, combina cuatro etapas de ML: (i) segmentación individual de copas de los árboles; (ii) Determinación de V_{max} (tasa máxima de carboxilación, como proxy de la actividad fotosintética) y extracción de rasgos de vegetación utilizando modelos biofísicos; (iii) Estimación de Nitrógeno total; y (iv) generación de un ML parsimonioso para la detección de árboles infectados por *X.*

fastidiosa. Este marco operativo de ML se implementó en Python 3.6 y en el software R (R Core Team, 2020).

3. RESULTADOS

3.1. Detección de *Xylella fastidiosa* en árboles asintomáticos o afectados por Chamuscado foliar mediante sensores próximos.

En la Figura 2 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de agrupación jerárquica, utilizando los 75 índices de vegetación calculados a partir de los valores de reflectancia, en el que se pudieron distinguir tres grupos claramente diferenciados. Por un lado, se agruparon las hojas con síntomas de Chamuscado foliar, independientemente de si la parcela es en régimen de secano o regadío. Por el otro, podemos distinguir dos grupos de hojas sin síntomas, uno correspondiente a las hojas en árboles en parcelas en secano y otro aquellas en árboles en regadío (Figura 2A). Dentro de cada grupo en función del sistema de manejo, se pueden diferenciar las hojas asintomáticas de árboles sanos no infectados de aquellas también asintomáticas pero medidas en ramas que si muestran síntomas. Estos resultados indican como las hojas en árboles sanos tienen un perfil espectral diferencial respecto al de hojas asintomáticas pero en árboles afectados por la enfermedad (Figura 2A). Asimismo, las diferencias observadas se demuestran en los perfiles espectrales claramente diferenciables en función de estos mismos grupos de hojas (hojas asintomáticas y hojas infectadas con y sin síntomas), en particular en la región espectral entre 500 y 575 nm y entre 850 y 950 nm (Figura 2B).

Por otro lado, los resultados del análisis canónico discriminante se presentan en la Figura 2C. En este análisis de los 75 índices de vegetación se pudieron seleccionar 12 y 21 índices en árboles en secano y regadío, respectivamente. Estos índices permiten discriminar entre los distintos tipos de hojas, i.e., sintomáticas y asintomáticas. Así, las hojas en el estudio se pudieron clasificar en cuatro grupos: 1) hojas de árboles sanos sin síntomas; 2) hojas asintomáticas de ramas sin síntomas en árboles afectados por la enfermedad; 3) hojas sin síntomas tomadas de ramas con síntomas de la enfermedad; 4) hojas con síntomas. La mayor distancia entre estos grupos se observó entre los grupos 1 y 4 formados por hojas de árboles sanos de aquellas con síntomas de la enfermedad, respectivamente. No obstante, existió algún solapamiento entre los grupos 2 y 3 que en ambos casos estuvieron constituidos por hojas tomadas de árboles afectados por la enfermedad, bien en ramas sin síntomas

(grupo 2) o en ramas con síntomas (grupo 3) (Figuras 2C-D). Entre los índices que más contribuyeron a la discriminación de *X. fastidiosa* en parcelas de almendro, tanto en secano con en regadío, destacan el contenido de antocianinas, la fluorescencia de la clorofila, varios índices relacionados con la banda del azul (de 450 a 520 nm) (BF1, BF2, NPQI), con el contenido de xantofilas (PRI, PRIn, PRI-CI, PRIM1) y con el contenido de clorofilas (PSSRa, PSSRb, TCARI/OSORI, GM1). En árboles en secano destacaron el contenido de flavonoides, mientras que en los árboles de regadío fueron el CRI550, relacionado con la banda del verde y el índice de senescencia de planta (PSRI).

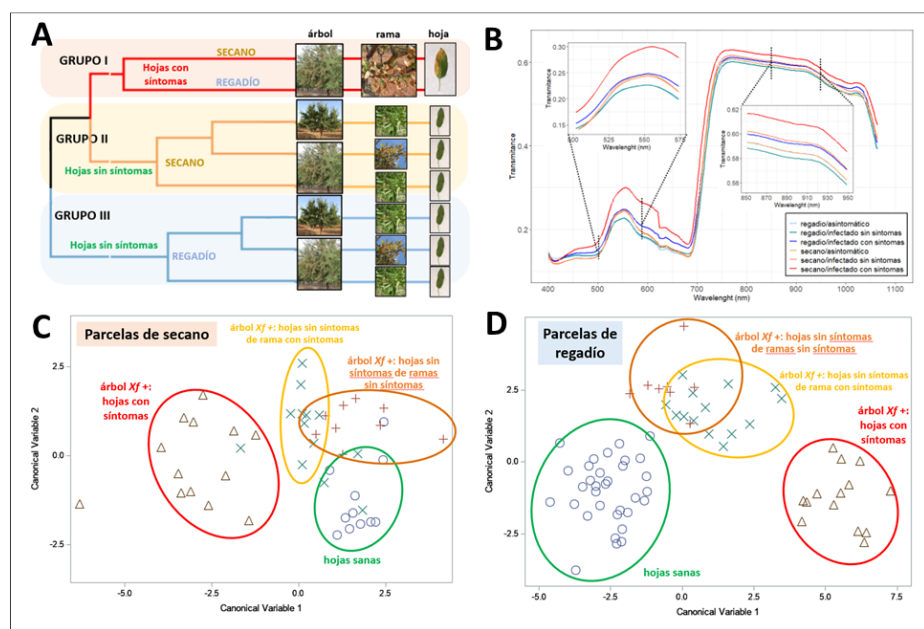


Figura 2. Clasificación de hojas de árboles sintomáticos y asintomáticos basada en 75 índices de vegetación para: A) análisis de agrupación jerárquica para los grupos de hojas asintomáticas/sintomáticas; B) reflectancia de la hoja obtenidas de árboles asintomáticos y de hojas con síntomas y sin síntomas de plantas infectadas mostrando el dominio del espectro visible y parte del infrarrojo cercano (400-1060 nm); (C y D) primera y segunda variables canónicas del análisis discriminante canónico para las parcelas de almendro en régimen de secano (C) y regadío (D).

3.2. Imágenes aéreas para la detección de *Xylella fastidiosa* en árboles almendro afectados por Chamuscado foliar mediante imágenes aéreas

En la Figura 3 se presentan ejemplos de imágenes aéreas representativas de las parcelas de almendro obtenidas con los diferentes sensores RGB (Figura 3A), hiperespectral (Figura 3B) y SWIR (Figura 3C). Estas imágenes incluyen parcelas en régimen de regadío y secano con diferente nivel de incidencia y severidad de síntomas de Chamuscado foliar en la isla de Mallorca.

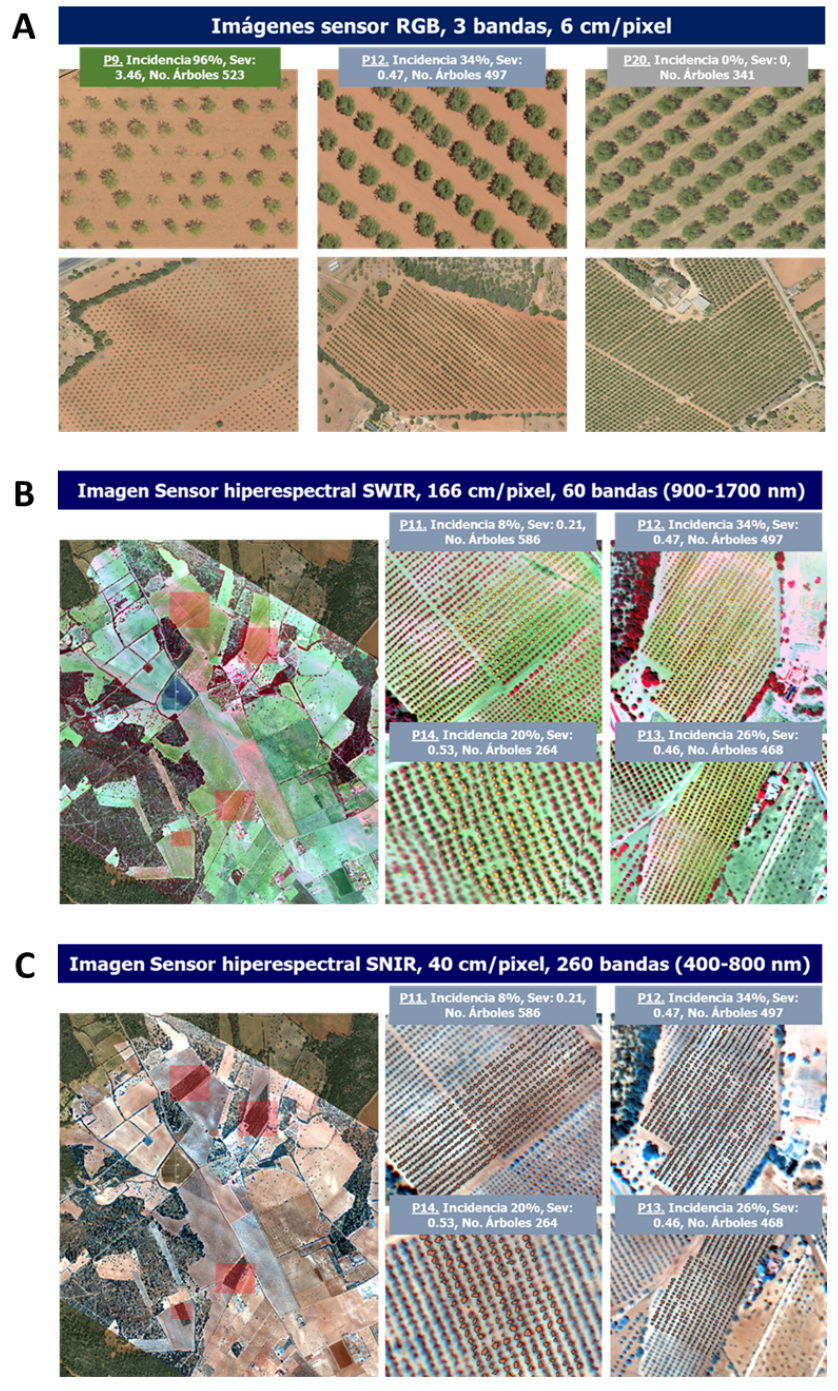


Figura 3. Imágenes aéreas obtenidas con diferentes sensores aerotransportados en parcelas en régimen de regadío y secano con diferente nivel de incidencia y severidad de síntomas de Chamuscado foliar en la isla de Mallorca, Islas Baleares. (A) sensor RGB (Red-green-blue) aerotransportado con una resolución especial de 7 cm de pixel; (B) sensor hiperespectral VNIR (región espectral 400 – 800 nm) con una resolución especial de 50 cm de (C) sensor hiperespectral NIR-100 (región espectral 950 – 1750 nm) con una resolución especial de 60 cm de pixel.

3.2.1. Rasgos de vegetación asociados a la detección de plantas de almendro afectadas por Chamuscado foliar causado por *Xylella fastidiosa*

Para evaluar la importancia de los rasgos de vegetación en la detección de árboles sintomáticos infectados por *X. fastidiosa*, se estimó la capacidad de predicción de estos indicadores en cada uno de los tres modelos de Machine Learning (ML) evaluados (Fig. 4). En general, tanto el nivel de incidencia de *X. fastidiosa* en la parcela como el régimen hídrico (regadío vs. secano) determinaron el conjunto de rasgos de vegetación seleccionados y su contribución en el modelo. Así, en las parcelas en regadío (Fig. 4) los rasgos de vegetación V_{cmax} (tasa máxima de carboxilación, como proxy de la actividad fotosintética), contenido en Clorofila a+b, CBC (Componentes a base de carbono, incluyendo lignina), LIDF (Función de distribución de inclinación de la hoja) y contenido en Antocianinas fueron los rasgos de vegetación con mayor contribución a los clasificadores de ML, que osciló entre el 20 y 11%, respectivamente, con una contribución global del 74%. Sin embargo, en las parcelas en secano (Figura 4), el contenido en Antocianinas y Tc (temperatura de la copa) aumentaron su contribución al 28% y 15% respectivamente, mientras que CBC y LIDF mostraron una contribución similar a la de las parcelas en regadío; mientras que para V_{cmax} y contenido en Clorofila a+b su contribución descendió al 9% y 8%, respectivamente. Finalmente, cuando el análisis se realizó para el conjunto de parcelas, tanto en secano como regadío (Fig. 4), LIDF, CBC, Tc, V_{cmax} , Cw (Espesor equivalente de agua, como proxy del contenido de agua en la hoja) y contenido en Clorofila a+b presentaron una contribución que osciló entre el 16 y 11%, siendo ésta del 9% para el contenido en Antocianinas (Figura 4).

Destacar que en las parcelas en condiciones de secano, en las que la presión de enfermedad es muy superior a la observada en regadío [i.e., presentan valores de incidencia medios del 75% (donde el 45% son árboles calificados con síntomas moderados y el 30% con síntomas iniciales)], los rasgos de vegetación relacionados con el estrés hídrico (ej. Temperatura de la copa), LIDF y de defensa de la planta (ej. las antocianinas o la deposición de lignina, o CBC) fueron los que mostraron

una mayor contribución. Por tanto, los rasgos de vegetación críticos en la detección de árboles afectados por Chamuscado foliar tanto en régimen de secano como regadío son los relacionados con el contenido en pigmentos (Clorofila a+b y Antocianinas), capacidad fotosintética (Vcmax), y Componentes a base de carbono (CBC). Por otro lado, cuando se compararon los rasgos de vegetación de árboles sanos en parcelas con presencia de enfermedad con aquellos en parcelas sin presencia de enfermedad, ambos grupos de árboles presentaron variaciones similares en actividad fotosintética, contenido en nitrógeno y temperatura de la copa.

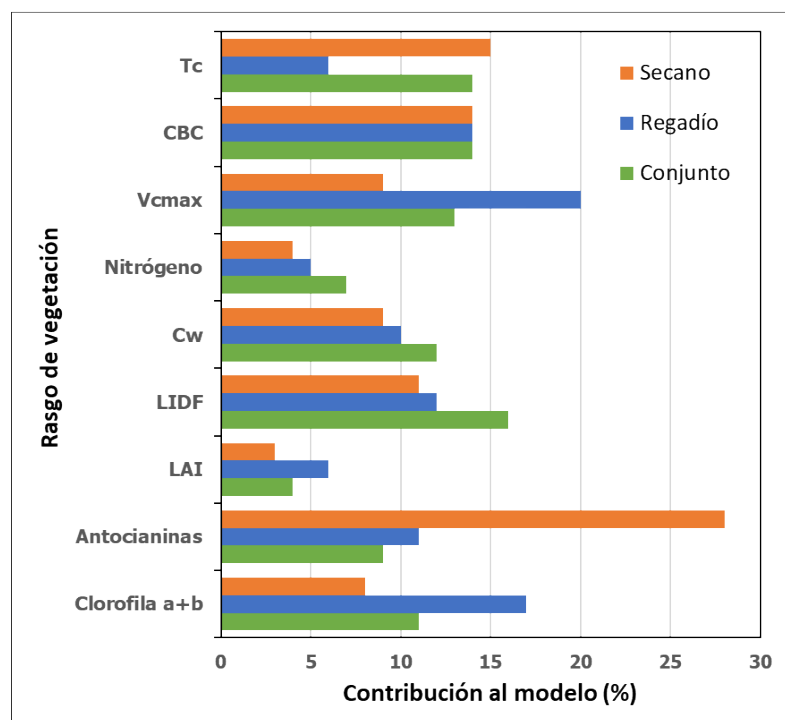


Figura 4. Contribución de los rasgos de vegetación para la detección de *Xylella fastidiosa* en almendro para el modelo

más parsimonioso de Machine en parcelas de almendro en la Isla de Mallorca afectadas por Chamuscado foliar en régimen de secano, regadío o para ambos regímenes hídricos conjuntamente.

3.2.2. Rasgos de vegetación asociados a la detección diferencial de síntomas causados por la infección por *Xylella fastidiosa* en almendro y olivo o estrés hídrico abiótico

Una limitación importante de los métodos avanzados basados en imágenes hiperespectral, térmica y modelos de transferencia radiativa para la monitorización de estado fitosanitario de los cultivos es que las alteraciones fisiológicas causadas por una enfermedad se reflejan en cambios en el estado fisiológico de la planta, como pueden ser la regulación estomática y la dinámica acoplada de clorofila, fotosíntesis-transpiración, que comúnmente están moduladas por factores tanto bióticos como abióticos. Por lo tanto, el poder revelar huellas espectrales asociadas diferencialmente con condiciones de estrés biótico frente a estrés abiótico es de gran importancia para optimizar los esfuerzos en la detección remota de síntomas tempranos de infección por patógenos que ocurren en el contexto de la variabilidad fisiológica natural (por ejemplo, debido a la deficiencia de agua o las deficiencias de nutrientes) que se normalmente se producen incluso en condiciones de cultivo de regadío.

Para ello se han estudiado las posibles divergencias entre las alteraciones fisiológicas detectadas a través de la espectroscopia de imágenes y los datos térmicos inducidas por el estrés biótico causado por *X. fastidiosa*, que es una bacteria invasora del sistema vascular en olivo y almendro o del estrés abiótico impuesto por la limitación del agua. Para ello, los datos obtenidos en este proyecto se han comparado con datos de investigaciones anteriores de nuestro grupo sobre la detección de *X. fastidiosa* en olivo en la región de Apulia en el sur de Italia (Zarco-Tejada y col., 2018) con objeto de dilucidar las huellas espectrales específicas del huésped para las infecciones por *X. fastidiosa* en olivar (Apulia, Italia) y almendro (Isla de Mallorca) (Figura 5). Los resultados mostraron que las alteraciones fisiológicas inducidas por la infección por *X. fastidiosa* dan lugar a cambios en los rasgos espectrales de la vegetación sensibles al estrés biótico que eran comunes para las dos especies huésped (olivo y almendro), mientras que otros rasgos eran específicos de cada huésped (Figuras 5A vs 5B y 5C). En ambas especies huésped, la infección por *X. fastidiosa* modificó los rasgos espectrales de la planta relacionados con la dinámica de conductancia estomática ya que la infección bloqueó progresivamente los vasos del xilema y, por lo tanto, redujo la transpiración de la planta. Las tasas de transpiración más bajas también conducen a un incremento de la temperatura general del dosel del árbol, estimada por el índice de estrés hídrico térmico del cultivo (CWSI), que asimismo está asociada con una reducción en la fotosíntesis y alteraciones en la

dinámica del ciclo de la xantofila (estimados por el Índice de Reflectancia Fotoquímica normalizado, PRI_n) (Figura 5). Además, nuestros resultados indican la existencia de rasgos espectrales específicos de la especie huésped modificados por la infección por *X. fastidiosa* como son el rasgo espectral de la región azul NPQI (relacionado con la degradación de clorofila-feofitina), y el contenido de antocianinas que tuvieron una importancia limitada en el caso de la infección por *X. fastidiosa* en almendro, pero extremadamente relevantes para la detección de la infección por este mismo patógeno en olivo (Figura 5).

Destacar que el desacoplamiento de esta dinámica espectral biótico-abiótica permite incrementar la capacidad de predicción de árboles infectados en el 6% en olivo y almendro con una precisión de detección global del 92%.

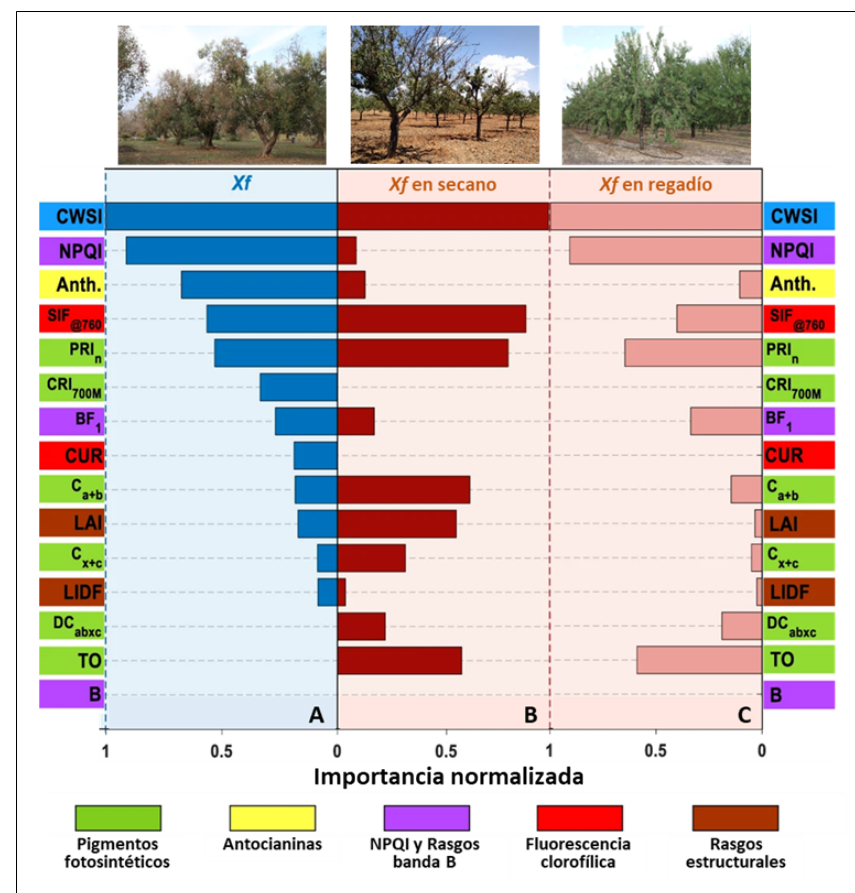


Figura 5. Importancia de los rasgos espectrales para la detección de síntomas de infección por *Xylella fastidiosa*. (A-C) Importancia normalizada de los rasgos hiperespectrales y térmicos de las plantas recuperados del conjunto de rasgos espectrales de las plantas utilizados para detectar (A) los síntomas inducidos por *Xylella fastidiosa* en olivo y (B) en almendro en régimen de secano y (C) en almendro en régimen de regadío. Adaptado de Zarco-Tejada y col., 2021.

Bibliografía

Bonants, P., Griekspoor, Y., Houwers, I., Krijger, M., van der Zouwen, P., van der Lee, T. A. J., and van der Wolf, J. (2019) Development and evaluation of a triplex taqman assay and next-generation sequence analysis for improved detection of *Xylella* in plant material. *Plant Disease* 103 (4): 645–655. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1433-RE>

Camino, C., González-Dugo, V., Hernández, P., Sillero, J.C., Zarco-Tejada, P.J., (2018) Improved nitrogen retrievals with airborne-derived fluorescence and plant traits quantified from VNIR-SWIR hyperspectral imagery in the context of precision agriculture. *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.* 70, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.jag.2018.04.01>

Camino, C., Araño, K., Berni, J. A., Dierkes, H., Trapero-Casas, J. L., León-Roper, G., Montes-Borrego, M., Román-Écija, M., Velasco-Amo, M.P., Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., Beck, P. S. A. (2022). Detecting *Xylella fastidiosa* in a machine learning framework using Vcmax and leaf biochemistry quantified with airborne hyperspectral imagery. *Remote Sensing of Environment*, 282, 113281. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2022.113281>

Calderón R, Navas-Cortés JA, Lucena C, Zarco-Tejada PJ. (2013). High-resolution airborne hyperspectral and thermal imagery for early detection of Verticillium wilt of olive using fluorescence, temperature and narrow-band spectral indices. *Remote Sensing Environ.* 139:231-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rse.2013.07.031>.

Harper, S. J., Ward, L. I., and Clover, G. R. G (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.

Hernández-Clemente, R., North, P.R.J., Hornero, A., Zarco-Tejada, P.J., (2017) Assessing the effects of forest health on sun-induced chlorophyll fluorescence using the FluorFLIGHT 3-D radiative transfer model to account for forest structure. *Remote Sens. Environ.* 193, 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2017.02.012>

Jacquemoud, S., Baret, F., (1990) PROSPECT: A model of leaf optical properties spectra. *Remote Sens. Environ.* 34, 75–91. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(90\)90100-Z](https://doi.org/10.1016/0034-4257(90)90100-Z)

Kersting, S., Rausch, V., Bier, F. F., and von Nickisch-Roseneck, M. (2014) Rapid detection of Plasmodium falciparum with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malaria Journal*. 13:99.

Li, R., Russell, P., Zhang, S., Davenport, B., and Eads, A. (2016) Development of a rapid and reliable isothermal AmplifyRP® XRT+ diagnostic assay for specific detection of *Xylella fastidiosa*.

Niblack, W. (1986) *An Introduction to Digital Image Processing*, Prentice Hall.

Poblete, T., Camino, C., Beck, P. S. A., Hornero, A., Kattenborn, T., Saponari, M., Boscia, D., Navas-Cortes, J. A., and Zarco-Tejada, P. J. (2020) Detection of *Xylella fastidiosa* infection symptoms with airborne multispectral and thermal imagery: Assessing bandset reduction performance from hyperspectral analysis. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 162, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.isprs.2020.02.010>

R Core Team. (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Sauvola, J. and Pietikäinen, M. (2000) Adaptive document image binarization. *Pattern Recognition* 33, 225–236. [https://doi.org/10.1016/S0031-3203\(99\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0031-3203(99)00055-2)

Verhoef, W., (1984) Light scattering by leaf layers with application to canopy reflectance modeling: The SAIL model. *Remote Sens. Environ.* 16, 125–141. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(84\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0034-4257(84)90057-9)

Zarco-Tejada, P.J., González-Dugo, M. V., Fereres, E., (2016) Seasonal stability of chlorophyll fluorescence quantified from airborne hyperspectral imagery as an indicator of net photosynthesis in the context of precision agriculture. *Remote Sens. Environ.* 179, 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2016.03.024>

Zarco-Tejada, P.J., Camino, C., Beck, P.S.A.A., Calderon, R., Hornero, A., Hernández-Clemente, R., Kattenborn, T., Montes-Borrego, M., Susca, L., Morelli, M., Gonzalez-Dugo, V., North, P.R.J.J., Landa, B.B., Boscia, D., Saponari, M., Navas-Cortes, J.A., (2018) Previsual symptoms of *Xylella fastidiosa* infection revealed in spectral plant-trait alterations. *Nat. Plants* 4, 432-439. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0189-7>

Zarco-Tejada, P. J., Poblete, T., Camino, C., Gonzalez-Dugo, V., Calderon, R., Hornero, A., Hernandez-Clemente, R., Román-Écija, M., Velasco-Amo, M. P., Landa, B. B., Beck, P. S. A., Saponari, M., Boscia, D., & Navas-Cortes, J. A. (2021) Divergent abiotic spectral pathways unravel pathogen stress signals across species. *Nature Communications* 2021 12:1, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26335-3>

6. Incidencia y sensibilidad varietal de la bacteria *Xylella fastidiosa* en los bancos de germoplasma de vid, almendro y olivo de la isla de Mallorca

Daniel Sacristán¹, Bàrbara M. Quetglas², Pere A. Gost², Joana Maria Fontclara², Maria Cañellas², Catalina Cabot², John V. Sibole², Antoni Busquets³, Margarita Gomila², Antònia Romero², Analía Perelló⁵, Jaume Vadell², Josep Cifre⁴

¹ Departamento de Biología Vegetal, Universitat de València, Burjassot, ESPAÑA. ² Departamento de Biología, ³Servicios Científico-técnicos, ⁴Departamento de Ingeniería, Universitat de les Illes Balears, Palma, ESPAÑA. ⁵Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, ARGENTINA.

Introducción

Xylella fastidiosa (*Xf*) es una bacteria que habita el xilema, causando diversas enfermedades en cultivos, como la quemazón de las hojas de los almendros o la enfermedad de Pierce en la vid, entre otras. Los mecanismos específicos por los cuales la bacteria infecta y coloniza las plantas todavía no se conocen con exactitud, aunque sí se conoce que el desarrollo de los síntomas en las plantas afectadas se debe, inicialmente, a respuestas fisiológicas de la planta desencadenadas por el déficit hídrico como consecuencia del taponamiento de los vasos del xilema por biopelículas segregadas por las colonias de bacterias (FAO, 2019). Sin embargo, no todas las infecciones desarrollan síntomas (Landa y col., 2017).

Xf se transmite de forma natural a través de insectos vectores del orden de los hemípteros que se alimentan del xilema, principalmente chicharras, chicharritas y saltahojas (MAPA, 2021a); de forma artificial, se puede transmitir por medio de prácticas culturales como el injerto o

la poda (Landa y col., 2017). Las principales subespecies y perfiles genéticos descritos e identificados más comunes se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales subespecies y grupos genéticos de *X. fastidiosa* y principales especies huéspedes.

Subespecie	Grupo genético (ST)	Huéspedes
<i>fastidiosa</i>	1	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Prunus dulcis</i> y <i>Medicago sativa</i>
<i>multplex</i>	6, 7, 79, 81	<i>Prunus</i> spp., <i>Quercus</i> spp., <i>Ulmus</i> spp., <i>Rubus</i> spp. y <i>Morus</i> spp.
<i>pauca</i>	53, 80	<i>Citrus x sinensis</i> , <i>Coffea</i> , <i>Olea europaea</i> , etc.
<i>sandyi</i>	76	<i>Nerium oleander</i> , <i>Jacaranda</i> spp., etc.

Es importante destacar que los diferentes huéspedes pueden verse afectados con diferentes niveles de severidad, según las condiciones agrícolas, climáticas, varietales, o según la subespecie de la bacteria infectante. En general los inviernos templados son adecuados climáticamente para el establecimiento en cualquier zona de todas las subespecies y grupos genéticos. Por otro lado, el mayor crecimiento de *Xf* se produce a temperaturas entre 25 y 28°C y disminuye a medida que se registran tanto temperaturas mayores como menores, siendo 34 y 10°C, respectivamente, los límites a partir de los cuales puede paralizarse el crecimiento de esta bacteria (Álvarez, 2017).

En la actualidad, aparecen registradas 595 especies vegetales huésped, pertenecientes a 275 géneros y 85 familias, de las cuales se ha confirmado la infección de 343 mediante dos procedimientos de rastro, en circunstancias naturales o artificiales (EFSA, 2020). Muchas de las plantas huésped identificadas son de gran interés agrícola, como la vid, el almendro y el olivo, entre otros (Vicent y col., 2019). Son precisamente estos tres cultivos señalados los que presentan mayor interés para el territorio balear.

Finalmente, es importante saber que, en la actualidad, no existen tratamientos efectivos para el control de *Xf*, lo que dificulta su control, prevención y erradicación. En este contexto, resulta evidente la necesidad de encontrar nuevas estrategias de lucha contra este fitopatógeno que permitan su control. Una de las aproximaciones más adecuadas es el análisis de la tolerancia/sensibilidad varietal de aquellos cultivos de mayor interés desde un punto de vista agronómico.

Importancia de la vid en las Islas Baleares e Incidencia de Xylella fastidiosa

Según el MAPA, con fecha a 31 de julio de 2020, España cuenta con la mayor superficie de producción vitícola mundial (944.478 ha de viñedo), aunque desde la campaña 2000/2001, todas las CC. AA. han visto aminorada su extensión vitícola, exceptuando Baleares, Cantabria, Galicia y La Rioja (MAPA, 2021b).

La información recopilada por el Instituto de Calidad Agroalimentaria de las Illes Balears (IQUA) constata que la vitivinicultura tiene un importante papel socioeconómico y constituye un patrimonio cultural. Los últimos datos publicados en 2017 indican que la superficie de vid cultivada cuenta con 1.630,88 ha, de las cuales 312,72 ha corresponden a la Denominación de Origen (DO) Binissalem y 441,18 ha a la DO Pla i Llevant. Por su parte, en la categoría “Vi de la Terra”, se registraron ese mismo año un total de 877,98 ha, divididas entre sus respectivos subgrupos: “Vi de la terra Illes Balears” (4’16 ha), “Vi de la terra Serra de Tramuntana” (15’87 ha), “Vi de la terra Mallorca” (743 ha), “Vi de la terra Eivissa” (59,98 ha), “Vi de la terra Illa de Menorca” (40,11 ha) y “Vi de la terra Formentera” (13,86 ha). Toda la superficie anteriormente comentada está destinada a la vinificación.

La producción de uva ascendió a un total de 8.161.753 kg en 2017, de los cuales 3.747.416 kg provienen de la superficie inscrita en alguna de las DO y, los 4.414.337 kg restantes corresponden a la producción de los viñedos inscritos en la categoría “Vi de la Terra”. A partir de estos kg de uva, se elaboraron 24.918 hl de vino en las DO y 28.870 hl en la categoría “Vi de la Terra”, sumando un total de 53.789 hl de vino.

En vid, *Xf* desarrolla la denominada enfermedad de Pierce, Pierce’s disease (PD) en inglés, descrita por Newton Pierce en 1884. Las cepas de la bacteria que provocan el PD pertenecen a la subsp. *fastidiosa* (Tabla 1). La mayoría o prácticamente todas las variedades de *Vitis vinifera* son susceptibles a *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, aunque en inoculaciones y en campo se observan algunas diferencias en la severidad de las infecciones.

Los síntomas de PD aparecen a finales del verano cuando las condiciones climáticas son cálidas y secas, o cuando la planta sufre estrés hídrico. Los primeros síntomas que se aprecian después de una infección son el secado de grandes partes de hojas verdes. Estas partes se vuelven

necróticas y los tejidos limítrofes se tornan amarillos en variedades blancas (Figura 1) o rojos en variedades tintas (Figura 2). La necrosis suele estar presente en los márgenes de las hojas. Las hojas con síntomas de quemazón habitualmente se desprenden del pecíolo (conocido en inglés como *matchstick*), quedando éste adherido a la planta (Figura 3). Estos síntomas pueden confundirse con otros desórdenes como la toxicidad por exceso de sal o la deficiencia de boro, cobre o fósforo. Además de los síntomas genéricos anteriormente descritos, se pueden producir también defoliaciones, enanismo en las ramas y tronco, así como deshidratación de los racimos. Los sarmientos pueden mostrar islas verdes o parches irregulares de tejido verde (no endurecido) sobre tejido marrón (endurecido). Además, las vides pueden mostrar un crecimiento reducido, zonas atrofiadas y/o una baja producción que puede terminar con la muerte de la planta.



Figura 1. Sintomatología típica de *X. fastidiosa* en hoja de una variedad blanca de vid.



Figura 2. Sintomatología típica de *X. fastidiosa* en hoja de una variedad tinta de vid.



Figura 3. Sintomatología típica de *X. fastidiosa* en el cultivo de la vid denominada, en inglés, *matchstick*.

Importancia del almendro en las Islas Baleares e incidencia de *Xylella fastidiosa*

Actualmente, son pocos los países que concentran la producción mundial de almendra, siendo España el segundo país productor más importante detrás de Estados Unidos (FAO, 2021). Según el MAPA, con fecha a 18 de octubre de 2022, el almendro representa el 86% de la superficie total de frutos secos de España. Este grupo de cultivos mantiene su línea de expansión.

Según el análisis provincial de superficie y producción llevado a cabo por el MAPA para el año 2021, el cultivo del almendro en las Islas Baleares ocupa una superficie total de 24.032 ha, de las cuales 19.627 ha están en producción. Además, las tendencias al alza de demanda y valorización económica de la almendra hacen del almendro un cultivo con alto interés y rentabilidad en el territorio balear. El Instituto de Calidad Agroalimentaria de las Illes Balears (IQUA) confirma que desde el 2017 y hasta la actualidad se ha detectado un aumento en la superficie destinada a este cultivo en Baleares, al igual que en su producción. Debido a su gran importancia y su calidad diferenciada, la almendra mallorquina cuenta con su sello de calidad de Indicación Geográfica Protegida (IGP) "Almendra de Mallorca" desde 2014.

En el almendro, *Xf* desarrolla la denominada quemazón de las hojas. En este caso, y al contrario que para la vid, diversas subespecies pueden desarrollar dicha enfermedad, siendo las más comunes las subsp. *multiplex* y *fastidiosa* (Tabla 1).

Los primeros síntomas observables en hojas de almendro son necrosis marginales, generalmente acompañadas de un halo clorótico entre el tejido vivo y el tejido necrosado. También se puede observar un mosaico a modo de aguas en la zona necrosada (Figura 4). Como en el caso de la vid, las plantas pueden tener un crecimiento reducido, zonas atrofiadas y una baja producción que puede terminar con la muerte de la planta.

Importancia del olivo en las Islas Baleares e Incidencia de *Xylella fastidiosa*

La industria del aceite de oliva desempeña un papel muy importante en el sistema agroalimentario español. España es líder mundial en superficie, producción y comercio exterior de este producto. La producción española de aceite de oliva representa el 70% de la producción de la Unión Europea (UE) y el 45% de la producción mundial.

Según el análisis provincial de superficie y producción del año 2021 del MAPA, Baleares dedica 108 ha de superficie en plantación regular al cultivo del olivo para aceituna de mesa con una producción de 48 toneladas, mientras que la superficie dedicada a plantaciones regulares para aceituna de almazara alcanza las 8.416 ha y la producción asociada de 5.154 toneladas.

El olivo es un cultivo con una gran importancia tanto histórica como económica en las Islas Baleares. Tanto es así, que cuentan con tres denominaciones de origen ("Aceite de Mallorca", "Aceite de Ibiza/Oli d'Eivissa" y "Aceite de Menorca/Oli de Menorca") para visibilizar y valorizar este producto de elevada importancia socioeconómica.

En el olivo, la *Xf* desarrolla la denominada necrosis marginal o quemazón. En este caso, y como en el caso del almendro, diversas subespecies pueden desarrollar dicha enfermedad, siendo las más comunes las subsp. *multiplex* y *pauca*, especialmente esta última (Tabla 1).

Los primeros síntomas observables consisten en el marchitamiento y decaimiento generalizado (síntomas asociados al estrés hídrico), seca de hojas que comienza por el borde apical, y de ramas, acompañada de defoliación, pudiendo llegar a la muerte del árbol. En hojas se observan síntomas con áreas secas y marrones con distribución irregular en las hojas y abarquillamiento de las hojas hacia el envés (Figura 5).

Material y métodos

Con el objetivo principal de caracterizar la dinámica estacional de síntomas y niveles de infección de *Xf* en las variedades de vid, almendro y olivo, se realizó un seguimiento de los bancos de germoplasma que dispone la *Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació*. Concreta-

mente, se analizaron los bancos de germoplasma de viña de Sa Granja y Sa Canova, de almendro de Son Real, Xorrigo y Sa Canova y el de olivo de Sa Granja, durante los meses de junio, julio y agosto de 2019-2021.

Las principales características de los bancos de germoplasma muestreados se recogen en las Tablas 2, 3 y 4 para vid, almendro y olivo, respectivamente. En cada banco de germoplasma se cuenta con al menos tres réplicas de cada variedad de vid, almendro y olivo.

Tabla 2. Características principales de los bancos de germoplasma de vid.

Banco de germoplasma	Superficie	Portainjerto	Sistema de riego	Marco de plantación	Año de la plantación	Nº de Variedades
Sa Granja	0,28 ha	R-110	goteo	1,2 x 2,4	1996	60
Sa Canova	0,30 ha	R-110	goteo	1,2 x 2,4	2005	10

Tabla 3. Características principales de los bancos de germoplasma de almendro.

Banco de germoplasma	Superficie	Portainjerto	Sistema de riego	Marco de plantación	Año de la plantación	Nº de Variedades
Son Real	1,64 ha	GF-677	goteo	6 x 7	2012	75
Sa Canova	0,83 ha	GF-677	goteo	7 x 5	2004 ¹	68
Xorrigo	1,48 ha	GF-677	goteo	7 x 6	2014 ²	14

¹: Excepto las variedades Vairo, Tarraco, Marinada y Constantí (2012).

²: Excepto las variedades Masbovera, Glorieta, Lauranne y Penta (2015).

Tabla 4. Características principales de los bancos de germoplasma de olivo.

Banco de germoplasma	Superficie	Portainjerto	Sistema de riego	Marco de plantación	Año de la plantación	Nº de Variedades
Sa Granja	1,61 ha	-	goteo	6x6	1998	12

En cada muestreo se tomaron muestras vegetales simples para el análisis de *X. fastidiosa* y se realizó una estimación de la sintomatología de cada individuo. Para ello, se usó una escala 0-5 (Tabla 5) definida por la Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació para estandarizar la detección visual de la sintomatología asociada a la bacteria, correspondiente al porcentaje de hoja y copa afectada por la enfermedad.

Tabla 5. Grado de afectación estimado durante los muestreos para cada individuo y cultivo analizado.

Afectación (%)	Valor
Sin síntomas	0
1 a 25 %	1
26 a 50 %	2
51 a 75%	3
76 a 100 %	4
Muerto	5

El grado de afectación varietal se clasificó en 3 grupos según la afectación:

- No afectadas: variedades sin sintomatología (valor de afectación = 0) y con analítica de *X. fastidiosa* negativa.
- Poco afectadas: variedades sin o baja sintomatología (valor de afectación = 0 - 1) y con analítica de *X. fastidiosa* positiva.
- Muy afectadas: variedades con sintomatología evidente (Valor de afectación > 1) y con analítica de *X. fastidiosa* positiva.

Además, se diferenció dentro de cada categoría entre variedades autóctonas y variedades foráneas.

Para la detección y el análisis en el laboratorio, se cogieron muestras simples de cada individuo, siguiendo la metodología descrita por la EPPO (EPPO, 2019). En el caso de ejemplares sintomáticos, se recogieron pequeñas ramas y hojas con afectación, procurando evitar siempre las hojas más jóvenes. En el caso de ejemplares asintomáticos se llevó a cabo un muestreo de hojas completamente adultas, evitando los brotes y hojas más jóvenes. La detección en el laboratorio se realizó siguiendo los métodos moleculares descritos en el capítulo 3. Todos los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universitat de les Illes Balears.

Resultados y discusión

Vid

Durante los tres años de seguimiento no se observó una afectación en ninguna de las variedades presentes en los bancos de germoplasma de Sa Granja y Sa Canova. La afectación acumulada de este periodo para cada una de las variedades analizadas se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Variedades de vid no afectadas presentes en los bancos de germoplasma durante el periodo de seguimiento

VARIEDADES NO AFECTADAS			
VARIEDADES AUTÓCTONAS		VARIEDADES FORÁNEAS	
Aleluia	Jaumes	Cabernet Sauvignon	Pinot
Argamussa	Jaumillo	Chardonnay	Red Globe
Batista	Quigat	Chenin	Riesling
Boal	Magdalena	Garnatxa	Rosaki
Cabellis	Mamella de Vaca	Gewurztraminer	Sauvignon
Callet	Mancés de Capell	Macabeo	Blanc
Callet Blanc	Mancés de Tibus	Malvasia	Syrah
Calop	Mandó	Merlot	Sultanina
Calop Blanc	Manto Negro	Monastrell	Tempranillo
Calop Negre	Mateu	Moscateil	Tinto Velasco
Calop Roig	Molinera	Parellada	Vermentino
Escursac	Moll de Binissalem		Xarel.lo
Esperó de Gall	Peu de rata		
Fernandella	Prensall Blanc		
Fogoneu	Sabater		
Fogoneu Frances	Sinsó		
Garrafó	Valent Negre		
Giró Blanc	Vinater Blanc		
Giró Negre	Vinater Tinto		
Giró Ros			
Gorgollasa			

Almendro

Durante los tres años de seguimiento se observaron diferentes respuestas a la infección y afectación por *X. fastidiosa* en función de la variedad. La afectación acumulada de este periodo para cada uno de los cultivos analizados se resume en las tablas 7, 8 y 9. Para la elaboración de estas tablas se han clasificado las variedades en la categoría más desfavorable que han estado durante el periodo trianual de seguimiento.

Tabla 7. Variedades de almendro no afectadas presentes en los bancos de germoplasma durante el periodo de seguimiento

VARIEDADES NO AFECTADAS	
VARIEDADES AUTÓCTONAS	
Cabana	Mare de Deu
Cantaros	Pere Xina
Capirons	Progresos
Horrach	Verd
VARIEDADES FORÁNEAS	
Cristomorto	Lauranne
Ferragnes	Soleta
Marinada	Tarraco
Moncayo	Vairo

Tabla 8. Variedades de almendro poco afectadas presentes en los bancos de germoplasma durante el periodo de seguimiento

VARIEDADES POCO AFECTADAS	
VARIEDADES AUTÓCTONAS	
Bolic	Eivissenc
Den Ribes	Feliu
De'n Rotger	Guarin
Des meus	Jordi
Duran	Sicilia
Duranet	Vivero
VARIEDADES FORÁNEAS	
Belona	Guara
Constantí	Marta
Desmai llargueta	Penta
Ferraduel	
Glorieta	

Tabla 9. Variedades de almendro no afectadas presentes en los bancos de germoplasma durante el periodo de seguimiento

VARIEDADES MUY AFECTADAS			
VARIEDADES AUTÓCTONAS			
Alzina	Caragola	Filau	Pons
Agrina	Ceba	Lluca	Pou Gaspar
Andreu	Clot de sa mata	Menut	Primerenca
Bertina	Corona	Maxina	Rutlo
Beyrita	Corona de rei	Mollar	Torres
Binissalem	Costa	Morro de vaca	Taitona
Bord Santa Maria	De l'engany	Nostro	Totsol
Bord de Selva	De la trapa	Pere Gelabert	Trinxets
Bord des Raiguer	De la vara	Pintadeta	Verdereta
Bord Pep Jeroni	De'n Pons	Pou d'Establiments	Vera
Bord den Cabet	Desmai Victòria	Pou Felanitx	Victòria
Bord penyat	Dueta	Poteta	Vinagrillo
Canaleta	Fenereta		Viveta
	Fita Mollar		Vivot
VARIEDADES FORÁNEAS			
Antoñeta		Marcona	
Blanquerna		Mardía	
Garrigues		Masbovera	

Olivo

Durante los tres años de seguimiento no se observó una afectación severa en ninguna de las variedades presentes en el banco de germoplasma de Sa Granja. La afectación acumulada de este periodo para cada uno de los cultivos analizados se resume en las tablas 10 y 11. Para la elaboración de estas tablas se han clasificado las variedades en la categoría más desfavorable que ha estado en el periodo trianual de seguimiento.

Tabla 10. Variedades de olivo no afectadas presentes en los bancos de germoplasma durante el periodo de seguimiento

VARIEDADES NO AFECTADAS	
VARIEDADES AUTÓCTONAS	
Empeltre	
VARIEDADES FORÁNEAS	
Aragonesa	Hojiblanca
Arbequina	Oblonga
Cornicabra	Picual
Frantoio	Picudo
	Villalonga

Tabla 11. Variedades de olivo poco afectadas presentes en los bancos de germoplasma durante el periodo de seguimiento

VARIEDADES POCO AFECTADAS	
VARIEDADES AUTÓCTONAS	
Mallorquina	Mallorquina de Cort
VARIEDADES FORÁNEAS	

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio nos dan una primera aproximación a la tolerancia o sensibilidad de las diferentes variedades de vid, almendro y olivo frente a la bacteria *X. fastidiosa* en las Islas Baleares. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados han sido generados a partir de un seguimiento de 3 años, periodo insuficiente para extraer resultados concluyentes con respecto a la resistencia a una enfermedad. Numerosos factores ambientales intervienen en la infección y desarrollo de una enfermedad, por lo que se necesitan seguimientos más largos para obtener resultados robustos y conclusiones adecuadas. Como ejemplo, resaltar el resultado obtenido para almendro en el segundo año de seguimiento, donde se observó una mejoría general respecto a la resistencia de este cultivo. Dicha mejoría podría atribuirse a un incremento considerable de las horas de frío durante el invierno,

el cual puede haber controlado la multiplicación y dispersión de la bacteria, reduciendo la afectación en muchas variedades de almendro.

También es necesario indicar que los resultados obtenidos corresponden a la afectación y sintomatología de las variedades presentes en los bancos de germoplasma. Es importante considerar que hay otras zonas de la isla de Mallorca donde estas variedades pueden estar presentes y la bacteria *X. fastidiosa* haya sido ya detectada.

Agradecimientos: este trabajo ha sido financiado por la *Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació* (Gobierno de las Islas Baleares) por medio del contrato 4384/2018.

Bibliografía

Álvarez, A. (2017) *Xylella fastidiosa*, una nueva amenaza patógena para el olivar. Encuentros en la Biología, 10(163), 233-236. http://www.encuentros.uma.es/assets/journals/10/10.163-singles/10.163.5_article.pdf.

EFSA. (2020). Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2019. EFSA Journal, 18(4), 1-61. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6114.

EPPO. (2019). PM7/24 *Xylella fastidiosa*. EPPO Bull. 49 (2), 175-227 DOI: 10.1111/epp. 12575

FAO. (2019). Guidelines for the prevention, eradication and containment of *Xylella fastidiosa* in olive-growing areas.

FAO. (2021). Estadísticas de producción y comercio, FAOSTAT-Agriculture. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>

Landa, B., Navas, J. A., Montes, M. (2017) Características generales de *X. fastidiosa*. Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa* (47 – 56). Cajamar Caja Rural.

MAPA. (2021a). Programa nacional para la aplicación de la normativa fitosanitaria. Plan de contingencia de *Xylella fastidiosa* (Well y Raju). https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidadvegetal/xylella-fastidiosa_contingencia_marzo2021_tcm30-525545.pdf.

MAPA. (2021b). Informe sobre aplicación del régimen de autorizaciones de nuevas plantaciones de viñedo 2020 y potencial de producción vitícola en España (a 31 de julio de 2020).

MAPA. (2022). Frutos secos: Análisis de la realidad productiva 2021. https://www.mapa.gob.es/gl/agricultura/temas/producciones-agricolas/analisisdelarealidadproductivafrutossecos2021revisado11-11-2022_tcm37-635966.pdf

Vicent, A., Landa, B., Montesinos, E., Miranda, M. A., Sabaté, J., de la Rosa, R. (2019). *Proyecto de investigación sobre la lucha contra Xylella fastidiosa en España*. <https://www.coiaclc.es/wp-content/uploads/2019/01/xylella.pdf>.

