

Proyecto de investigación sobre la lucha contra *Xylella fastidiosa* en España

Por Antonio Vicent (Institut Valencià d'Investigacions Agràries), Blanca B. Landa (Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) - CSIC), Emilio Montesinos (Centro de Innovación y Desarrollo en Sanidad Vegetal (CIDSAV) - Universitat de Girona), Miguel Ángel Miranda (Institut de Investigacions Agroambientales y de Economía del Agua (INAGEA) - Universitat de les Illes Balears), Jordi Sabaté (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) y Raúl de la Rosa (Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA))

***Xylella fastidiosa* (Xf) es una bacteria de cuarentena para la Unión Europea (UE) que constituye, sin duda, la mayor amenaza emergente para la UE y los países mediterráneos por la gran variedad de plantas huéspedes a las que infecta, así como por su forma de transmisión mediante insectos vectores de diversa naturaleza. Dicha bacteria presenta un enorme potencial patogénico ya que infecta y causa enfermedad severa en diferentes cultivos agrícolas de gran importancia económica y en diferentes especies silvestres y forestales típicas del bosque mediterráneo.**

Con el objetivo de desarrollar estrategias de erradicación, contención y control de esta bacteria en España, acaba de iniciarse un proyecto de investigación financiado, por una parte, por la Agencia Estatal de Investigación y el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y, por otra, por la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español.

A finales del 2013, las autoridades fitosanitarias de la UE comunicaron la aparición de una epidemia devastadora en olivares de la península de Salento en Italia, asociada con *Xf*. Esta noticia causó una gran conmoción en el sector oleícola español y de otros países de la UE debido a la catastrófica situación fitosanitaria que se describía, por la forma 'súbita' y severa en la que aparecen los síntomas en la planta, así como en la rapidez con que la enfermedad se ha extendido desde el foco de primera detección. Desde entonces siguen apareciendo nuevos focos en la isla de Córcega y diversas localidades de la costa azul francesa y Alemania, y, hace escasamente unos días en la Toscana en Italia.

Desafortunadamente, en los últimos años se han detectado varios focos de *Xf* en España. Concretamente, en las islas de Mallorca, Menorca e Ibiza en 2016 y en la provincia de Alicante en 2017. En las Islas Baleares las plantas infectadas identificadas corresponden fundamentalmente a acebuche, olivo, almendro y vid, aunque se han descrito hasta 21 plantas hospedadoras distintas. En la Comunidad Valenciana, desde el

2017, afecta fundamentalmente a almendro en distintas comarcas en la provincia de Alicante, aunque también se ha identificado en otras siete especies vegetales ornamentales, silvestres y frutales. Además, *X. fastidiosa* se ha detectado recientemente en la Comunidad de Madrid en abril de 2018 afectando a un olivo en Villarejo de Salvanés, y también en abril de 2018 se ha detectado infectando plantas de *Polygala myrtifolia* en un invernadero en la localidad de El Ejido, Almería. Todas estas detecciones y la severidad de los síntomas que origina en diversas especies vegetales en muchos de los focos epidémicos reiteran la importancia de combatir a este patógeno de cuarentena de forma inmediata.

Es por ello que acaba de iniciarse un proyecto de investigación con el objetivo de desarrollar estrategias de erradicación, contención y control de *Xylella fastidiosa* (*Xf*) en España, que cuenta con la participación de investigadores especialistas en distintas disciplinas relacionadas con la lucha contra esta bacteria.

Dichos investigadores pertenecen a tres centros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía (IFAPA), el Instituto de Investigaciones y Tecnologías Agrarias (IRTA), el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Tecnológico (NEIKER-Tecnalia), el Instituto de Investigaciones Agroambientales y de Economía del Agua (INAGEA), Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón-Instituto Agroalimentario de Aragón IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza) y las Universidades de Valencia, Gerona y las Islas Baleares, y además participa personal de los servicios de sanidad vegetal de la Generalitat Valenciana y del laboratorio de sanidad vegetal (SEMILLA) y la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Pesca de las Islas Baleares. También cuenta con colaboradores de tres instituciones de EE. UU., Italia y Reino Unido.

Con este proyecto se pretende conocer mejor la variabilidad genética de la bacteria, así como sus vectores potenciales en España. También quiere contribuir al conocimiento de los métodos de propagación de la bacteria, la gama de especies huéspedes que pueden verse afectadas por la misma e identificar variedades con alto nivel de resistencia, dentro de los principales cultivos afectados. Por último, se va a proponer la creación de un grupo de trabajo nacional y otro internacional para discutir las estrategias más eficientes de muestreo, contención y erradicación de la enfermedad, implicando a los diferentes actores afectados (productores, viveristas y administraciones públicas).

Este proyecto coordinará sus esfuerzos con otros a nivel europeo que también están enfocados en la lucha contra esta bacteria (POnTE y XF-ACTORS).

Con una duración de tres años, dicho proyecto se estructura en seis subproyectos fundamentales con los objetivos específicos que se detallan a continuación.

1. Desarrollo de análisis de riesgos regionalizados y guías para optimizar los programas de erradicación de *Xf* y control de sus vectores potenciales

La bacteria *Xf* se distribuye principalmente en regiones tropicales, sub-tropicales, así como también en áreas de climas mediterráneos. Se han empleado diversas aproximaciones para clasificar las zonas geográficas según su idoneidad climática para *Xf*, pero la mayoría de estos estudios están restringidos a la enfermedad de Pierce en

vid, causada por la subespecie *fastidiosa* (Feil y Purcell, 2001). No obstante, los requerimientos climáticos para *Xf* pueden diferir según la subespecie o ST de la que se trate.

España presenta una gran diversidad en condiciones climáticas, edáficas, tipos de vegetación natural, sistemas de manejo de cultivo, flora arvense, etc. A esto hay que añadir las diferencias en las poblaciones de insectos vectores potenciales, con requerimientos ecológicos diversos, así como las diferentes subespecies y STs, que pueden condicionar el riesgo de establecimiento y dispersión del patógeno. Todo esto hace necesario el desarrollo de análisis de riesgos para *Xf* a escala regional, donde se integren las características agroclimáticas, vectores y diversidad genética del patógeno en cada zona (Figura 1).

Actualmente, la Decisión 789/2015/UE obliga a la destrucción de todas las plantas huésped en un radio de 100 m alrededor del foco donde se detecte *Xf*. Además se establece una zona demarcada adicional de 5 km, sometida a muestreos muy intensos e inmovilización de viveros. En su conjunto, estas medidas fitosanitarias para *Xf* suponen un elevado coste económico y medioambiental, y en algunos casos han provocado la oposición de los actores afectados (Abbot, 2015). Los radios de erradicación y demarcación establecidos actualmente por la legislación podrían ser optimizados aplicando estrategias más eficientes, como las de radio variable y otras basadas en modelos epidemiológicos (Hyatt-Twynam et al., 2017), que con una eficacia similar supondrían un menor arranque de árboles. Todo ello ayudaría a reducir los costes económicos y medioambientales de los programas de erradicación, favoreciendo su aceptación por parte de los actores implicados. Para ello las actividades concretas dentro de este paquete de trabajo son:

- Elaboración de un SIG con información cartográfica ambiental, climática y de distribución de cultivos y vegetación en las CCAA con mayor riesgo potencial de establecimiento de *Xf*.
- Elaboración de modelos de distribución de especies y mapas de riesgo de ocurrencia de *Xf* y sus vectores potenciales.
- Diseño de métodos de monitorización y muestreo de ecosistemas agrícolas y naturales que optimicen la determinación de la estructura de las poblaciones de *Xf*.
- Desarrollo de modelos para optimizar los programas de erradicación y contención de *Xf* y el control de sus vectores potenciales.

2. Establecer el diagnóstico, estructura genética y gama de huéspedes de las poblaciones de *Xylella fastidiosa* presentes en los focos epidémicos de España

En las diversas detecciones de *Xf* que han aparecido en la UE, se ha determinado la existencia de cuatro subespecies y diversas estirpes pertenecientes hasta a ocho grupos genéticos (STs) distintos. Este hecho es una prueba evidente de que en la UE han tenido lugar diferentes introducciones de la bacteria que han debido ocurrir de forma independiente (Figura 2). La distribución de *Xf* infectando no solo a olivo sino hasta más de 70 especies de plantas, unido a la confirmación experimental de su patogenicidad en diversos cultivos y plantas ornamentales y del medio silvestre, así

como la posibilidad de infecciones cruzadas en huéspedes no habituales y el riesgo de aparición de nuevos recombinantes genéticos en zonas donde coexisten varias subespecies reiteran la importancia de conocer con exactitud qué diversidad genética existe en nuestro país. Por ello, este paquete de trabajo tiene como objetivo fundamental el caracterizar la estructura genética de las poblaciones de *Xf* presentes en nuestro país, con vistas a determinar el rango potencial de plantas huésped que pueden ser infectadas por cada una de ellas y así poder establecer las medidas adecuadas para su erradicación, contención o control. Para ello las actividades concretas dentro de este paquete de trabajo son:

- Desarrollo de una herramienta basada en sistemas de secuenciación de nueva generación (NGS) para el estudio masivo de la diversidad genética de poblaciones de *Xf* y sus principales subespecies, que será validado con muestras naturalmente infectadas por la bacteria procedentes de zonas de las Islas Baleares y Alicante.
- Caracterización de la gama de huéspedes y la estructura genética de las poblaciones de *Xf* en zonas piloto de estudio de Baleares (preferentemente en las zonas bioclimáticas Tramuntana, Raiguer, Pla i Llevant, Migjorn en Mallorca, y en Menorca e Ibiza) y una en el foco de Alicante, que engloben ecosistemas agrícolas y naturales en la misma zona geográfica y donde el riesgo de ocurrencia de *Xf* y sus vectores potenciales haya sido determinado como elevado. En dichas zonas se muestrearán, en un radio de 1 km, todas las plantas demostradas huésped de las cepas europeas de *Xf* conocidas, así como las especificadas en la Decisión 2015/789/UE (huéspedes de todas las cepas de *Xf*). Se seleccionarán preferentemente plantas que presenten síntomas compatibles con *Xf*, o plantas asintomáticas en su defecto y la presencia de *Xf* se analizará mediante los protocolos de qPCR recomendados en el manual oficial EPPO (EPPO, 2018) y la subespecie/ST se determinará mediante análisis MLST convencional y mediante la tecnología de NGS desarrollada en este proyecto.
- Aislamiento, caracterización y secuenciación del genoma de aislados tipo de *Xf*. A partir de las muestras que resulten positivas para *Xf* se procederá a intentar el aislamiento de *Xf* según EPPO PM7/24(3) (EPPO, 2018) utilizando los medios de cultivo que ya se han demostrado efectivos. Los aislados se caracterizarán fisiológica y bioquímicamente por procedimientos microbiológicos estándar, y se determinarán los perfiles de proteínas totales de células enteras mediante la técnica de espectrometría de masas MALDITOF. Además, se secuenciarán al menos tres aislados de las distintas subespecies/STs que se han identificado hasta la fecha, obteniendo una anotación parcial del genoma. Por el momento se han secuenciado tres aislados de *Xf* subsp. *fastidiosa* de Mallorca y dos aislados de *Xf* subsp. *multiplex* de Alicante (Gomila et al., 2019; Landa et al., 2018; Giampetruzzi et al., 2019). Finalmente, se realizará un análisis genómico comparativo de los aislados secuenciados en España con los disponibles públicamente para establecer el posible origen geográfico y evolutivo de éstos.

3. Determinar la patogenicidad de aislados-tipo de *Xylella fastidiosa* presentes en España sobre los principales cultivos afectados, principalmente olivo, almendro y vid

Se están elaborando planes de bioseguridad y biocontención para la investigación con *Xf* en condiciones de contención biológica. La investigación se realiza bajo estrictas

condiciones de cuarentena, adaptadas a los requerimientos de la UE. Actualmente la mayoría de los grupos participantes disponen de la autorización oficial de acuerdo con la Directiva 2008/61/CE, siguiendo la recomendación de medidas de confinamiento de EPPO PM 3/64(1) para los diferentes niveles de bioseguridad. Para cada una de las instituciones se está elaborando un plan de bioseguridad y biocontención adaptado a las instalaciones disponibles y actividades a desarrollar en ellas. El plan aborda aspectos como la evaluación del riesgo biológico de *Xf*, elaboración de normas de bioseguridad teniendo en cuenta las particularidades de cada instalación, impartición de cursos de bioseguridad específicos para trabajar con *Xf*, y supervisión periódica de las instalaciones.

Se estudia la patogenicidad de aislados tipo de *Xf* presentes en España sobre cultivos de interés, en experimentos llevados a cabo mediante inoculaciones en condiciones controladas. Se trabaja con plantas huésped de *Xf* de relevancia económica en España, concretamente con especies de *Olea* (olivo, acebuche), *Prunus* (almendro, melocotonero), *Vitis* y ornamentales, y *Citrus*, níspero y caqui, incluyendo las variedades más representativas de interés comercial de cada cultivo. Dependiendo de la especie huésped se trabaja con material vegetal producido *in vitro*, estaquillas, mini-injerto, mini-plántulas, o plantas en maceta. En cuanto a *Xf*, se incluyen las tres principales subespecies (*fastidiosa*, *multiplex* y *pauca*) y STs identificados en las Islas Baleares y Alicante, así como cepas de referencia patógenas sobre cada uno de los cultivos a estudiar. Las cepas se inoculan en el material vegetal mediante microinyección, este se incuba en fitotrones en los laboratorios o en invernaderos de bioseguridad, y dicho material se mantiene incubado durante varios meses hasta la manifestación de los síntomas de la enfermedad. Además de evaluar los síntomas se determinan otros parámetros fisiológicos del huésped indicadores de estrés y se toman muestras para realizar estudios histológicos, en especial del xilema, mediante microscopía óptica y electrónica, y para analizar los niveles poblacionales de *Xf* para la cuantificación de tres estados fisiológicos como los niveles totales (qPCR convencional), y las células cultivables (medio PCYE) y viables (PMAX-qPCR). Se caracterizan los patrones de evolución de la enfermedad y del patógeno en base a tiempos de latencia, multiplicación, estacionario, muerte o declive. Los resultados de virulencia/agresividad de las cepas se comparan con la caracterización molecular obtenida en otros objetivos del proyecto. El espectro de huésped de las cepas y aislados, servirá para inferir las consecuencias epidemiológicas, y la dinámica de la población (total, viable, cultivable y VBNC), en relación con la evolución de los síntomas se contrastará con los resultados de campo.

También se estudiará la patogenicidad de aislados tipo de *Xf* presentes en España en experimentos mediante inoculaciones en condiciones naturales bajo confinamiento en zonas afectadas. Para validar las conclusiones obtenidas en las inoculaciones artificiales, se realizan experimentos mediante inoculaciones en condiciones naturales en zonas afectadas bajo umbráculo de contención según las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias ISPM10, 34, 36 y las medidas fitosanitarias PM 5/8 (1) de la EPPO (2016). Está previsto llevar a cabo estos experimentos en las Islas Baleares (INAGEA), aunque no se descarta en otros lugares de la península dependiendo de la detección de nuevos focos de la enfermedad condicionado a la obtención de la autorización oficial pertinente.

. Caracterizar el proceso de infección y la respuesta genotipo/fenotipo de variedades de los principales cultivos afectados

Uno de los aspectos de mayor interés en la actual situación que se está viviendo en España con *Xf* es determinar la relación entre síntomas y presencia de la bacteria en la planta, evaluar la respuesta de diferentes variedades de los principales cultivos frente a la infección natural por *Xf* y determinar cómo esa infección puede alterar los parámetros fisiológicos de la planta o estar relacionada con indicadores a nivel de la calidad del suelo. Por ello, el subproyecto 4 se estructura en tres objetivos.

El primer objetivo es caracterizar la dinámica estacional de los síntomas que aparecen en el cultivo y los niveles de infección mediante técnicas moleculares (qPCR) en variedades de olivo, acebuche, almendro y vid presentando respuesta diferencial a *Xf* en condiciones de campo en las Islas Baleares (Figura 3). Para ello, se han seleccionado una serie de parcelas en diferentes zonas bioclimáticas de las Baleares (Mallorca, Menorca e Ibiza) en las que se toman muestras a base de hojas y tallos de forma periódica de las especies de plantas de los cultivos de interés. Dichas muestras se analizan mediante métodos moleculares para determinar la presencia del patógeno e identificar la bacteria hasta el nivel de subespecie, así como realizar aislados para secuenciar el genoma de la bacteria. Además, en cada parcela se realiza una inspección visual en la que se determina la presencia de síntomas en las plantas seleccionadas.

El segundo objetivo del subproyecto incluye identificar y caracterizar genotípicamente las variedades de olivo, acebuche, almendro y vid que pueden presentar respuesta diferencial a *Xf* en condiciones de campo en las Islas Baleares. Para ello se caracterizan a nivel genético las variedades presentes en bancos de germoplasma de las Baleares, junto a material aportado por otros bancos a nivel español, en los que se determina la presencia de síntomas de infección a nivel visual y de la bacteria mediante métodos moleculares. De esta manera se identifica si hay alguna variedad de algunos de los cultivos de interés (p.e. olivo) que presenta capacidad de tolerancia y/o resistencia a la bacteria. En el caso de que así sea, también se contempla identificar aquellos genes que están implicados con la capacidad de resistencia.

Finalmente, el tercer objetivo trata sobre caracterizar los factores agronómicos y fisiológicos de los principales cultivos afectados mediante indicadores foliares, nutritivos y de calidad de suelo. Para ello, se han seleccionado una serie de árboles incluidos en el primer objetivo y en los que se realiza un seguimiento periódico de su fenología e indicadores fisiológicos asociados al estrés, como por ejemplo fluorescencia clorofílica o el contenido en carbono y nitrógeno. De esta forma, se pretende caracterizar fisiológicamente aquellos árboles que presentan una respuesta a la infección por *Xf*. Del mismo modo, se determinan los parámetros a nivel del suelo que permitan determinar su calidad y relación frente a la infección de *Xf* en la planta, como por ejemplo la caracterización físico-química del suelo rizosférico de los árboles, las actividades enzimáticas relacionadas con ciclos de nutrientes y la cuantificación de la biomasa microbiana.

5. Determinar la biología y ecología de los vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* en España y su papel en la epidemiología y el control de la enfermedad

El amplio rango de huéspedes de *Xf*, entre las que destacan la vid, el olivo, el almendro, los frutales de hueso y los cítricos, de gran importancia económica y social, junto con el hecho de que no exista un tratamiento curativo efectivo, hacen que las únicas herramientas de lucha disponibles se centren en evitar la dispersión de la enfermedad mediante cuarentenas, erradicaciones y control de la transmisión (Figura 4). *Xf* se transmite por multiplicación vegetativa de material infectado y de manera natural mediante homópteros que se alimentan del xilema. Son consideradas como potencialmente transmisoras las especies que se alimentan de xilema pertenecientes principalmente a las familias *Aphrophoridae*, *Cercopidae*, *Cicadellidae* (Subf *Cicadellinae*) y *Cicadidae* (EFSA, 2015). Hasta la confirmación del afrofórido *Philaenus spumarius* (Linnaeus, 1758) (*Hemiptera/Auchenorrhyncha*) como transmisor de *Xf* en el sur de Italia (Saponari et al., 2014), esta familia de insectos y otras que se alimentan del xilema no se habían considerado plagas relevantes para la agricultura, ya que viven preferentemente fuera de las plantaciones y solo tienen una generación al año. Por estas razones prácticamente no existían estudios sobre estos insectos desde un punto de vista agrícola ni productos registrados específicamente para su control en Europa. Recientemente se ha demostrado también la capacidad de transmisión de *P. italosignus* y *Neophilaenus campestris* (Cavaleri et al., 2018). *P. spumarius* es la especie más relevante en la dispersión de *Xf* en la zona mediterránea ya sea por abundancia, rango de huéspedes, distribución geográfica, eficiencia de transmisión y ciclo vital (Figura 5). Es por estas razones que el estudio y caracterización de la biología y los ciclos vitales de estos insectos, su relación con la transmisión de la bacteria y el control de sus poblaciones, sean pilares básicos para el control de la dispersión de la enfermedad. Con estos objetivos se han planteado las siguientes actividades de investigación dentro del quinto paquete de trabajo:

- Biología, ecología, dinámica y fauna útil asociada de potenciales especies transmisoras de *Xf* en diversos cultivos y condiciones agroclimáticas amenazadas en España.
- Evaluación del potencial de adquisición y transmisión de *Xf* por especies de insectos. Correlación entre capturas, incidencia, huéspedes y subespecies.
- Ensayos de control de vectores y de la transmisión de *Xf* mediante la evaluación de insecticidas, manejos, repelentes y enemigos naturales para establecer estrategias globales de control integrando las diferentes herramientas.

6. Establecer las bases científicas para desarrollar acciones de transferencia y comunicación sobre las enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa*

En el presente proyecto se entiende que la difusión es una parte esencial del mismo. Por ello se han propuesto las siguientes acciones para dar visibilidad a los resultados que se vayan generando en el proyecto:

- Organizar jornadas con asociaciones de productores y con funcionarios de agricultura de las distintas administraciones para difundir los resultados del proyecto y proponer mejoras en las medidas de contención y/o erradicación de la enfermedad.
- Asistencia a los comités consultivos sobre *Xf* organizados por los servicios de sanidad vegetal de las CC. AA. y el Mapama.

- Elaborar documentos informativos para incorporar a plataformas virtuales de difusión. Divulgar los resultados obtenidos con el proyecto a través perfiles de redes sociales de las Instituciones implicadas en el proyecto y en programas de tv y radio con los que habitualmente colaboran.
- Clases en cursos de máster en distintas universidades.
- Artículos en revistas científicas y de difusión, de los que este artículo es un primer ejemplo.

En definitiva, con este proyecto se pretende aumentar el conocimiento sobre esta enfermedad que puede afectar a un considerable número de cultivos de interés económico y social en España, y utilizar dicho conocimiento para mejorar o proponer nuevas medidas de lucha y erradicación de *Xylella fastidiosa*.