

Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*

Blanca B. Landa
Ester Marco-Noales
María Milagros López
(coordinadoras)

Monografías [32]

**Enfermedades causadas
por la bacteria *Xylella fastidiosa***

Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*

**Blanca Landa
Ester Marco-Noales
María Milagros López
(coordinadoras)**



Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*

© 2017 del texto y las imágenes que se reproducen (excepto mención expresa): los autores

© 2017 de la edición: Cajamar Caja Rural

Edita: Cajamar Caja Rural

www.publicacionescajamar.es

publicaciones@cajamar.com

ISBN-13: 978-84-95531-86-5

Depósito Legal: AL-2159-2017

Diseño y maquetación: Beatriz Martínez Belmonte

Imprime: Escobar Impresores SL

Fecha de publicación: noviembre de 2017

Impreso en España / Printed in Spain

Cajamar Caja Rural no se responsabiliza de la información y opiniones contenidas en esta publicación, siendo responsabilidad exclusiva de sus autores.

© Todos los derechos reservados. Queda prohibida la reproducción total o parcial de esta publicación, así como la edición de su contenido por medio de cualquier proceso reprográfico o fónico, electrónico o mecánico, especialmente imprenta, fotocopia, microfilm, offset o mimeógrafo, sin la previa autorización escrita de los titulares del Copyright.

Prólogo	13
---------------	----

Presentación.....	15
-------------------	----

Capítulo 1. <i>Xylella fastidiosa</i> y las enfermedades que causa.	
Un problema global.....	19

Ester Marco-Noales, Blanca B. Landa y María M. López

1. Introducción	19
2. Cronología de algunas de las enfermedades causadas por <i>X. fastidiosa</i>	20
3. Variantes de <i>X. fastidiosa</i> y su distribución geográfica	24
4. Gama de huéspedes	27
5. Generalidades sobre la sintomatología de las enfermedades causadas por <i>X. fastidiosa</i>	30
6. Importancia económica.....	32
7. Riesgo de introducción de <i>X. fastidiosa</i> en países de la UE	34
8. Intercepciones de <i>X. fastidiosa</i> en la UE	35
Agradecimientos.....	37
Referencias bibliográficas	37

Capítulo 2. Características generales de <i>X. fastidiosa</i>.....	47
---	-----------

Blanca B. Landa, Juan A. Navas Cortés y Miguel Montes Borrego

1. Descripción taxonómica, características fenotípicas y genotípicas	47
2. Biología y ecología.....	51
3. Factores asociados a la virulencia	53
Agradecimientos.....	56
Referencias bibliográficas.....	56

Capítulo 3. Epidemiología.....	61
---------------------------------------	-----------

Juan A. Navas Cortés, Miguel Montes Borrego y Blanca B. Landa

1. Introducción	61
2. Patrón de distribución espacial de epidemias causadas por <i>Xylella fastidiosa</i> ...	61
3. Supervivencia y variación estacional de las poblaciones de <i>Xylella fastidiosa</i> ...	63
4. Tipos de clima en que se desarrolla <i>Xylella fastidiosa</i>	65
5. Idoneidad climática para el desarrollo de epidemias causadas por <i>Xylella fastidiosa</i> en España	66
Agradecimientos.....	69
Referencias bibliográficas.....	70

Capítulo 4. Vectores de <i>Xylella fastidiosa</i>	73
--	-----------

Marina Morente y Alberto Ferreres

1. Introducción	73
2. Vectores conocidos de <i>Xylella fastidiosa</i>	73

3. Vectores de <i>Xylella fastidiosa</i> en el continente americano	74
4. Vectores de <i>Xylella fastidiosa</i> en Europa	75
5. Biología y ecología de los insectos vectores de <i>X. fastidiosa</i>	78
5.1. <i>Cicadellidae: Cicadellinae</i>	78
5.1.1. Ciclo biológico	78
5.1.2 Distribución geográfica	78
5.1.3 Hábitos de alimentación	79
5.2. <i>Cercopoidea</i>	79
5.2.1 Ciclo biológico	79
5.2.2. Distribución geográfica	81
5.2.3 Hábitos de alimentación	81
6. Transmisión de <i>Xylella fastidiosa</i>	82
6.1. <i>Adquisición</i>	82
6.2. <i>Inoculación</i>	83
7. Medidas de control de los vectores de <i>Xylella fastidiosa</i>	83
Referencias bibliográficas.....	85

Capítulo 5. Métodos de inspección, diagnóstico y detección95

María M. López, Blanca B. Landa y Ester Marco-Noales

1. Introducción y métodos de inspección y muestreo	95
2. Diagnóstico de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas con síntomas	98
3. Detección de <i>Xylella fastidiosa</i> en plantas asintomáticas	99
4. Detección de <i>Xylella fastidiosa</i> en insectos vectores	100
5. Protocolos de análisis de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)	101
6. Métodos de análisis	103
6.1. <i>Métodos moleculares</i>	103
6.2. <i>Métodos serológicos</i>	106
6.3. <i>Aislamiento</i>	107
6.4. <i>Pruebas de patogenicidad</i>	108
6.5. <i>Observación mediante microscopía electrónica</i>	109
7. Identificación de <i>X. fastidiosa</i> y de sus subespecies	111
Agradecimientos.....	113
Referencias bibliográficas	113

Capítulo 6. Análisis de riesgos117

Antonio Vicent

1. Conceptos sobre análisis de riesgos de patógenos vegetales.....	117
2. Posibles vías de entrada de la bacteria	118
2.1. <i>Semillas y frutos</i>	118
2.2. <i>Flor cortada y madera</i>	119
2.3. <i>Material vegetal de plantación o con fines de investigación</i>	119

2.4. Insectos vectores.....	122
3. Riesgo de establecimiento.....	123
4. Riesgo de dispersión.....	127
5. Conclusiones del análisis de riegos.....	129
Referencias bibliográficas	130

Capítulo 7. Métodos de control 135

Juan A. Navas Cortés, Miguel Montes Borrego y Blanca B. Landa

1. Introducción	135
2. Exclusión	135
3. Erradicación	137
4. Escape	139
5. Resistencia del material vegetal	140
6. Terapia.....	143
7. Aspectos legislativos españoles y de la UE que deben ser considerados por el agricultor.....	143
Agradecimientos.....	146
Referencias bibliográficas	146

Capítulo 8. Enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa* en Estados Unidos y Costa Rica 149

Leonardo De La Fuente, Carlos Chacón-Díaz y Rodrigo P. P. Almeida

1. Introducción y perspectiva histórica	149
1.1. Historia del descubrimiento de que una bacteria <i>fastidiosa</i> es responsable de enfermedades de etiología desconocida.....	150
1.2. Epidemias en Estados Unidos	151
1.3. Esfuerzos conjuntos de los científicos, los productores y el gobierno.....	153
2. Enfermedades que causa <i>Xylella fastidiosa</i> en Estados Unidos.....	154
3. La enfermedad de Pierce de la vid.....	158
4. El chamuscado bacteriano de la hoja del arándano	161
5. Enfermedades que causa <i>X. fastidiosa</i> en Costa Rica.....	163
5.1. La crespada del café	164
5.2. Cronología de la investigación de enfermedades causadas por <i>X. fastidiosa</i> en Costa Rica	164
5.3. Implicaciones económicas y sociales.....	165
6. Medidas de manejo de las enfermedades causadas por <i>X. fastidiosa</i> en EEUU	166
6.1. Regulaciones en California	166
6.2. Estrategias de manejo de las enfermedades causadas por <i>X. fastidiosa</i>	167
6.3. Medidas en desarrollo para el control y manejo de las enfermedades causadas por <i>X. fastidiosa</i>	168
Agradecimientos.....	169
Referencias bibliográficas	170

Capítulo 9. *Xylella fastidiosa* en Brasil177

Edson Bertolini, Silvio Lopes y Luís Otávio Saggion Beriam

1. Introducción	177
2. <i>Xylella fastidiosa</i> en cítricos	178
3. <i>Xylella fastidiosa</i> en cafeto	183
4. <i>Xylella fastidiosa</i> en ciruelo.....	186
5. <i>Xylella fastidiosa</i> en olivo.....	188
Referencias bibliográficas.....	189

Capítulo 10. *Xylella fastidiosa* en Italia en olivo y otras especies ...195

Donato Boscia, Maria Saponari, Giovanni P. Martelli

1. Introducción y situación de <i>Xylella fastidiosa</i> en Italia	195
2. El decaimiento rápido del olivo	195
3. Programa de seguimiento y monitorización de la epidemia.....	199
4. Gama de huéspedes en Italia.....	200
5. Diseminación de la enfermedad.....	202
6. Medidas de control.....	203
Agradecimientos.....	208
Referencias bibliográficas	208

Capítulo 11. *Xylella fastidiosa* en Francia en ornamentales y otras especies.....211

Juliette Auricoste, Pierre Claquin, Nicolas Denancé, Marie-Agnès Jacques, Pauline de Jerphanion, Saoussen Joudar, Bruno Legendre, Valérie Olivier y Françoise Poliakkoff

1. Situación fitosanitaria con respecto a <i>Xylella fastidiosa</i> en Francia	211
2. Organización y evaluación de la vigilancia en Francia.....	213
2.1. Estructuración de la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria francesa relativa a <i>Xylella fastidiosa</i>	213
2.2. Plan de vigilancia de <i>X. fastidiosa</i>	213
2.2.1. Vigilancia programada oficial.....	214
2.2.2. Vigilancia programada no oficial.....	215
2.2.3. Vigilancia de eventos	215
2.3. Optimización de la vigilancia y el análisis de datos en el marco de la plataforma de vigilancia epidemiológica	216
2.4. Puesta en práctica de las medidas de lucha en los focos.....	218
2.5. Balance de la vigilancia en Francia.....	218
2.5.1. Córcega: una importante cobertura del territorio, inclusive en el medio natural.....	219
2.5.2. PACA: una presencia esporádica en medio urbano.....	220

3. Detección de <i>X. fastidiosa</i>	221
3.1. Métodos de análisis utilizados en el marco de la vigilancia oficial	221
3.1.1. Organización de los laboratorios franceses en el marco de la vigilancia de <i>Xylella fastidiosa</i>	221
3.1.2. Método oficial de detección de <i>Xylella fastidiosa</i>	223
3.2. Labores de investigación adicionales acerca de los métodos de análisis y perspectivas de optimización	226
4. Perspectivas	227
Agradecimientos	227
Referencias bibliográficas	227

Capítulo 12. *X. fastidiosa* en las Islas Baleares.....231

Diego Olmo, Alicia Nieto, David Borràs, Marina Montesinos, Francesc Adrover, Alejandro Urbano, Aura Pascual, Eduardo Moralejo, Juan de Dios García, Omar Beidas y Andreu Juan

1. Situación de <i>Xylella fastidiosa</i> en las Islas Baleares	231
1.1. Antecedentes	231
1.2. Primer brote de <i>X. fastidiosa</i>	232
1.3. Situación actual de las detecciones de <i>Xylella fastidiosa</i>	233
1.4. Vectores.....	234
2. Detección de <i>Xylella fastidiosa</i> en olivo, almendro, vid, frutales y ornamentales	234
2.1. Hospedantes, subespecies y genotipos en las Islas Baleares.....	234
2.2. Síntomas observados.....	242
2.3. Aislamiento de la bacteria	255
3. Medidas de control.....	255
3.1. Aplicación de las medidas de la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789 ...	256
3.2. Prohibición de salida de material vegetal especificado de las Islas Baleares y desde Ibiza al resto de islas	258
3.3. Buenas prácticas para la prevención de <i>Xylella fastidiosa</i>	258
4. Aplicación del plan de actuación para combatir <i>Xylella fastidiosa</i> en las Islas Baleares	259
Referencias bibliográficas	260

Capítulo 13. *Xylella fastidiosa* en la Comunidad Valenciana.....263

Montserrat Roselló, Amparo Ferrer, Cristina Peris-Peris, Joan Màxim Llopis, Elías Rallo, Bryan Pacheco, Eva Climent, Ana M. Moreno, Esperanza Sansaloni, M. Fernanda Gómez, Vicente Nebot, Lourdes Rius, M. Dolores Jorge, Ismael Serrablo, Jose Vicente Saéz, Francisco Piñeiro, Susana Úbeda, Rafael Estivalis, Carola Aragón y Vicente Dalmau

1. Introducción	263
2. Primer brote de <i>Xylella fastidiosa</i> detectado en la Comunidad Valenciana ...	266
3. Sintomatología de <i>Xylella fastidiosa</i> en almendro	268
4. Situación actual de <i>Xylella fastidiosa</i> en la Comunidad Valenciana	271
Referencias bibliográficas	275

Capítulo 14. Legislación en Europa relacionada con *Xylella fastidiosa*, planes de contingencia y de acción frente a la enfermedad.....277

Ricardo Alarcón Roldán

1. Legislación en la UE, antecedentes	277
2. Legislación en la UE y en España: evolución y situación actual.....	279
3. Requisitos legales para la producción y entrada en la UE de material vegetal sensible	284
3.1. Producción y movimiento de vegetales especificados dentro de la UE....	284
3.2. Requisitos para la entrada de material vegetal a la UE procedente de terceros países.....	286
4. Plan de contingencia del MAPAMA y planes de acción autonómicos....	288
5. Medidas a adoptar en caso de sospecha o introducción de la bacteria.....	297
5.1. Actuaciones en caso de sospecha de presencia de X. fastidiosa	297
5.2. Medidas a adoptar en caso de confirmación de presencia de <i>X. fastidiosa</i>	299
5.2.1 Delimitación de zonas demarcadas e información a recabar	300
5.2.2. Medidas de erradicación	302
5.2.3. Medidas para evitar propagación.....	303
Referencias bibliográficas.....	304

Capítulo 15. Consideraciones sobre la situación de *Xylella fastidiosa* en la Unión Europea y en España. Conclusiones y perspectivas.....305

María M. López, Ester Marco-Noales y Blanca B. Landa

1. Situación de <i>Xylella fastidiosa</i> en Europa	305
2. Situación de <i>Xylella fastidiosa</i> en España	308
3. Diversidad genética y huéspedes potenciales	309
4. Legislación y su cumplimiento	311
5. Necesidad de incrementar las prospecciones y los análisis de <i>Xylella fastidiosa</i> en España.....	313
6. Necesidad de incrementar la investigación sobre <i>X. fastidiosa</i>	314
7. Perspectivas	316
Agradecimientos.....	318
Referencias bibliográficas.....	318

Prólogo

En Cajamar Caja Rural siempre hemos creído en la potencialidad del sector agroalimentario para generar riqueza y empleo en los territorios. A lo largo de nuestra historia hemos ido creando los productos y servicios financieros que han acompañado el crecimiento de los agricultores y de las empresas. Y hemos sido testigos privilegiados de un dinamismo que ha situado a España entre los países más modernos y competitivos en la producción y comercialización de alimentos.

Nuestro apoyo al sector no se ha limitado a la mera actividad financiera sino que, desde muy temprano en la vida de nuestra entidad, apostamos también por la generación y transferencia del conocimiento. Siempre hemos considerado que la investigación y la formación son dos poderosas herramientas que contribuyen a la modernización y la competitividad de cualquier actividad económica. Y muy especialmente en el caso de la agricultura. Dentro de las estructuras de apoyo con que contamos cabe mencionar nuestras estaciones experimentales, el servicio de estudios, el centro de formación técnica y empresarial y la editorial especializada en temas agroalimentarios.

Una parte importante de nuestra actividad está orientada al desarrollo y la implementación de nuevas tecnologías que permitan al sector ser más eficiente y productivo en la obtención de alimentos. También nos preocupamos por apoyar el avance del sector productor en la cadena de valor, para que consiga una remuneración más justa por sus productos y para que una parte relevante del valor generado en los procesos de transformación y comercialización repercutan sobre el territorio en el que se asientan. Y nos interesan las preocupaciones e inquietudes de los consumidores, porque ellos son los destinatarios finales de los alimentos, y porque a través de una alimentación sana y equilibrada gozaremos de un mayor nivel de bienestar.

En ocasiones nuestro interés se centra en buscar soluciones a problemas o transformaciones que afectan al sector agroalimentario, que pueden ser de carácter social, de mercados o técnicos. Y en este último ámbito podemos situar la obra que presentamos.

Los riesgos fitosanitarios han tenido una gran incidencia sobre la evolución de las producciones agropecuarias. La capacidad y la velocidad con la que se dispone de respuestas adecuadas influyen de manera decisiva sobre la posición competitiva en la que queda el sector afectado.

En el caso que nos ocupa, no es necesario justificar la importancia que tienen en España algunas de las producciones agrarias que pueden verse afectadas por el ataque de Xylella fastidiosa. Por ello, la detección de las primeras plantas infectadas en Italia, en el año 2013, provocó un cierto estado de alerta entre las distintas organizaciones y equipos que velan por el correcto estado fitosanitario de los cultivos en España. En este tiempo se ha generado un intenso e interesante trabajo que permite conocer las distintas cepas y comportamientos de la bacteria, su forma de actuar y los efectos que tiene sobre los distintos cultivos, así como los vectores que permiten su transmisión. A partir de esta información se han generado métodos de inspección y diagnóstico, para poder detectar su presencia con la mayor rapidez posible y establecer los sistemas de control adecuado.

Sin lugar a dudas, la Xylella fastidiosa es una amenaza para ciertos cultivos relevantes de la agricultura española, pero el trabajo desarrollado por los profesionales que están especializados en esta bacteria nos permite confiar que dispondremos de las herramientas necesarias para minimizar los daños.

Con nuestra labor editorial pretendemos facilitar la transferencia del conocimiento que atesoran nuestros científicos, para que pueda llegar a la base más amplia de los profesionales que desarrollan su actividad en el sector agroalimentario.

El libro que aquí presentamos ha sido coordinado magníficamente por tres investigadoras adscritas a dos de los centros de investigación que más esfuerzos y recursos están dedicando al estudio de Xylella fastidiosa. Blanca Landa, desde el Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC, y Ester Marco y María Milagros López, desde el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. A ellas queremos dirigirle nuestro más sincero agradecimiento por la encomiable labor que han realizado en la preparación de una obra de indudable valor.

Igualmente, queremos dar las gracias a todos los autores que generosamente han puesto a disposición de los lectores una parte muy valiosa de su saber.

Para Cajamar Caja Rural una de nuestras principales obligaciones y labores de responsabilidad con la sociedad es la de contribuir al desarrollo de los territorios en los que nos asentamos y mejorar la calidad de vida de la población. Con este tipo de trabajos deseamos avanzar en ese camino.

Roberto García Torrente
Director de Innovación Agroalimentaria
Cajamar Caja Rural

Presentación

*El interés científico, fitopatológico, técnico y mediático suscitado en España por la bacteria *Xylella fastidiosa* no es comparable al despertado por ningún otro tema relacionado con la sanidad vegetal en las últimas décadas. A pesar de la cantidad de información disponible sobre este patógeno, no toda tiene el rigor necesario y por ello este libro pretende ofrecer información fiable, proporcionada por los expertos españoles en el tema y por investigadores de otros países con amplia experiencia en esta bacteria.*

*Su génesis surgió del encargo que nos hizo Cajamar en 2015 tras una jornada técnica sobre la amenaza de *X. fastidiosa* para el olivar que se organizó en Antequera en septiembre de 2015, y que coincidió con la demanda de los profesionales del sector agrario ante la carencia de una herramienta de consulta sobre la enfermedad causada por *X. fastidiosa* en olivo. Pero el objetivo de las coordinadoras al redactar el índice y los puntos a tratar en cada capítulo ha sido proporcionar una visión de conjunto de la bacteria y de las distintas enfermedades que causa porque, como se verá, *X. fastidiosa* es mucho más que el agente causal de la tragedia del olivo del sur de Italia. Prueba de ello es que cuando el índice se gestó, no se había detectado la bacteria aún en las Islas Baleares, y ha sido a última hora cuando hemos tenido que incluir un capítulo más tras su detección en Alicante.*

*El libro incluye 15 capítulos que pretenden ofrecer una revisión actualizada, pero también realista, práctica y crítica del estado actual de los conocimientos sobre esta bacteria y las enfermedades (bacteriosis) de las que es responsable. Consta de nueve capítulos generales y de seis más específicos sobre la situación y la problemática de las enfermedades producidas por *X. fastidiosa* en América y en Europa, incluyendo España. La lectura de los distintos capítulos nos lleva a profundizar en el complejo sistema que constituyen *X. fastidiosa*, sus plantas huéspedes, sus vectores y las condiciones medioambientales del entorno.*

Creemos que se ha logrado que cada tema se trate con rigor académico, pero también que sirva como fuente básica de conocimiento para estudiantes, técnicos y profesionales de la sanidad vegetal, así como para todos los actores que participan en los distintos eslabones de la cadena de valor agrícola, desde la producción hasta la comercialización. Todos los autores, con su profundo conocimiento del tema, han conseguido que en cada capítulo el lector encuentre aspectos de interés científico y técnico, pero combinados con aspectos prácticos, y con un lenguaje comprensible para el público español y esperamos que también para el de los países de habla hispana.

*Y, además, el libro nace con gran oportunidad, en un momento clave, porque se está empezando a escribir la historia de *X. fastidiosa* en España y tenemos que agradecer y reconocer que la persistencia de Juan José Hueso ha sido determinante para llevar a término esta publicación. A lo largo de los distintos capítulos se puede constatar cómo la generación de nuevos conocimientos ha sido y es imprescindible para que las estrategias de exclusión, erradicación y contención puedan ser llevadas a cabo con base científica.*

Este libro ha sido concebido desde el principio como una obra realizada en colaboración, y la mayor dificultad para las coordinadoras no ha sido convencer a los distintos autores que aceptaron inmediatamente embarcarse en esta aventura, sino la necesidad de utilizar un lenguaje común en temas muy diversos y de evitar duplicidades. Por ello, valoramos la conveniencia de incluir una etapa de correcciones y de homogeneización, que ha requerido un esfuerzo adicional de los autores, a los cuales expresamos de nuevo nuestro agradecimiento.

*Las coordinadoras consideramos que este libro nace en 2017 como una obra abierta, que debería ser ampliada en el futuro próximo con la actualización de datos y de nuevo conocimiento. Porque hemos aprendido que la historia de *X. fastidiosa* en el ámbito mundial se va escribiendo día a día. Prueba de ello es que seguramente durante la impresión de este libro se publique una nueva normativa comunitaria de obligado cumplimiento en los Estados miembros y que nos ha sido imposible recoger en esta edición.*

Los contenidos recogidos en este libro ven la luz gracias al apoyo e interés de Cajamar y la participación de muchos de los mejores grupos especializados en este tema en España y en el extranjero. Desde aquí las coordinadoras quieren agradecer a todos ellos su disponibilidad, su trabajo y su esfuerzo generoso y desinteresado para conseguir sintetizar sus conocimientos sobre esta misteriosa bacteria. Y deseamos que los lectores aprecien la dedicación que hay detrás de cada uno de los capítulos y disfruten y aprendan con su lectura, ya que tanto Cajamar como las coordinadoras y los autores han querido ofrecer un recurso didáctico básico, preciso y ameno. Así, todo el que esté interesado podrá acercarse al mundo y el entorno de X. fastidiosa desde diversos ángulos y a través de distintas experiencias, y podrá acertar a comprender el riesgo real que supone esta bacteria ya que es un problema que nos afecta a todos.

Blanca Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López
Coordinadoras

Xylella fastidiosa y las enfermedades que causa

Un problema global

Ester Marco-Noales^a, Blanca B. Landa^b y María M. López^a

^aInstituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (España, Valencia, Moncada)

e ^bInstituto de Agricultura Sostenible-CSIC (España, Córdoba)

1. Introducción

Xylella fastidiosa está considerada como la bacteria que constituye la principal amenaza hoy día para distintos cultivos de gran importancia estratégica, en todos los países donde aún no está presente. Por ello, es una bacteria de cuarentena en la Unión Europea (UE) desde el año 2000, según la Directiva 2000/29/EC, y también está incluida en la lista A1 de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (EPPO) (<http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA1.htm>). Su peligro radica en que es el agente causal de numerosas enfermedades muy graves, que podrían tener enormes repercusiones económicas para distintos cultivos europeos y muy especialmente para la economía española, dado que puede afectar a olivo, vid, cítricos, frutales de hueso, almendro y numerosas especies ornamentales y forestales.

Su nombre específico denota dos características de esta bacteria: que habita en el xilema de las plantas hospedadoras (*Xylella*) y que tiene un crecimiento muy lento en los medios de cultivo microbiológicos (*fastidiosa*). Es transmitida de forma persistente por distintas especies de insectos chupadores del xilema de los huéspedes a los que afecta (Capítulo 4). De hecho, *X. fastidiosa* coloniza dos hábitats: el xilema de las plantas hospedadoras y el intestino anterior de los insectos chupadores de savia bruta que son vectores de la bacteria (Almeida y Nunney, 2015).

Actualmente, *X. fastidiosa* es la bacteria de mayor resonancia mediática a nivel internacional, con especial relevancia en la UE, donde ha pasado de ser una bacteria de cuarentena solamente conocida por los fitopatólogos a ser considerada el principal peligro para importantes cultivos. En Europa la alarma se disparó en 2013 con la detección de un importante brote de *X. fastidiosa* en el sur de Italia (Saponari *et al.*, 2013), donde ha arrasado miles de hectáreas de olivar en Apulia. Sin embargo, como veremos a lo largo de este li-

bro, también supone un grave riesgo para la vid, los frutales de hueso (ciruelo, melocotonero), los cítricos, el almendro y numerosas especies frutales, ornamentales y forestales de los países mediterráneos. No obstante, el impacto real de esta bacteria en los distintos países de la UE dependerá de las circunstancias concretas del lugar de su introducción y de los huéspedes y vectores locales. No puede descartarse que el patógeno esté ya presente en diversos países, en zonas localizadas, y que pase inadvertido debido a la falta de especificidad de los síntomas, la ausencia de vectores eficientes, o a que no se hayan utilizado los procedimientos diagnósticos sensibles y específicos que son estrictamente necesarios para su diagnóstico.

En este primer capítulo se resumen algunas características de las enfermedades causadas por esta bacteria en sus principales huéspedes. Pero es necesario señalar que *X. fastidiosa* se ha convertido en la bacteria más imprevisible de todas las que afectan a las plantas cultivadas, dada la gran diversidad de sus cepas, los numerosos vectores que la transmiten, que pueden ser distintos en cada país, y la larga lista de huéspedes a los que puede afectar y que, además, varía de un país a otro en función de los vectores y las subespecies presentes. Aunque se sabe mucho sobre *X. fastidiosa*, hay todavía muchas más preguntas por responder que respuestas para ellas, tanto respecto a la biología de las distintas subespecies de esta especie como a su epidemiología en distintos huéspedes. Y, desgraciadamente, hoy por hoy se carece de métodos eficientes y sostenibles para su control integrado.

2. Cronología de algunas de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*

La historia de *X. fastidiosa* tiene ya más de un siglo, porque el primer síndrome conocido causado por esta bacteria fue descrito en 1887 por Newton Barris Pierce, cuando una extraña patología arrasó miles de hectáreas de vid en Los Ángeles (California) (Janse y Obradovic, 2010). En homenaje al formidable trabajo de aquel científico, la enfermedad se denominó en 1930 enfermedad de Pierce (*Pierce disease* o PD) (Gardner y Hewitt, 1974) (Capítulo 8). Posteriormente, en la década de 1940 se demostró la transmisión de la enfermedad por vectores (Purcell, 2013; Janse y Obradovic, 2010). Sin embargo, el agente causal no se aisló en cultivo hasta 1978 (Davis *et al.*, 1978). Y no fue hasta 1987 cuando esta bacteria fue adecuadamente descrita, clasificada y denominada como la única especie de un nuevo género, recibiendo el

nombre de *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). Hoy en día, la enfermedad de Pierce sigue siendo una gran preocupación para los productores del sur de EEUU. De hecho, en la primera década de este siglo XXI, *X. fastidiosa* era considerada como una de las mayores amenazas para diversos cultivos de varios países americanos (Hopkins y Purcell, 2002). Una vez que *X. fastidiosa* se aisló en medio de cultivo de laboratorio y se describió, empezó a encontrarse en muchos otros huéspedes además de la vid, tanto en plantas con síntomas como sin síntomas. Entre ellas están *Prunus* spp., *Acer* spp., *Carya illinoensis*, *Coffea arabica*, *Citrus*, *Hedera helix*, *Morus rubra*, *Nerium oleander*, *Platanus occidentalis*, *Quercus* spp., *Ulmus americana*, *Medicago sativa*, *Vinca major*, *Persea americana*. La caracterización de *X. fastidiosa* culminó con la secuenciación del genoma completo de una cepa de cítricos (Almeida *et al.*, 2000), siendo la primera bacteria fitopatógena de la que se secuenció todo el genoma, lo que da idea de la importancia que este patógeno ha ido adquiriendo.

Ya desde la primera década del siglo XX, esta bacteriosis fue considerada como una de las grandes amenazas para el cultivo de la vid, y en la actualidad lo sigue siendo en el sur de los EEUU, donde se ha convertido en las dos últimas décadas en un factor limitante para la producción. Ello es debido, principalmente, a la introducción en California en la década de 1990 de un vector exótico muy eficiente en la transmisión de la bacteria y de difícil control, *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) (Chatterjee *et al.*, 2008). Respecto a la vid en Europa, aunque existe un trabajo publicado en 1998 en el que se diagnosticaba la bacteria en viñedos de Kosovo (Berisha *et al.*, 1998), la presencia de *X. fastidiosa* en dicha especie no se ha podido confirmar en aquel país. Además, también existen citas, pero igualmente con resultados no confirmados, de introducciones de la bacteria en material importado de vid en Francia, procedente de viveros de EEUU (EPPO Reporting Service 500/02, 505/13, 1998/9).

En 1987, *X. fastidiosa* fue asociada en Brasil a una grave enfermedad observada en distintas variedades de naranjo dulce, que producía clorosis en hojas y decaimiento de los árboles, haciéndolos económicamente improductivos y a la que se denominó clorosis variegada de los cítricos (*citrus variegated chlorosis* o CVC) (Chang *et al.*, 1993; Hartung *et al.*, 1994). Se demostró que esa bacteriosis estaba causada por *X. fastidiosa* subsp. *pauca* y hasta la fecha solo ha sido diagnosticada en Brasil y en áreas restringidas de Argentina, Paraguay y Costa Rica (Brlansky *et al.*, 1991; Hartung *et al.*, 1994; Coletta y Machado, 2003; Aguilar *et al.*, 2005) (Capítulo 9). Veinte años después de la primera

detección en Brasil se estimaba que más del 40 % de los 200 millones de naranjos que hay en el estado de Sao Paulo y en el triángulo minero del estado de Minas Gerais estaban infectados por *X. fastidiosa* (Bové y Ayres, 2007).

En 2012 saltó una primera alarma en Francia, porque tuvo lugar la detección de la bacteria en plantas de cafeto (*Coffea arabica* y *C. canephora*), que procedían de Ecuador y México (Legendre *et al.*, 2014), pero eran plantas confinadas en invernadero y el brote se erradicó (ANSES, 2012; EPPO 2012; EFSA PLH Panel, 2015).

En 2013 se descubrió que la bacteria había pasado de nuevo del continente americano al europeo, cuando la enfermedad denominada decaimiento súbito del olivo u OQDS (*Olive Quick Decline Syndrome*) fue identificada por primera vez en la región de Apulia, en el sureste de Italia, y se demostró que en las plantas afectadas estaba presente *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Saponari *et al.*, 2013). Hasta entonces esta subespecie solo se había detectado en cítricos y en cafeto en Brasil y en plantas ornamentales en Costa Rica. La identificación de *X. fastidiosa* en los olivos afectados representó la primera detección confirmada de esta bacteria en la UE. En Apulia, *X. fastidiosa* es transmitida por *Philaelus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) (Saponari *et al.*, 2014), que ha demostrado ser un vector extremadamente eficiente y abundante. Desde la detección de ese brote inicial, la bacteriosis se ha extendido por toda la región de Apulia, causando enormes pérdidas económicas y medioambientales y afectando a numerosas especies cultivadas y silvestres (Capítulo 10). Pero hasta ahora, en ningún caso se han encontrado plantas de vid o cítricos infectadas, o con resultado positivo, en los análisis efectuados. Tras la primera detección de la bacteria en Italia, la UE publicó una legislación de obligado cumplimiento que dio lugar a la puesta en marcha de medidas para contener su expansión más allá de la zona de la primera detección, e impedir que pudiese ser dispersada a otras zonas oleícolas en la UE mediante la distribución de material vegetal infectado. Sin embargo, a finales de 2014 toda la provincia de Lecce en la región de Apulia fue declarada zona infectada, en la que ya solo se aplican medidas de contención. El área delimitada está rodeada por una extensa zona tampón, en la que están incluidas zonas de vigilancia. En mayo de 2016 la extensión de la zona infectada era de 110 km desde el punto más meridional de la península de Italia y la de la zona tampón era de 10 km. Basándose en los resultados de prospecciones oficiales, el resto del territorio italiano, fuera de estas zonas, está todavía considerado a fecha de septiembre de 2017 como libre del patógeno. Al mismo tiempo, un grupo de investigado-

res del CNR de Bari (Apulia), liderado por los Drs. Boscia y Saponari, inició un programa de investigación, merecedor de admiración, que determinó la naturaleza específica y el genoma de la bacteria asociada al OQDS, desarrolló protocolos para su diagnóstico, e identificó los vectores que propician la diseminación y transmisión de la misma (Capítulo 10), todo ello en un tiempo récord, que ha sido de gran utilidad para la prevención de la bacteria en la UE.

En 2015, las autoridades francesas informaron del primer brote de *X. fastidiosa* en su territorio, en la isla de Córcega, en plantas de la especie ornamental *Polygala myrtifolia*. Y en octubre de ese mismo año se detectó la bacteria en la Costa Azul, primero en Niza y luego en varios municipios del departamento de Alpes-Maritimes y posteriormente también del de Var (Región PACA) (Capítulo 11). En Julio de 2017 el número de focos declarados era de 342 en la isla de Córcega y de 21 en la región PACA. En Francia, con alguna excepción menor, la subespecie detectada es *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* y se ha aislado de más de 30 especies vegetales diferentes. Sin embargo, las muestras analizadas hasta el verano de 2017 de olivos, cítricos y vid han resultado todas negativas. En los diversos focos aparecidos en Córcega y la región PACA, se tomaron medidas de forma inmediata tras su detección basadas en la Decisión de Ejecución (EU) 2015/789.

En 2016, en Alemania, en el curso de una inspección rutinaria en un invernadero de un pequeño vivero de Sajonia, se analizó una planta de adelfa que mostraba síntomas sospechosos, y tanto en ella como en otra de romero se detectó *X. fastidiosa*. La subespecie identificada fue *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*. De acuerdo a la Decisión (EU) 2015/789, se tomaron inmediatamente medidas oficiales de erradicación, y la delimitación de un área con una zona tampón que llega a parte del estado vecino de Turingia. Unos meses después también se detectó *X. fastidiosa* en *Streptocarpus* sp. y en híbridos de *Erysimum* en ese mismo vivero. Desde entonces se han analizado unas 700 muestras, todas negativas, así como posibles vectores también negativos para *X. fastidiosa*, y se continúan haciendo muestreos y análisis de plantas y de posibles vectores, para establecer el origen del foco y delimitarlo.

En España, la entrada o detección de la bacteria era un hecho casi anunciado, ya que nuestro país ha importado y sigue importando plantas procedentes de países que sufren la enfermedad, sin que la sanidad de dichas plantas pueda estar garantizada al 100 %, a pesar de tomarse muestras (más o menos representativas) de los lotes importados que luego son analizadas, cumpliendo así la legislación europea. A finales de 2016, en el transcurso de inspecciones y

análisis rutinarios en Mallorca, se detectó *X. fastidiosa* en cerezos y plantas de *Polygala myrtifolia* (Olmo *et al.*, 2017). La bacteria se ha seguido detectando desde entonces en diversas especies frutales y ornamentales, así como en Ibiza y en Menorca (Capítulo 12). A comienzos del verano de 2017 *X. fastidiosa* se detectó también en Alicante en plantaciones de almendro (Capítulo 13). En ambas comunidades autónomas se puso en marcha el Plan de Contingencia del MAPAMA y se realizaron prospecciones y toma de muestras de plantas huéspedes potenciales en un radio de 100 m alrededor de las plantas infectadas, lo que dio lugar a encontrar nuevos focos e ir incrementando el tamaño de las zonas demarcadas en cada caso.

3. Variantes de *X. fastidiosa* y su distribución geográfica

En un principio se creía que la especie *X. fastidiosa* estaba constituida por un grupo homogéneo de bacterias que causaban enfermedad en una amplia gama de plantas. Sin embargo, se comprobó que esto no era así cuando empezaron a utilizarse métodos de genotipado, basados en secuencias de ADN, para comparar aislados del patógeno que colonizaban diferentes plantas huéspedes (Chen *et al.*, 1992). Fue entonces cuando se describieron al menos cuatro grupos genéticos principales que actualmente se clasifican como subespecies (Schaad *et al.*, 2004; Schuenzel *et al.*, 2005): *fastidiosa*, *pauca*, *multiplex* y *sandyi* (Schaad *et al.*, 2004; Schuenzel *et al.*, 2005), aunque solo dos, la subespecie *fastidiosa* y la subespecie *multiplex*, se consideran nombres válidos por la International Society of Plant Pathology, Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria (ISPP-CTPPB) (Bull *et al.*, 2012). La introducción del tipado por análisis multilocus (*multilocus sequence typing*, MLST, Yuan *et al.* 2010) revolucionó la taxonomía de *X. fastidiosa* y permitió organizar clados filogenéticos significativos asociados a las subespecies. El 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 tipos de secuencia (*Sequence Type*, ST).

Estas cuatro subespecies han divergido genéticamente entre un 1 % y un 3 %, aparentemente debido a su aislamiento geográfico en los últimos 20.000-50.000 años (Nunney *et al.* 2012, Schuenzel *et al.*, 2005). Este aislamiento se rompió por la actividad humana (Nunney *et al.* 2012, Yuan *et al.* 2010), y la coocurrencia de subespecies previamente alopátricas, es decir, diferentes por aislamiento geográfico, ha resultado en una recombinación ho-

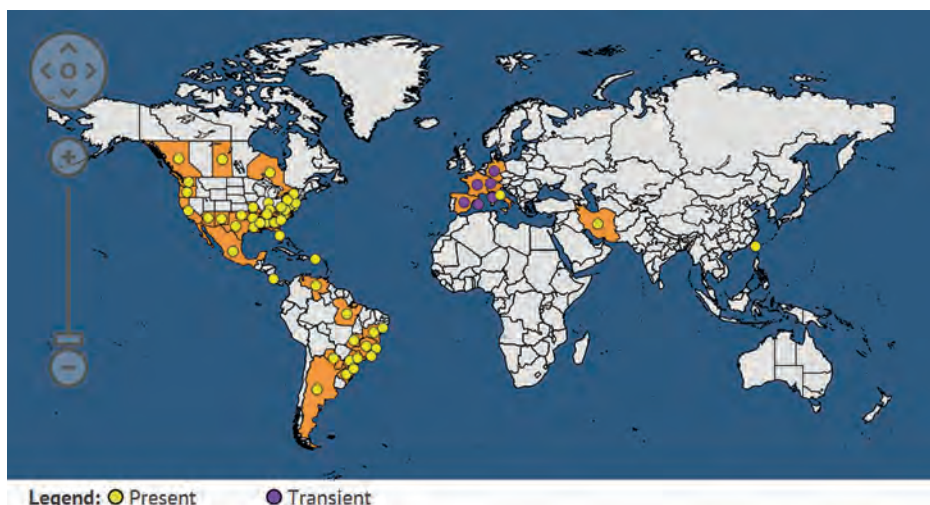
móloga (Nunney *et al.* 2012, 2014). Se ha demostrado que las poblaciones naturales de *X. fastidiosa* recombinan con frecuencia (Almeida *et al.* 2008; Nunney *et al.* 2012, 2014), lo que apoya la hipótesis de que el flujo genético vía recombinación homóloga puede ser uno de los motores que ha dado lugar a la emergencia reciente de nuevas enfermedades producidas por *X. fastidiosa* (Almeida y Nunney 2015; Kandel *et al.*, 2017).

Hay cepas de *X. fastidiosa* que no se han podido asignar a ninguna de las cuatro subespecies. De hecho, se propuso una quinta subespecie para incluir aislados que causan enfermedad en *Chitalpa tashkentensis* (*Bignoniaceae*) en Nuevo México (EEUU), pero su posición filogenética todavía no está clara (Randall *et al.*, 2009). Y más recientemente se propuso la subespecie *mori* para aislados que colonizan moreras en EEUU (Nunney *et al.* 2014), y que sería fruto de la recombinación de alelos de las subespecies *fastidiosa* y *multiplex*.

En Taiwán se describió una enfermedad en peral (*Pyrus pyrifolia* y *P. serotina*) muy similar al quemado de hojas causado por *X. fastidiosa* en otros árboles (Leu and Su, 1993; Chen *et al.*, 2006), y el agente causal se asignó en un principio a una nueva subespecie de *X. fastidiosa*; sin embargo, los últimos estudios filogenéticos sugieren que se trata de una nueva especie del género, que se ha denominado *X. taiwanensis* (Su *et al.*, 2016).

La distribución actual de *X. fastidiosa* se presenta en la Figura 1. En un vistazo rápido se observa una amplia distribución de la bacteria por todo el continente americano, que da idea del aislamiento geográfico en el que estuvo este patógeno hasta que dio el salto fuera de América. En Norteamérica, *X. fastidiosa* se ha detectado tanto en Canadá como en México y en EEUU (Alabama, Arizona, Arkansas, California, Delaware, District of Columbia, Florida, Georgia, Indiana, Kentucky, Louisiana, Maryland, Mississippi, Missouri, Montana, Nebraska, New Jersey, New Mexico, New York, North Carolina, Oklahoma, Oregon, Pennsylvania, South Carolina, Tennessee, Texas, Virginia, Washington, West Virginia). En América Central y el Caribe, en Costa Rica (Nunney *et al.*, 2014) y México (Legendre *et al.*, 2014). Además, se han interceptado partidas infectadas importadas en Europa desde Honduras. En Sudamérica, *X. fastidiosa* se ha detectado en Argentina, Brasil, Ecuador, Paraguay y Venezuela. Fuera de América y Europa, se ha detectado en Irán. Las informaciones sobre India, Líbano y Turquía son inciertas, ya que se basan solo en inspección visual, ELISA y/o observaciones microscópicas. Sobre la situación en África no hay información.

Figura 1. Mapa de distribución mundial de *Xylella fastidiosa*



* Las zonas con un círculo amarillo indican presencia permanente de la bacteria, mientras que aquellas señaladas con uno violeta indican una presencia transitoria.

Fuente: EPPO Global database.

Entre las cuatro subespecies aceptadas de *X. fastidiosa* parece haber cierto grado de diferenciación en función del huésped; sin embargo, hay incertidumbre respecto al rango potencial de huéspedes en la flora europea, ya que muchas especies de plantas europeas, principalmente silvestres, nunca han estado expuestas a la bacteria y se desconoce si serían huéspedes y, en caso afirmativo, si serían sintomáticos o asintomáticos (EFSA 2015). Además, no se ha encontrado especificidad entre el genotipo de *X. fastidiosa* y las especies de insectos vectores en Norteamérica (Almeida *et al.* 2005).

4. Gama de huéspedes

La gama de huéspedes de *X. fastidiosa* es extremadamente amplia, ya que, según la evaluación de la *European Food Safety Authority* (EFSA), abarca 359 especies de plantas que pueden ser infectadas por esta bacteria, en condiciones naturales o experimentales, y que pertenecen a 204 géneros y 75 familias botánicas (EFSA 2015, 2016). Esta lista va en aumento con los huéspedes que se van encontrando en los nuevos brotes europeos. Solo en los últimos tres años, desde la detección de *X. fastidiosa* en Italia, Francia y España, se han descrito más de cuarenta nuevos huéspedes, identificados en los focos de dichos países, que pertenecen a 16 géneros de cinco familias en las que la bacteria no había sido previamente identificada. La Comisión Europea publica actualizaciones de la lista periódicamente (Tabla 1), que se pueden consultar en la siguiente dirección electrónica: https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures/xylella-fastidiosa/susceptible_en.

Todo esto sugiere que, en nuevos brotes, la bacteria podría afectar a otras especies cultivadas, ornamentales, forestales o silvestres, no descritas, lo que hace difícil prever su impacto real y sus reservorios. Además, la bacteria se ha detectado también en muchas plantas silvestres (con frecuencia solo de modo latente), como hierbas, juncos y diversos árboles (Freitag, 1951; Blake, 1993; Hartman, 1991, 1992, 2003; Hernandez-Martines *et al.*, 2007; Raju *et al.*, 1983). No se puede excluir que el patógeno esté presente a pequeña escala en otras zonas geográficas de Europa y pase desapercibido por la falta de familiaridad con los síntomas o la ausencia (al menos temporal) de vectores eficaces. No hay que olvidar la gran cantidad de patrones de vid importados desde finales del siglo XIX desde Norteamérica a Europa debido a su resistencia a la filoxera y las frecuentes importaciones de muchos otros huéspedes de zonas en las que la enfermedad está presente (arándano, almendro, fresa, melocotonero, y decenas de especies de plantas ornamentales, etc.), que podrían haber llevado a la introducción incidental del patógeno en las últimas décadas (Janse y Obradovic, 2010).

Tabla 1. Lista de plantas susceptibles a las diferentes subespecies de *Xylella fastidiosa* en territorio de la Unión Europea, según la actualización de la Comisión Europea de 28 de julio de 2017

Subespecie de <i>X. fastidiosa</i>	Planta susceptible
<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i>	<i>Cistus mospeliensis</i> L. <i>Prunus avium</i> L. <i>Streptocarpus</i> <i>Erysimum</i> <i>Vitis vinifera</i> L.
<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	<i>Acacia dealbata</i> Link <i>Acer pseudoplatanus</i> L. <i>Anthyllis hermanniae</i> L. <i>Artemisia arborescens</i> L. <i>Asparagus acutifolius</i> L. <i>Calicotome villosa</i> (Poir.) Link <i>Cercis siliquastrum</i> L. <i>Cistus creticus</i> L. <i>Cistus mospeliensis</i> L. <i>Cistus salviifolius</i> L. <i>Coronilla valentina</i> L. <i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link <i>Cytisus villosus</i> Pourr. <i>Ficus carica</i> L. <i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl <i>Genista x spachiana</i> (syn. <i>Cytisus racemosus</i> Broom) <i>Genista corsica</i> (Loisel.) DC. <i>Genista ephedroides</i> DC. <i>Hebe</i> <i>Helichrysum italicum</i> (Roth) G. Don <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. <i>Lavandula dentata</i> L. <i>Lavandula stoechas</i> L. <i>Lavandula x allardii</i> (syn. <i>Lavandula x heterophylla</i>) <i>Lavandula x intermedia</i> <i>Metrosideros excelsa</i> Sol. ex Gaertn. <i>Myrtus communis</i> L. <i>Olea europaea</i> L. <i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér <i>Phagnalon saxatile</i> (L.) Cass. <i>Prunus cerasifera</i> Ehrh. <i>Prunus domestica</i> L. <i>Quercus suber</i> L. <i>Rosa canina</i> L. <i>Spartium junceum</i> L. <i>Westringia fruticosa</i> (Willd.) Druce

Tabla 1 (cont.). Lista de plantas susceptibles a las diferentes subespecies de *Xylella fastidiosa* en territorio de la Unión Europea, según la actualización de la Comisión Europea de 28 de julio de 2017

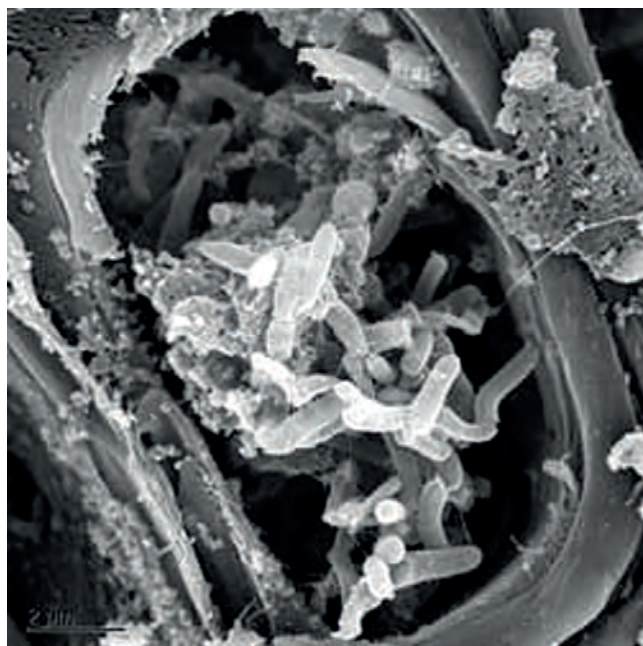
Subespecie de <i>X. fastidiosa</i>	Planta susceptible
<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i>	<i>Acacia saligna</i> (Labill.) Wendl. <i>Asparagus acutifolius</i> L. <i>Catharanthus</i> <i>Chenopodium album</i> L. <i>Cistus creticus</i> L. <i>Dodonaea viscosa</i> Jacq. <i>Eremophila maculata</i> F. Muell. <i>Erigeron sumatrensis</i> Retz. <i>Erigeron bonariensis</i> L. <i>Euphorbia terracina</i> L. <i>Grevillea juniperina</i> L. <i>Heliotropium europaeum</i> L. <i>Laurus nobilis</i> L. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. <i>Lavandula stoechas</i> L. <i>Myrtus communis</i> L. <i>Myoporum insulare</i> R. Br. <i>Olea europaea</i> L. <i>Pelargonium x fragrans</i> <i>Phillyrea latifolia</i> L. <i>Prunus avium</i> (L.) L. <i>Rhamnus alaternus</i> L. <i>Spartium junceum</i> L. <i>Vinca</i> <i>Westringia fruticosa</i> (Willd.) Druce <i>Westringia glabra</i> L.
Cualquiera de las tres subespecies	<i>Coffea</i> <i>Lavandula dentata</i> L. <i>Nerium oleander</i> L. <i>Polygala myrtifolia</i> L. <i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A. Webb <i>Rosmarinus officinalis</i> L.

Fuente: Comisión Europea (2017).

5. Generalidades sobre la sintomatología de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*

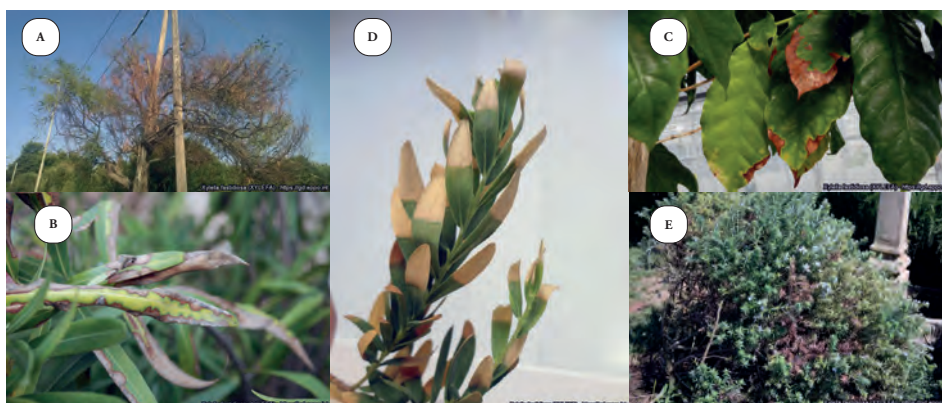
Los síntomas que origina *X. fastidiosa* dependen de la combinación específica de la planta huésped y la cepa de la bacteria. A medida que la bacteria invade los vasos del xilema, bloquea el transporte de nutrientes minerales y agua. La Figura 2 muestra las células bacterianas colonizando el xilema de vid. Generalmente, los síntomas incluyen el denominado quemado, escaldado, chamuscado foliar o necrosis marginal, marchitamiento del follaje, defoliación, clorosis o bronceado en el margen de la hoja y enanismo de la panta. Las infecciones bacterianas pueden ser tan graves como para conducir a la muerte de las plantas infectadas. El bronceado puede intensificarse hasta tomar coloración marrón oscura y secar los órganos afectados (Janse y Obradovic, 2010). En la Figura 3 se puede observar el típico síntoma de quemado en diferentes plantas.

Figura 2. Células de *Xylella fastidiosa* en el xilema de una planta de vid



Fuente: Electron Microscopy Laboratory (UC Berkeley).

Figura 3. Síntomas de quemado en *Acacia saligna* (A), *Nerium oleander* (B), *Coffea* sp. (C), *Polygala myrtifolia* (D) y *Westringia fruticosa* (E)



Fuente: EPPO global database.

Los síntomas generalmente aparecen al principio solo en unas pocas ramas, pero luego se suelen observar en todo el follaje. Dependiendo de la especie de planta afectada, pueden aparecer una gran diversidad de síntomas que incluyen también la presencia de manchas amarillas en las hojas, o de follaje clorótico, observándose a menudo una marcada decoloración amarilla entre los tejidos sanos y necróticos, lignificación irregular de la corteza, retraso del crecimiento, caída prematura de las hojas y frutos, reducción de la producción y del tamaño y sabor de los frutos, o una combinación de varios de estos síntomas.

Además, al ser muchos de estos síntomas poco específicos, pueden confundirse con los causados por otros factores bióticos o abióticos (otros patógenos, estreses ambientales, deficiencias de agua, salinidad, contaminantes del aire, problemas nutricionales, quemaduras de sol, etc.). En los próximos capítulos se tratarán alguna de las enfermedades más importantes que causa esta bacteria con una descripción profusa de los síntomas característicos de cada una de ellas.

6. Importancia económica

La gravedad de los daños causados por *X. fastidiosa* en muchos países debe ser evaluada, no solo en función de las plantas afectadas o las pérdidas de producción, sino también por las pérdidas que provoca en la industria que utiliza como materia prima los frutos de los huéspedes de la bacteria (uva, cítricos, aceituna, etc.). También se deben tener en cuenta las pérdidas medioambientales en especies forestales, en plantas ornamentales, en puestos de trabajo directos e indirectos, y otros factores sociales muy difíciles de evaluar. Además, la enfermedad causa también un daño indirecto en las áreas que producen material de plantación, ya que se prohíbe la exportación desde lugares donde está presente la bacteria.

En EEUU, el coste de la enfermedad de Pierce en California se ha estimado en unos 104,4 millones de dólares por año: 48,3 millones para actividades financiadas por varias agencias gubernamentales, las industrias viveristas y de cítricos, y 56,1 millones de pérdidas y reemplazamiento de viñedos por los agricultores. Estas cifras no incluyen los costes de las medidas preventivas contra la expansión de la chicharrita de alas cristalinas (*glassy winged sharpshooter*), vector exótico que apareció en la década de 1990 causando un notable incremento en la incidencia de la enfermedad de Pierce, por lo que las pérdidas estimadas son más bajas que las reales (Tumber *et al.*, 2014). Si el programa contra el vector acabase, se dispersaría libremente por toda California y el coste anual para la industria del vino, y en último término para los consumidores, se incrementaría en 185 millones de dólares (Alston *et al.*, 2013).

En el estado de Georgia, la enfermedad del falso melocotonero, conocida desde 1890, sigue siendo el principal factor limitante de la producción de este frutal (Purcell, 2014). Un ejemplo de las consecuencias en plantas ornamentales es el de la adelfa plantada a lo largo de las carreteras y en muchos jardines privados, porque las pérdidas solo en las autopistas de California se estimaron en 125 millones de dólares (Henry *et al.*, 1997). El impacto en especies forestales es más difícil de calcular debido a la ausencia general de datos (Sinclair y Lyon, 2005), pero un 35 % de los robles del estado de Nueva Jersey estaban afectados en la década de 2000 por el quemado bacteriano de hoja provocado por *X. fastidiosa* (Gould *et al.*, 2004).

En Brasil, aproximadamente el 40 % de los 200 millones de naranjos dulces plantados en el estado de São Paulo tienen síntomas de clorosis variegada

(Almeida *et al.*, 2014). Y se estimó que las pérdidas anuales por disminución de rendimiento o calidad del fruto podían superar los 100 millones de dólares por año en todo el país (Bové y Ayres, 2007).

En Italia, además de las pérdidas directas por la muerte de los olivos, los cambios en las técnicas agrícolas debidos a las prácticas de protección obligatoria (insecticidas y labores del suelo) han incrementado los costes (Sardaro *et al.*, 2015). Se ha estimado un coste de 111-119 euros por planta muerta, según los ingresos esperados de la producción de aceite de oliva en las áreas infectadas, mientras que el incremento en los costes de gestión se ha valorado en un 31 %. Las pérdidas medioambientales, relativas a los olivos centenarios, se han estimado en 64 euros por planta. Por tanto, el impacto potencial de *X. fastidiosa* en la península de Salento es muy elevado debido a los aproximadamente 11 millones de olivos presentes en el área infectada. Y otros huéspedes conocidos de la cepa local de *X. fastidiosa* tienen valor mediomabiental, y por tanto el patógeno también constituye una seria amenaza para ellos. Además, las poblaciones del único vector conocido en la zona, *Philaenus spumarius*, son localmente muy abundantes, y por ello hay un alto riesgo de extensión epidémica de la enfermedad a nuevos huéspedes susceptibles.

El impacto potencial de *X. fastidiosa* en los distintos cultivos y las distintas zonas de España no es fácil de prever, ya que las pérdidas estarán determinadas por las características de la subespecie o variante introducida en cada caso, el huésped o los huéspedes afectados, la abundancia y eficiencia en la transmisión de los vectores presentes en cada zona, su apetencia por las distintas especies cultivadas y la climatología, lo que la convierten en un patógeno cuya gravedad puede ser muy variable e impredecible. Aunque la gama potencial de plantas huéspedes en Europa, y particularmente en España, va a depender fundamentalmente de la biología y las preferencias alimenticias de los insectos que pueden actuar como potenciales vectores, sin duda las condiciones de clima Mediterráneo que se dan en el sur de Europa, similares a los de las zonas más afectadas por CVC, PD y la nueva enfermedad del olivo, sugieren un alto riesgo de expansión de estas bacteriosis. Por tanto, es de gran importancia extremar las medidas de exclusión frente a este patógeno y a sus vectores, ya que solo en España la superficie cultivada de olivo, vid y naranjo dulce supera las 3.800.000 ha.

7. Riesgo de introducción de *X. fastidiosa* en países de la UE

Ante la gravedad de la situación creada en el sur de Italia, la Unión Europea encargó a la EFSA las evaluaciones del riesgo de *X. fastidiosa* para los países de la UE. En ellas se concluyó que: a) la bacteria tiene una amplia gama de huéspedes frecuentemente cultivados en los países miembros, b) los cica-délicos europeos son potenciales vectores de la misma, y c) la probabilidad de entrada de *X. fastidiosa* procedente de países que sufren la enfermedad es muy alta con plantas importadas y moderada con insectos vectores (EFSA, 2015). Basándose en ello, la UE ha legislado rápidamente las normas necesarias para la prevención de *X. fastidiosa* en los países miembros, tras ser consciente de la carencia de una legislación específica respecto a las importaciones de plantas de países terceros (Capítulo 11). Por ello se han publicado directivas y normativa de obligado cumplimiento encaminadas a frenar la progresión de la bacteriosis en Italia, detectar nuevos focos si los hubiere en otros países y, dado el posible origen centroamericano de la introducción en Italia, impedir nuevas introducciones procedentes de países terceros. Para evitarlas, se obliga a todos los países miembros a controlar el estado sanitario de los olivos y otras especies huéspedes, y a realizar análisis de las plantas importadas procedentes de zonas en las que está citada la presencia de *X. fastidiosa*.

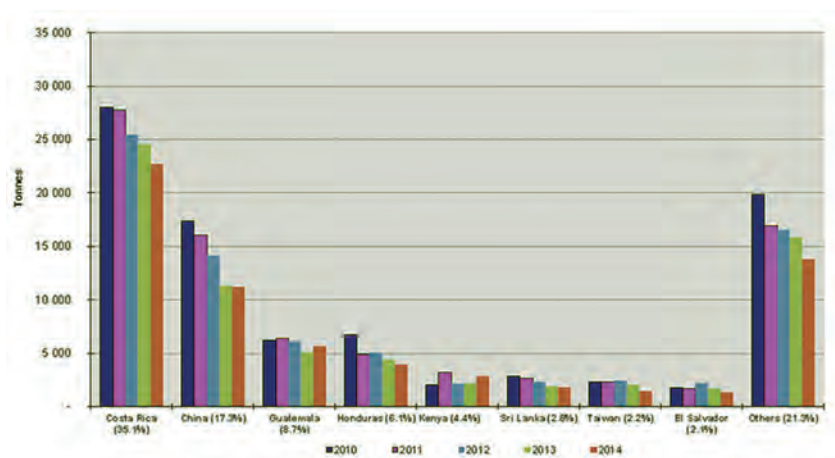
En España, el Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA), siguiendo las directrices de la UE (Directiva 2000/29/CE; Decisión UE 2015/789), ha elaborado un plan de prospecciones que deben realizarse en todas las comunidades autónomas. Además, en la Comunidad Valenciana, el Plan de Vigilancia Fitosanitaria de cítricos ha establecido actualmente más de mil puntos de muestreo donde, mediante trampas, se realiza un monitoreo de posibles vectores de *X. fastidiosa* y se realizan observaciones visuales en cítricos alrededor de dichos puntos. Por otra parte, todas las plantas citadas como huéspedes de *X. fastidiosa* (ver apartado 4) son revisadas en los Puntos de Inspección Fronterizos por los inspectores del MAPAMA y las muestras son analizadas en el Laboratorio Nacional de Referencia para Bacterias Fitopatógenas, localizado en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Moncada, Valencia).

8. Intercepciones de *X. fastidiosa* en la UE

La detección de *X. fastidiosa* en plantas importadas procedentes de países terceros es básica en la prevención de su introducción en nuevas zonas, según los datos disponibles sobre los posibles orígenes de los focos europeos y las diversas intercepciones realizadas desde 2012, que se pueden consultar en la base de datos del Sistema de Notificación de Intercepciones de la Unión Europea: https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/europhyt_en).

El Gráfico 1 muestra las importaciones de plantas en maceta a la UE en el período 2010-2014, procedentes de países terceros. Sirva de ejemplo Costa Rica, país del que se importaron, solo en esos cinco años, más de 27.000 t de plantas en maceta, que pueden suponer más de 60 millones de plantas. Y hay que señalar que en esa época no se analizaba el material de estos orígenes para presencia de *X. fastidiosa* porque se ignoraba el riesgo que suponía su introducción. Una vez dentro de cualquier país de la UE, esas plantas con su pasaporte fitosanitario se han movido libremente sin control. En varios de los países de la Figura 4, *X. fastidiosa* es endémica, tiene una amplísima gama de plantas ornamentales huéspedes y, en el caso de Apulia, los estudios moleculares demuestran que las importaciones de plantas de adelfa y cafeto de ese país han podido ser probablemente las responsables de la introducción del patógeno (Loconsole *et al.*, 2014).

Gráfico 1. Plantas en maceta importadas en la Unión Europea desde distintos países terceros en el período 2010-2014. En toneladas



Fuente: Estadísticas del 'Civil Dialogue Group - Horticultural Products'. EU-AGRI-C2. 2015.

Las plantas de cafeto, muy apreciadas en los países del centro y norte de Europa por su valor ornamental, han sido las más interceptadas, ya que hasta principios de 2016 se habían encontrado plantas positivas a *X. fastidiosa* en un invernadero y un mercado de Francia y en 11 lotes procedentes de varios países centroamericanos interceptados en puertos europeos, especialmente en Holanda, en tan solo en dos semanas de inspecciones intensivas realizadas en 2014 (Legendre *et al.*, 2014). Además, en 2016 se interceptaron también en Italia, pero en el norte, plantas de cafeto importadas de Costa Rica a través de Holanda e infectadas con nuevos tipos de diferentes subespecies de *X. fastidiosa* (Loconsole *et al.*, 2016), lo que da idea también del riesgo constante de introducción en Europa de diversidad genética adicional de este patógeno, muy especialmente con plantas ornamentales importadas.

En este sentido, en el Laboratorio Nacional de Referencia, se ha identificado *X. fastidiosa* en 2016 en esquejes de geranio (*Pelargonium* sp.) procedentes de México, y en plantas de nogal de California, que fueron devueltos a su origen al detectarse dicha bacteria. Y además se ha comprobado la importación frecuente en España de esquejes de muy variadas especies de plantas ornamentales de países americanos en los que está presente este organismo de cuarentena y que se analizan en el Laboratorio Nacional de Referencia. Pero resulta obvio que el análisis de una muestra de 1g de hojas de cada lote importado no puede garantizar totalmente la sanidad de todas las plantas del mismo lote (Capítulo 5). También es necesario señalar que estas intercepciones suponen un auténtico desafío logístico y de elevados costes, que además cuenta con la oposición de numerosos viveristas europeos e importadores de plantas ornamentales. Esto es debido a que ven peligrar un saneado negocio que se ha desarrollado enormemente en los últimos años, ante los bajísimos costes de producción de planta o de material de multiplicación en países terceros como los de Centroamérica y ante la pasada permisividad de la UE, antes de 2014.

La introducción de *X. fastidiosa* en la UE es el paradigma de cómo esta bacteria ha sido capaz de superar una legislación europea que apoya el comercio internacional de material vegetal sin una evaluación seria de los posibles riesgos fitosanitarios. Hasta 2013 se consideraba que *X. fastidiosa* no estaba presente en los países de la UE, pero esta afirmación era posiblemente demasiado optimista, ya que tampoco se buscaba intensivamente la bacteria en ningún país, salvo algunas excepciones y en algún cultivo como la vid. Es presumible que haya habido más introducciones de las señaladas, pero que hayan pasado desapercibidas al no tener todavía serias consecuencias económicas.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente su financiación al Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas, y a los proyectos POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y XF-ACTORS (*Xylella fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy), del programa Horizonte 2020 de la UE, su apoyo y financiación.

Referencias bibliográficas

- AGUILAR, E.; VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L. y RODRÍGUEZ, C. M. (2005): «First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica»; *Plant Dis.* (89); pp. 687.
- ALMEIDA, R. P. P. y NUNNEY, L. (2015): «How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge?»; *Plant Dis.* (99); pp. 1457-1467.
- ALMEIDA, R. P. P.; NASCIMENTO, F. E.; CHAU, J.; PRADO, S. S.; TSAI, C. W.; LOPES, S. A. y LOPES, J. R. (2008): «Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil»; *Appl. Environ. Microbiol.* (74); pp. 3690-3701.
- ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J., y SETUBAL, J. C. (2000): «The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*»; *Nature* (406); pp. 151-157.
- ALSTON, J. M.; FULLER, K. B.; KAPLAN, J. D. y TUMBER, K. P. (2013): «The economic consequences of Pierce's disease and related policy in the California winegrape industry»; *J. Agr. Resour. Econ.* 38(2); pp. 269-97.
- ANSES (AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL) (2012): «Evaluation du Risque Simplifiée de *Xylella fastidiosa*»; <http://www.anses.fr/Documents/SVEG-2012sa0121Ra.pdf>.
- AYRES, A. J. (2000): «Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro»; *Dissertação de mestrado*. Brasil, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

- AZEVEDO FILHO, W. S.; TOLOTTI, A.; CARVALHO, G. S.; MÜLLER, C.; BOTTON, M. y LOPES, J. R. S. (2016): *Guia ilustrado cigarrinhas na cultura da ameixeira*. RS: USEB. Pelotas. 1.^a edición; pp. 135.
- AZEVEDO FILHO, W. S.; PALADINI, A.; BOTTON, M.; CARVALHO, G. S.; RINGENBERG, R. y LOPES, J. R. S. (2011): «Manual de identificação de cigarrinhas em videira»; *Embrapa Informação Tecnológica*. Brasil, Brasília.
- BERIAM, L. O. S. y PARADELA FILHO, O. (2003): «*Xylella fastidiosa* em cafeeiro»; en ZAMBOLIM, L., ed.: *Tecnologia de produção de café com qualidade*. Brasil, Universidade Federal de Viçosa; pp. 281-293.
- BRLANSKY, R. H.; DAVIS, C. L.; TIMMER, T. W.; HOWD, D. S. y CONTRERAS, J. (1991): «Xylem-limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus (Abstract)»; *Phytopathology* (81); pp. 1210.
- CASTRO, L. A. S. (2010): «Protocolo para diagnóstico de escaldadura das folhas da ameixeira»; *Documento* (324). Brasil. Embrapa Clima Temperado.
- CASTRO, L. A. S. y MADAIL, J. C. M. (2011): *Ameixa: pólos de produção*. Agência Embrapa de informação tecnológica. www.agencia.cnptia.embrapa.br. Acceso en 29/04/2017.
- CASTRO, L. A. S.; NAKASU, B. H. y PEREIRA, J. F. M. (2008): «Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo»; *Circular técnica* (70). Brasil, Embrapa Clima Temperado.
- CECAFÉ - CONSELHO DE EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. «RELATÓRIO MENSAL, MARÇO DE 2017»; disponible en <https://www.slideshare.net/lui-zvaleriano/cecafe-relatrio-mensal-mar-2017>. Acceso en 02/03/2017.
- CHANG, C. J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V. y BOVÉ, J. M. (1993): «Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*»; *Curr. Microbiol.* (27); pp. 137-142.
- COLETTA, F. H. D. y MACHADO, M. A. (2003): «Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo state, Brazil»; *Phytopathology* (93); pp. 28-34.
- COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU JÚNIOR, J.; MACHADO, M. A.; DO AMARAL, A. M. y MULLER, G. W. (2004): «First report of the causal agente of huanglongbing '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Brazil»; *Plant Dis.* (88); pp. 1382.

- COLETTA-FILHO, H. D.; FRANCISCO, C. S.; LOPES, J. R. S.; DE OLIVEIRA, A. F. y DA SILVA, L. F. O. (2016): «First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*»; *Phytopathol. Mediterran.* (55); pp. 130-135.
- DALBÓ, M. A.; KLABUNDE, G. H. F.; NODARI, R. O.; FERNANDES, D. y BASSO, M. F. (2010): «Evolution of the response of segregation populations of plums and the association with microsatellite markers of leaf scald»; *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* (10); pp. 337-344.
- DECISION (EU) 2015/789. Decisión de Ejecución (UE) 2015/789 de la Comisión de 18 Mayo de 2015 sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*) [notificada con el número C(2015) 3415].
- DIRECTIVA 2000/29/CE del Consejo de 8 de mayo de 2000 relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. (DO L 169 de 10.7.2000, p. 1).
- DUCROQUET, J. P. H. J.; ANDRADE, E. R. y HICKEL, E. R. (2001): «A escaldadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina»; *Boletín Técnico* (180). Brasil, EPAGRI. Florianópolis.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA PANEL ON PLANT HEALTH) (2015): «Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options»; *EFSA Journal* 2015; 13(1); pp. 262. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3989.
- EIDAM, T.; PAVANELLO, A. P. y AYUB, R. A. (2012): «A ameixeira no Brasil»; *Rev. Brasil. Fruticult.* (34); pp. 001-319.
- EPPO (EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION) (2012): «*Xylella fastidiosa* detected in a containment facility in France»; *EPPO Reporting Service* (8); pp. 2012/165.
- FERNANDEZ-VALIELA, M. V. y BAKARCIC, M. (1954): «Nuevas enfermedades del ciruelo en el delta del Paraná, Argentina»; *Informativo Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* (84); pp. 2-6.
- FRENCH, W. J. y KITAJIMA, E.W. (1978): «Ocurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay»; *Plant Dis. Rep.* (62); pp. 1035-1038.

- GARCÍA, A. L.; TORRES, S. C. Z.; HEREDIA, M. y LOPES, S. A. (2012): «Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection»; *Plant Dis.* (96); pp. 1245-1249.
- GARDNER, M. W. y HEWITT, W. B. (1974): *Pierce's Disease of Grapevine: The Anaheim Disease and the California Vine Disease*. Berkeley, University of California Press.
- GOHEEN, A. C. y HOPKINS, D. L. (2007): «Enfermedad de Pierce»; en *Plagas y Enfermedades de la vid*. Madrid, The American Phytopathological Society. Mundi-Prensa; pp. 44-45.
- GRAVENA, S.; LOPES, J. R. S.; PAIVA, P. E. B.; YAMAMOTO, P. T. y ROBERTO, S. R. (1998): «The *Xylella fastidiosa* vectors»; en Donadio, L. C. y Moreira, C. S. *Citrus Variegated Chlorosis*. Brasil, Bebedouro; pp. 36-53.
- HAELTERMAN, R. M.; TOLOCKA, P. A.; ROCA, M. E.; GUZMÁN, F. A.; FERNÁNDEZ, F. D. y OTERO, M. L. (2015): «First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina»; *J. Plant Pathol.* (97); pp. 393.
- HARTUNG, J. S.; BERETTA, J.; BRLANSKY, R. H.; SPISSO, J. y LEE, R. (1994): «Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*»; *Phytopathology* (84); pp. 591-597.
- HOPKINS, D. L. y ADLERZ, W. C. (1988): «Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida»; *Plant Dis.* (72); pp. 429-431.
- JANSE, J. D. y OBRADOVIC, A. (2010): «*Xylella fastidiosa*: Its biology, diagnosis, control and risks»; *J. Plant Pathol.* (92), sup. 1; pp. 35-48.
- KANDEL, P. P.; ALMEIDA, R. P. P.; COBINE, P. A. y DE LA FUENTE, L. (2017): «Natural Competence rates are variable among *Xylella fastidiosa* strains and homologous recombination occurs in vitro between subspecies *fastidiosa* and *multiplex*»; *Molecular Plant-Microbe Interactions* (30); pp. 589-600.
- KRÜGNER, R.; LOPES, M. T. V. C.; SANTOS, J. S.; BERETTA, M. J. G. y LOPES, J. R. S. (1998): «Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species»; *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* 14th. Brasil; pp. 81.
- LARANJEIRA, F. F. y PALAZZO, D. (1999): «Danos qualitativos à produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros»; *Laranja* (20); pp. 77-91.

- LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. y LOPES, J. R. S. (2003): «Comportamento sazonal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo»; *Fitopatol.* 28. Brasil; pp. 633-641.
- LARANJEIRA, F. F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J. O.; CARVALHO, S. A. y COLETTA FILHO, H. D. (1998): «Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo»; *Fitopatol.* 23. Brasil; pp. 47-154.
- LEGENDRE, B. S.; MISSISSIPI, S.; OLIVER, V.; MOREL, E.; CROUZILLAT, D.; DURAND, K.; PORTIER, P.; POLIAKOFF, F. y JACQUES, M. A. (2014): «Identification and characterisation of *Xylella fastidiosa* isolated from *Coffee* plants in France»; *Proceedings of the International Symposium on the European outbreak of 'Xylella fastidiosa' in olive* 21-24 de octubre de 2014. Italia, Gallipoli-Locorotondo; pp. 27-28.
- LEGENDRE, B.; MISSISSIPI, S.; OLIVER, V.; MOREL, E.; CROUZILLAT, D.; DURAND, K.; PORTIER, P.; POLIAKOFF, F. y JACQUES, M. A. (2014): «Identification and characterisation of *Xylella fastidiosa* isolated from coffee plants in France»; *Journal of Plant Pathology* 96; pp. S4.100.
- LOCONSOLE, G.; BOSCIA, D.; PALMISANO, F.; SAVINO, V.; POTERE, O.; MARTELLI, G. P. y SAPONARI, M. (2014): «A *Xylella fastidiosa* strain with unique biology and phylogeny is associated with a severe disease of olive in Southern Apulia»; *Journal of Plant Pathology* 96; pp. S4.38.
- LOCONSOLE, G.; SAPONARI, M.; BOSCIA, D.; D'ATTOMA, G.; MORELLI, M.; MARTELLI, G. P. y ALMEIDA, R. P. P. (2014): «Intercepted isolates of *Xylella fastidiosa* in Europe reveal novel genetic diversity. Eur.»; *J. Plant Pathol.* (146); pp. 85-94.
- LOPES, J. R. S. y GIUSTOLIN, T. A. (2000): «Outros hospedeiros de cigarrinhas»; *Revista do Fundecitrus* (79); pp.14.
- LOPES, S. A.; MARCUSSI, S.; TORRES, S. C. Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C.; FRANÇA, S. C.; FERNANDES, N. G. y LOPES, J. R. S. (2003): «Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil»; *Plant Dis.* (87); pp. 544-549.
- LOPES, S. A.; LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L. y BERGAMIN FILHO, A. (2004): «Clorose variegada: perdas anuais de US\$ 100 milhões»; *Visão Agrícola* (1); pp. 20-23.

- MADAIL, J. C. M.; BELARMINO, L. C. y NEUTZLING, D. M. (2007): «Custo de produção da ameixa, um caso da Serra Gaúcha»; *Comunicado Técnico* (157); Brasil, Pelotas, Embrapa Clima Temperado.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J. y ROBBS, C. F. (2008): «Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização»; *Summa Phytopathologica* (34); pp. 1-88.
- MIRANDA, M. P. (2008): «Caracterização do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) em citros e suas implicações na transmissão de *Xylella fastidiosa*»; *Tesis doctoral*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; pp. 87.
- MÜLLER, C. (2013): «*Xylella fastidiosa* da ameixeira: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras»; *Tesis doctoral*. Brasil, Universidade de São Paulo. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- NUNNEY, L.; YUAN, X.; BROMLEY, R. E. y STOUTHAMER, R. (2012): «Detecting genetic introgression: high levels of intersubspecific recombination found in *Xylella fastidiosa* in Brazil»; *Appl. Environ. Microbiol.* (78); pp. 4702-4714.
- NUNNEY, L.; SCHUENZEL, E. L.; SCALLY, M.; BROMLEY, R. E. y STOUTHAMER, R. (2014): «Large-scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry»; *Appl. Environ. Microbiol.* (80); pp. 3025-33. doi: 10.1128/AEM.04112-13.
- OLMO, D.; NIETO, A.; ADROVER, F.; URBANO, A.; BEIDAS, O.; JUAN, A.; MARCO-NOALES, E.; LÓPEZ, M. M.; NAVARRO, I.; MONTERDE, A.; MONTES-BORRERO, M.; NAVAS-CORTÉS, J. A. y LANDA, B. B. (2017): «First etection of *Xylella fastidiosa* infecting cherry (*Prunus avium*) and *Polygala myrtifolia* plants in Mallorca Island, Spain»; *Plant Dis.* (101); pp. 1820.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; GARCIA JÚNIOR, A.; BERETTA, M. J. G.; HARAKAVA, R.; MACHADO, M. A.; LARANJEIRA, F. F.; RODRIGUES NETO, J. y BERIAM, L. O. S. (1997): «Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil»; *Summa Phytopathol.* (23); pp. 46-49.
- PRADO, S. S.; LOPES, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.; BORGATTO, A. F. y ALMEIDA, R. P. P. (2008): «Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation»; *Sci. Agric.* (65); pp. 251-258.

- PURCELL, A. H. (2014): «Historical perspectives on *Xylella fastidiosa* and their relevance for the future»; *Proceedings International Symposium on the European outbreak of 'Xylella fastidiosa' in olive* 21-24 de octubre de 2014. Italia, Locorotondo, Gallipoli; pp. 19-21.
- QUEIRÓZ-VOLTAN, R. B. y PARADELA FILHO, O. (1999): «Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*»; *Laranja* (20); pp. 55-76.
- QUEIRÓZ-VOLTAN, R. B.; CABRAL, L. R.; PARADELA FILHO, O. y FAZUOLI, L. C. (2007): «Efeito da poda do tipo decote no controle de *Xylella fastidiosa* em cultivares de cafeeiro»; *Bragantia* (66); pp. 69-80.
- QUEIRÓZ-VOLTAN, R. B.; PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M. L. C. y FAHL, J. I. (1998): «Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*»; *Bragantia* (57); pp. 23-33.
- REDAK, R. A.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R. S.; BLUA, M. J.; MIZEL III, R. F. y ANDERSEN, P. C. (2004): «The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology»; *Annu. Rev. Entomol.* (49); pp. 243-270.
- ROBERTO, S. R.; COUTINHO, A.; LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S. y CARLOS, E. F. (1996): «Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros»; *Fitopatol. Brasil* (21); pp. 517-518.
- ROCHA, J. G.; ZAMBOLIM, F.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M.; BERGAMIN FILHO, A.; JESUS JÚNIOR, W. C. y HAU, B. (2006): «Quantificação dos danos causados por *Xylella fastidiosa* em cafeeiro»; *Summa Phytopathologica* (32 S); pp. 90-91.
- RODAS, V. Z. (1994): «Convivência com a clorose variegada dos citros»; *Laranja* (15); pp. 129-133.
- ROSSETI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M.; BERETTA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R.; QUAGGIO, J. A. y DE NEGRI, J. D. (1990): «Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil»; *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. III* (310); pp. 345-349..
- SAPONARI, M.; BOSCIA, D.; NIGRO, F. y MARTELLI, G.P. (2013): «Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy)»; *J. Plant Pathol.* (95); pp. 668.

- SAPONARI, M.; LOCONSOLE, G.; CORNARA, D.; YOKOMI, R. K.; DE STRADIS, A.; BOSCIA, D.; BOSCO, D.; MARTELLI, G. P.; KRUGNER, R. y PORCELLI, F. (2014): «Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy»; *J. Econ. Entomol.* (107), pp. 1316-1319.
- SARDARO, R.; ACCIANI, C.; DE GENNARO, B. C.; FUCILLI, V. y ROSELLI, L. (2015): «Economic and landscape impact assessment of the disease caused by *Xylella fastidiosa* to olive growing in the Salento area (southern Italy)»; en CASTELLINI, A. y DEVENUTO, L., eds.: *Il Danno. Elementi Giuridici, Urbanistici e Economico-Estimativi*. Italia, Mantova, Universitas Studiorum; pp. 345-372.
- SCARDELATO, D. A. (2013): «Adequação do volume de calda no controle de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em pomar de laranja, no município de Colômbia, SP»; Dissertação de Mestrado, MasterCitrus, Fundecitrus, Araraquara; pp. 29. Disponible en <http://www.fundecitrus.com.br/mestrado/dissertacoes/diaphorina-citri/24#dissertacoes>.
- SCHNEIDER, N. A. y AZEVEDO FILHO, W. S. (2014): «Epidemiologia da escaladadura das folhas da ameixeira»; *Caderno de Pesquisa, Série Biologia* (26); pp. 25-40.
- SU, C. C.; DENG, W. L.; JAN, F. J.; CHANG, C. J.; HUANG, H.; SHIH, H. T. y CHEN, J. (2016): «*Xylella taiwanensis* sp. nov., causing pear leaf scorch disease. Int.»; *J. Syst. Evol. Microbiol.* 66(11); pp. 4766-4771. doi: 10.1099/ijsem.0.001426.
- TEIXEIRA, D. C.; DANE, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JÚNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C. y BOVÉ, J. M. (2005): «Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the «*Candidatus*» Liberibacter species associated with the disease»; *Mol. Cel. Probes* (19); pp. 173-179.
- TUMBER, K. P.; ALSTON, J. M.; FULLER, K. B. y LAPSLEY, J. T. (2012): «The costs of Pierce's Disease in the California grape and wine Industry»; *Draft Working Paper*. California Davis, The University of California at Davis, Department of Agricultural and Resource Economics.
- YAMAMOTO, P. T. (2008): «Controle de insetos vetores de bactérias causadoras em doenças dos citros»; en *Manejo integrado de pragas dos citros*. Brasil, Araraquara, SP. Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus); pp. 237-260.

- YAMAMOTO, P. T.; DALLA PRIA JÚNIOR, W.; ROBERTO, S. R.; FELLIPE, M. R. y FREITAS, E. P. (2001): «Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação»; *Neotrop. Entomol.* (30); pp. 175-177.
- YORINORI, M. A.; RIBAS, A. F. *et al.* (2000): «Presença de *Xylella fastidiosa* em sementes e mudas de cafeeiro»; En *Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Brasil, Belo Horizonte, Embrapa Café. pp. 294-297.

Características generales de *X. fastidiosa*

Blanca B. Landa, Juan A. Navas Cortés y Miguel Montes Borrego

Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC (España, Córdoba)

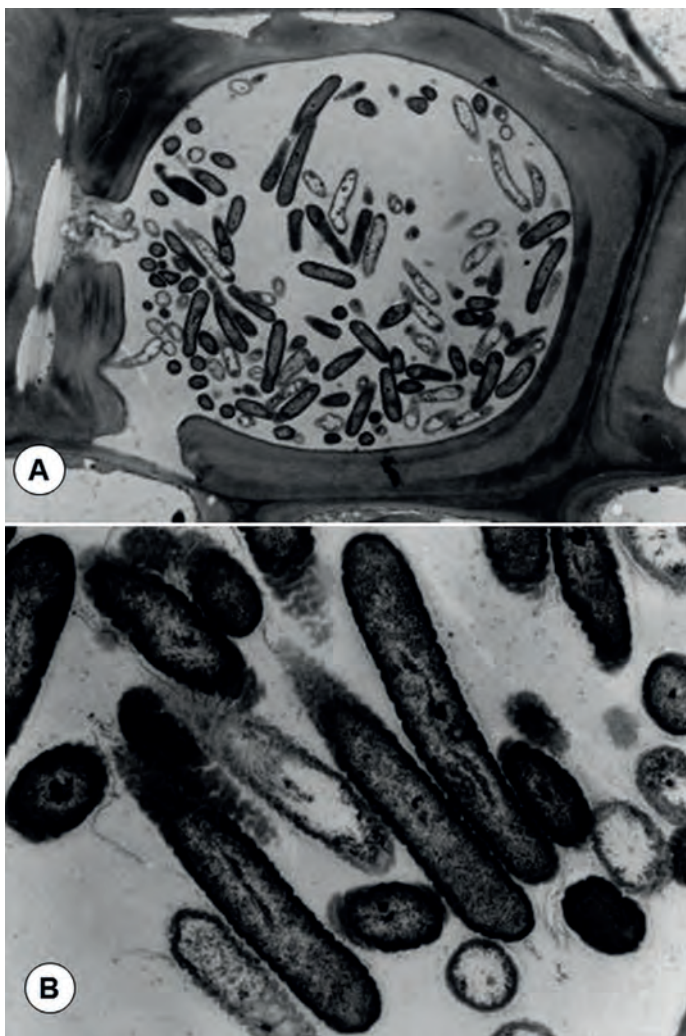
1. Descripción taxonómica, características fenotípicas y genotípicas

Taxonómicamente *Xylella fastidiosa* se ubica en el superreino Bacteria, que pertenece a la clase Gamma de las proteobacteria, Orden Xanthomonadales y familia Xanthomonadaceae. Hasta hace relativamente poco tiempo *X. fastidiosa* era la única especie dentro del género *Xylella*. Sin embargo, en 2016 se ha denominado como *X. taiwanensis* a una estirpe, hasta ese momento considerada como *X. fastidiosa*, que se identificó en 1994 en Taiwán, Asia, causando el chamuscado del peral asiático (*Pyrus pyrifolia*) y que presentaba características genéticas y fisiológicas diferentes de *X. fastidiosa* (Su *et al.*, 2016).

Las células de *X. fastidiosa* tienen forma de bacilos rectos de 0,25-0,35 x 0,9-3,5 μm (Figura 1), que bajo ciertas condiciones específicas de cultivo se unen en cadenas filamentosas largas. Las colonias no presentan pigmentación (Figura 2) y son de dos tipos principales: convexas, lisas y opalescentes con márgenes enteros, o rugosas con márgenes finamente ondulados (Chen *et al.*, 2005). Las células son Gram negativas, sin flagelos. Poseen pili del tipo IV, responsables del movimiento vertical ascendente en la planta y pili del tipo I y II, responsables de la formación de biopelículas y agregación de células (Li *et al.* 2007; Retchless *et al.* 2014). La prueba de la oxidasa es negativa y la catalasa positiva y tiene metabolismo aeróbico estricto (no fermentativo), no halófilo. El crecimiento de *X. fastidiosa in vitro* es difícil ya que requiere medios de cultivo muy especializados (de ahí el epíteto específico *fastidiosa*) tales como BCYE conteniendo como fuente de carbono glutamina y peptona con sero-albúmina. Se ha descrito una temperatura óptima de crecimiento *in vitro* entre 26-28 °C, lo que la clasifica como bacteria mesófila, y su pH óptimo está entre 6,5-6,9 (Davis *et al.*, 1978; Saddler y Bradbury, 2015; Wells *et al.*, 1987). Aunque la mayoría de las cepas de *X. fastidiosa* tienen característi-

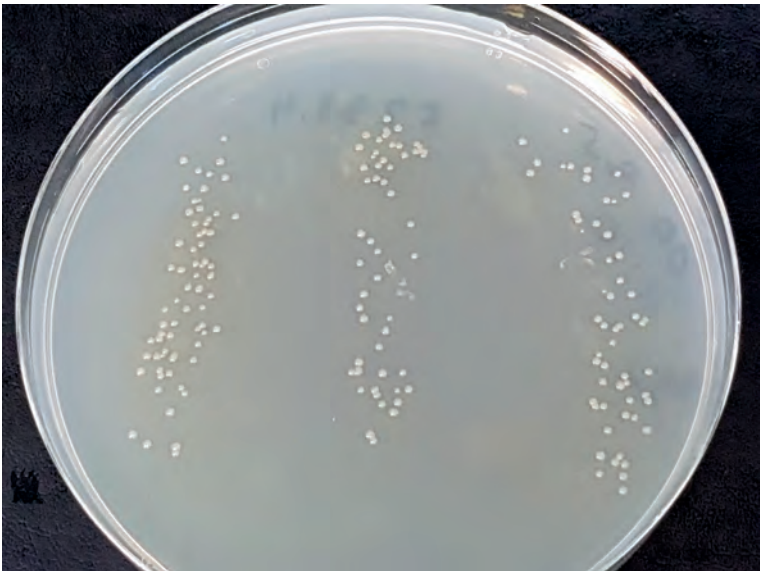
cas de crecimiento en medios complejos y resistencia a antibióticos similares, se han descrito algunas diferencias entre cepas de *X. fastidiosa* que causan enfermedades en distintos cultivos (Tabla 1).

Figura 1. Detalle de células de *X. fastidiosa* en una fotografía al microscopio de transmisión a partir de una muestra de tejido de haces xilemáticos en una planta de naranjo



Fuente: fotografía cortesía de K. Matsuoka (Universidade Federal de Viçosa, Brasil).

Figura 2. Detalle de colonias de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* cepa IVIA5235.4 obtenidas de cerezo (la primera planta positiva en España, Islas Baleares, Mallorca) en medio PD2 tras 17 días de incubación a 28 °C



Fuente: fotografía cortesía del LNR (IVIA, Valencia).

Tabla 1. Crecimiento en medios complejos y resistencia a distintos antibióticos de cepas de *X. fastidiosa* causando enfermedades en distintos cultivos

Características	Cepa causando				
	Quemazón del olmo	Marchitez de la Vinca de Madagascar	Enfermedad de Pierce	Falso melocotonero	Quemazón del ciruelo
Crecimiento en los medios					
BCYE, PW, CS-20	+	+	+	+	+
PD3	+	-	+	-	-
Resistencia a los antibióticos					
Carbenicilina (12,5 µg/ml)	+	+	-	+	+
Penicilina (6,25 ug/ml)	+	+	+	-	-
Gentamicina (80,0 ug/ml)	-	+	-	-	-

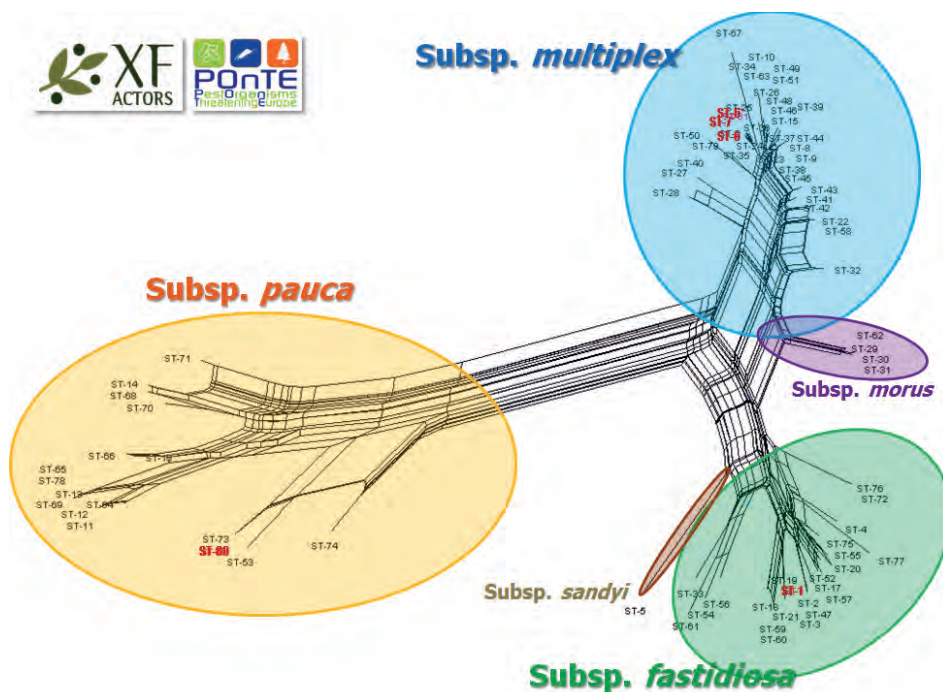
Fuente: Saddler y Bradbury (2015).

Las cepas de *X. fastidiosa* se agrupan en base a la gama de huéspedes en los cuales causan enfermedad, ya que en la mayoría de los casos un tipo de cepa no causa enfermedad en los cultivos susceptibles a otros tipos de cepas. Sin embargo, las relaciones biológicas existentes entre una cepa concreta y un cultivo huésped no se pueden inferir únicamente de la planta huésped donde se ha aislado y de las relaciones filogenéticas existentes entre cepas. Por ejemplo, el almendro es susceptible a las cepas de vid en California pero lo contrario no parece ocurrir, y los grupos genéticos de *X. fastidiosa* procedentes de adelfa y vid son monofiléticos pero no causan enfermedad en inoculaciones cruzadas en los huéspedes respectivos (Almeida *et al.*, 2008; Purcell, 2013 y Retchless *et al.*, 2014).

Por lo tanto, en la actualidad se ha propuesto la división de *X. fastidiosa* en seis subespecies (Schaad *et al.*, 2004 y Schuenzel *et al.*, 2005) que se diferencian por sus perfiles genéticos. Si bien, tan solo las tres primeras han sido descritas siguiendo la normativa sistemática microbiológica: (i) *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (aislados de vid, almendro y alfalfa entre otros huéspedes), (ii) *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (aislados de café, naranjo y olivo entre otros), (iii) *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (varios huéspedes incluyendo *Prunus* spp., *Quercus* spp., *Ulmus* spp., *Rubus* spp. y *Morus* spp.), (iv) *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (adelfa), (v) *X. fastidiosa* subsp. *tashke* (*Chitalpa tashkentensis*, una especie ornamental). Recientemente se ha identificado otro grupo genético diferente a estos, procedente de *Morus* spp. y de un arbusto, *Nandina domestica*, que se han ubicado como *X. fastidiosa* subsp. *morus* (*Morus* spp.) (Nunney *et al.*, 2014).

Actualmente, la forma más utilizada para realizar la asignación de los aislados de *X. fastidiosa* a nivel de subespecie y grupo genético (ST) o subgrupo dentro de una subespecie se basa en la amplificación y secuenciación de siete genes de mantenimiento o análisis multilocus (*multilocus sequence typing*, MLST, Yuan *et al.*, 2010) (MLST) (ver apartado 1.3 en Capítulo 1 y apartado 5.5 en Capítulo 5). De esta forma hasta la fecha se han descrito 80 grupos genéticos diferentes o STs, de los cuales más de un 30 % de estos se han descrito desde el 2014, normalmente asociados a interceptaciones de material vegetal infectado en la Unión Europea, en estudios recientes llevados a cabo en Costa Rica y Brasil o en los nuevos focos aparecidos en Europa (Denancé *et al.*, 2017; Bergsma-Vlami *et al.*, 2015; 2017, Jacques *et al.*, 2016; Legendre *et al.*, 2014; Loconsole *et al.*, 2016; Landa *et al.*, no publicado) (Figura 3).

Figura 3. Reconstrucción de relaciones filogenéticas entre las distintas subespecies de *Xylella fastidiosa* y los diferentes grupos genéticos o STs descritos hasta la fecha utilizando la secuencia concatenada de los siete genes de mantenimiento del análisis MLSA



* Los ST identificados en España se indican en rojo.

Fuente: Landa *et al.* (no publicado).

2. Biología y ecología

Xylella fastidiosa es una bacteria con un ciclo de vida dual; es decir, pasa una parte de su vida en los insectos vectores (ver Capítulo 4) que la transmiten, y otra parte en la planta que infecta, donde puede causar o no enfermedad. El crecimiento sistémico de *X. fastidiosa* en los tejidos del xilema de las plantas que infecta propicia que la utilización de material de plantación o para injerto, tomado de plantas infectadas, sea una de las vías por las que la bacteria puede ser introducida en una zona libre de ella. Sin embargo, la transmisión de *X. fastidiosa* de una planta infectada a otra sana (así como su diseminación entre parcelas a corta y mediana distancia) tiene lugar por insectos chupadores capa-

ces de alcanzar el xilema en los tejidos infectados y de succionar para su alimentación la savia bruta donde se encuentra la bacteria (ver Capítulo 4).

Una vez que la bacteria es inoculada por el vector, se dispersa por las células del xilema o por los elementos traqueales. Los síntomas de la enfermedad aparecen varias semanas o incluso meses después de la inoculación y se manifiestan mucho más claramente durante los meses de verano y otoño, que es cuando existe la máxima demanda hídrica de la planta, que no puede ser satisfecha debido a la oclusión de sus haces vasculares (McElrone *et al.*, 2001). La severidad de la enfermedad parece que está directamente relacionada con la capacidad del patógeno para producir una infección sistémica, alcanzar alta concentración y colonizar el tejido vascular infectado (Hopkins, 1989). Presumiblemente, es la diferencia que existe en ciertos aislados de colonizar extensamente algunas plantas huéspedes susceptibles, lo que las distingue de otras muchas plantas en las que la colonización es mínima y en la que el patógeno se desarrolla como un endofito relativamente inofensivo sin causar síntomas (Chatterjee *et al.*, 2008a).

En los huéspedes susceptibles como la vid, *X. fastidiosa* se multiplica y se extiende ampliamente desde el sitio de infección para colonizar el xilema, donde las células bacterianas se unen a las paredes de los vasos donde se multiplican, formando colonias que aumentan su tamaño, y que pueden, cuando son lo suficientemente grandes ocluir los vasos del xilema, bloqueando el transporte de agua. La diseminación sistémica del patógeno está limitado por las membranas de los haces del xilema que pueden ser degradadas por enzimas del tipo poligalacturonasa producidas por la bacteria, y también esta dispersión está bloqueada por la producción de tilosas y geles ricos en polisacáridos por las propias plantas como reacción de defensa, que hace que los haces vasculares del xilema se bloqueen después de la infección. En este sentido, no está claro aún hasta qué punto los síntomas de la enfermedad son causados por el bloqueo bacteriano directo de los vasos, o por el bloqueo derivado de la producción de geles y gomas de las propias plantas, pero parece claro que la respuesta de la planta está directamente relacionada con una colonización bacteriana extensa (Chatterjee *et al.*, 2008a).

Xylella fastidiosa es una bacteria adaptada a zonas con inviernos suaves o moderados (ver Capítulo 3). El crecimiento *in vitro* de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* es óptimo a 28 °C, y decrece a 32, 22 y 18 °C, respectivamente, no observándose crecimiento *in vitro* de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* a 12 °C.

En plantas de vid infectadas se ha determinado que los límites de temperatura para que se produzca multiplicación de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* está comprendido entre los 17 y 25 °C (Feil y Purcell, 2001), y que sus poblaciones en plantas infectadas de vid decrecen o cesan cuando las temperaturas en los vasos del xilema están por debajo de 5 °C. Por tanto, temperaturas entre 25 y 32 °C son críticas para el desarrollo de las epidemias de la enfermedad de Pierce de la vid debido a la elevada tasa de crecimiento de la bacteria a esas temperaturas, mientras que las temperaturas por debajo de 12-17 °C, o superiores a 34 °C, comprometen su supervivencia *in planta* (Feil y Purcell, 2001). Esto podría explicar, al menos en parte, las variaciones estacionales del desarrollo de síntomas observadas en diferentes plantas huésped infectadas por *X. fastidiosa*, así como el fenómeno de ‘cura’ observado en vides y almendros en California a bajas temperaturas (ver Capítulo 3). No obstante hay que indicar que la capacidad de supervivencia de *X. fastidiosa* a las temperaturas invernales puede variar con la estirpe (subespecie/ST) y el cultivar de la planta huésped que infecta, así como el patrón de vid o almendro utilizado (Krugner *et al.*, 2016).

3. Factores asociados a la virulencia

Los factores asociados a la virulencia de *X. fastidiosa* son variados y se han estudiado básicamente en las cepas de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* aisladas de vid. Como se ha comentado con anterioridad, el desarrollo de síntomas asociados a la infección por *X. fastidiosa* se ha asociado con: i) un estrés hídrico debido a la obstrucción del xilema de la planta por la extensa colonización bacteriana, ii) producción de polisacárido bacteriano extracelular, y iii) formación de biopelículas y agregación celular (Chatterjee *et al.*, 2008a,b; Hopkins, 1989; Hopkins y Purcell, 2002). Sin embargo, algunos investigadores sugieren que las proteínas secretadas y componentes de la membrana externa de *X. fastidiosa* son los responsables del desarrollo de síntomas en vid y no el estrés hídrico (Bruening *et al.*, 2008, Reddy *et al.*, 2007). Estudios adicionales también han encontrado que no existe correlación entre la población del patógeno y el desarrollo de síntomas, lo que sugiere que la obstrucción del xilema no es necesaria para que la enfermedad se produzca (Gambetta *et al.*, 2007). Sin embargo, la formación de biopelículas (o *biofilms*) se ha demostrado como un factor importante para la colonización de la planta e infectividad de por vida de los insectos vectores (Purcell *et al.*, 1979; Chatterjee *et al.*, 2008a,b).

El proceso de desarrollo de biopelículas se ha dividido en cinco etapas secuenciales: (i) adherencia celular reversible a una superficie; (ii) adherencia irreversible; (iii) inicio de la maduración de la biopelícula; (iv) biopelícula madura; y, (v) dispersión de la biopelícula (Sauer *et al.*, 2002). La adherencia de *X. fastidiosa* a las superficies del huésped es promovida por los pili tipo I (pili corto), mientras que los pili de tipo IV (pili largos) le sirven a la bacteria para facilitar su movimiento y translocarse por la planta (Meng *et al.*, 2005), incluso a contracorriente ya que *X. fastidiosa* carece de flagelos. La capacidad de *X. fastidiosa* para migrar alejándose del punto de inoculación y su extensión por toda la planta es importante para la virulencia (Chatterjee *et al.*, 2008a). En este caso, el pili tipo IV juega un papel importante ya que son necesarios para la difusión del patógeno a través de la motilidad tipo *twitching* (por contracciones) (Meng *et al.*, 2005). Las adhesinas Afimbrial (HxfA y HxfB) son proteínas del tipo hemaglutininas que atenúan la virulencia de *X. fastidiosa* al contribuir a la maduración de la biopelícula en los vasos de xilema, y se piensa que no están implicadas en la adhesión superficial inicial, pero sí en la agregación celular posterior, y son un factor importante para la maduración de las biopelículas de *X. fastidiosa* (Guilhabert y Kirkpatrick, 2005). Todos estos factores sugieren que la capacidad de *X. fastidiosa* para formar agregados celulares se relaciona con la habilidad del patógeno para formar biopelículas maduras dentro de los vasos de xilema y que contribuyen a su virulencia.

Otros factores de patogenicidad que promueven la virulencia en *X. fastidiosa* incluyen la producción de enzimas degradadoras de la pared celular tales como glucanasas, xilanasas y poligalacturonasas (Roper *et al.*, 2017). El genoma de *X. fastidiosa* codifica una poligalacturonasa (*pglA*) que se sabe contribuye a degradar las membranas que separan los vasos del xilema, y que le ayuda a la colonización sistémica y su virulencia en el caso de vid (Roper *et al.*, 2017). Además se ha visto que la expresión de *pglA* se reprime a niveles altos de densidad celular, restringiendo el flujo bacteriano a través de la planta), al contrario que ocurre con los genes que controlan las adhesinas y la síntesis de pili tipo I que son sobre-expresados para promover la formación de biopelículas a niveles altos de densidad bacteriana (Chatterjee *et al.*, 2008a). Por lo tanto, las redes reguladoras que controlan la interacción de los pili de tipo I y tipo IV, las adhesinas y las enzimas degradadoras de la pared celular son inducidas en función de los niveles de densidad poblacional bacteriana (Chatterjee *et al.*, 2008a).

En *X. fastidiosa* y la mayoría de las bacterias los sistemas de comunicación de célula a célula, que se denominan como *quorum sensing*, permiten que las bacterias evalúen los niveles de su densidad de población por el uso de pequeñas señales difusibles (Von Bodman *et al.*, 2003). Estos sistemas permiten a las bacterias coordinar la expresión de ciertas características o actividades solo cuando se ha alcanzado una densidad de población. Para los patógenos bacterianos, esta comunicación ayuda en la sincronización de la expresión de factores de virulencia, lo que da ventajas en la colonización de la planta huésped (Von Bodman *et al.*, 2003). El *quorum sensing*, por tanto, consiste en la difusión de factores de señalización de bajo peso molecular (DSF o *diffusing signaling factors*) que se acumulan a medida que la población bacteriana aumenta. Cuando la señal llega a un cierto umbral, se activan diversas proteínas receptoras que a su vez activan cascadas de señales para modificar la expresión génica (Von Bodman *et al.*, 2003).

En los últimos años la utilización de mutantes en distintos genes que codifican los potenciales receptores de moléculas DSF o de enzimas que degradan algunas moléculas que actúan como mensajeros secundarios, están ayudando a dilucidar los mecanismos de virulencia en *X. fastidiosa*. Por ejemplo, mutaciones en el gen *rpfF* (que codifica una DSF sintasa) generan un mutante hipervirulento de *X. fastidiosa* que aumenta su virulencia y su capacidad de colonización de plantas de vid (Chatterjee *et al.*, 2008a,b). Por otro lado Chatterjee *et al.* (2010) demostraron que la expresión de la proteína CgsA es necesaria para la virulencia y la transmisión de la bacteria tanto en plantas de vid, como en los insectos vectores. Los resultados sugieren además que la acumulación de DSF reduce la de c-di-GMP, el mensajero secundario cíclico diguanilato, a nivel intracelular y tiene como consecuencia la transición del crecimiento del patógeno de móvil a sésil (Chatterjee *et al.*, 2010).

En los próximos años la disponibilidad de genomas completos de numerosos aislados de *X. fastidiosa* (pertenecientes a subespecies y genotipos distintos) y su anotación, permitirán llevar a cabo nuevos estudios de genómica comparativa, obtener mutantes y determinar los factores que llevan a ciertas cepas a ser patógenas sobre determinados cultivos y no otros.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los proyectos POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y XF-ACTORS (*Xylella Fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy), del programa Horizonte 2020 de la UE, su apoyo y financiación.

Referencias bibliográficas

- ALMEIDA, R. P. P.; NASCIMENTO, F. E.; CHAU, J.; PRADO, S. S.; TSAI, C. W.; LOPES, S. A. y LOPES, J. R. S. (2008): «Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* causing disease in citrus and coffee in Brazil»; *Appl. Environ. Microbiol.* (74); pp. 3690-3701.
- BERGSMA-VLAMI, M.; VAN DE BILT, J. L. J.; TJOU-TAM-SIN, N. N. A.; VAN DE VOSSENBERG, B. T. L. H. y WESTENBERG, M. (2015): «*Xylella fastidiosa* in *Coffea arabica* ornamental plants imported from Costa Rica and Honduras in the Netherlands»; *J. Plant Pathol.* (97); pp. 395.
- BERGSMA-VLAMI, M.; VAN DE BILT, J. L. J.; TJOU-TAM-SIN, N. N. A.; HELDERMAN, C. M.; GORKINK-SMITS, P. P. M. A.; LANDMAN, N. M.; VAN NIEUWBURG, J. G. W.; VAN VEEN, E. J. y WESTENBERG, M. (2017): «Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* in imported ornamental *Coffea arabica* plants»; *Plant Pathol.* (66); pp. 1065-1074.
- BRUENING, G.; FELDSTEIN, P. y CIVEROLO, E. L. (2008): «Exploiting *Xylella fastidiosa* proteins for Pierce's disease control»; *Pierce's Disease Research Symposium*; pp. 142-148.
- CHEN, J.; GROVES, R.; CIVEROLO, E. L.; VIVEROS, M.; FREEMAN, M. y ZHENG, Y. (2005): «Two *Xylella fastidiosa* genotypes associated with almond leaf scorch disease on the same location in California»; *Phytopathology* (95); pp. 708-714.
- CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P. y LINDOW S. (2008a): «Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*»; *Annu. Rev. Phytopathol.* (46); pp. 243-271.

- CHATTERJEE, S.; KILLINY, N.; ALMEIDA, R. P. P. y LINDOW, S. E. (2010): «Role of cyclic di-GMP in *Xylella fastidiosa* biofilm formation, plant virulence, and insect transmission»; *Mol. Plant-Microbe Interact.* (23); pp. 1356-1363.
- CHATTERJEE, S.; WISTROM, C. y LINDOW, S. E. (2008b): «A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*»; *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* (105); pp. 2670-2675.
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H. y THOMPSON, S. V. (1978): «Pierce's disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium»; *Science* (199); pp. 75-77.
- DENANCÉ, N.; LEGENDRE, B.; BRIAND, M.; OLIVIER, V.; DE BOISSESON, C.; POLIAKOFF, F. y JACQUES, M. A. (2017): «Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France»; *Plant Pathol.* (66); pp. 1054-1064.
- FEIL, H. y PURCELL, A. H. (2001): «Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines»; *Plant Dis.* (85); pp. 1230-1234.
- GAMBETTA, G. A.; FEI, J.; ROST, T. L. y MATTHEWS, M. A. (2007): «Leaf scorch symptoms are not correlated with bacterial populations during Pierce's disease»; *J. Exp. Bot.* (58); pp. 4037-4046.
- GUILHABERT, M. R. y KIRKPATRICK, B. C. (2005): «Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence»; *Mol. Plant-Microbe Interact.* (18); pp. 856-868.
- HOPKINS, D. L. (1989): «*Xylella fastidiosa* - xylem-limited bacterial pathogen of plants»; *Annu. Rev. Phytopathol.* (27); pp. 271-290.
- HOPKINS, D. L. y PURCELL, A. H. (2002): «*Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases»; *Plant Dis.* (86); pp. 1056-1066.
- JACQUES, M. A.; DENANCÉ, N.; LEGENDRE, B.; MOREL, E.; BRIAND, M.; MISSISSIPI, S.; DURAND, K.; OLIVIER, V.; PORTIER, P.; POLIAKOFF, F. y CROUZILLAT, D. (2016): «New coffee-infecting *Xylella fastidiosa* variants derived via homologous recombination»; *Appl. Environ. Microbiol.* (82); pp. 1556-68.

- KRUGNER, R. y LEDBETTER, C. A. (2016): «Rootstock Effects on Almond Leaf Scorch Disease Incidence and Severity»; *Plant Dis.* (100); pp. 1617-1621.
- LEGENDRE, B.; MISSISSIPI, S.; OLIVIER, V.; MOREL, E.; CROUZILLAT, D.; DURAND, K.; PORTIER, P.; POLIAKOFF, F. y JACQUES, A. (2014): «Identification and characterization of *Xylella fastidiosa* isolated from coffee plants in France. International Symposium on the European Outbreak of *Xylella fastidiosa* in Olive»; *J. Plant Pathol.* (96); pp. S4.100.
- LI, Y.; HAO, G.; GALVANI, C. D.; MENG, Y.; DE LA FUENTE, L.; HOCH, H. C. y BURR, T. J. (2007): «Type I and type II pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation, and cell-wall aggregation»; *Microbiology* (153); pp. 719-726.
- LOCONSOLE, G.; SAPONARI, M.; BOSCIA, D.; D'ATTOMA, G.; MORELLI, M.; MARTELLI, G. P. y ALMEIDA, R. P. P. (2016): «Intercepted isolates of *Xylella fastidiosa* in Europe reveal novel genetic diversity»; *Eur. J. Plant Pathol.* (146); pp. 85-94
- MCELRONE, A. J.; SHERALD, J. L. y FORSETH, I. N. (2001): «Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*»; *Plant Dis.* (85); pp. 1160-1164.
- MENG, Y.; LI, Y.; GALVANI, C. D.; HAO, G.; TURNER, J. N.; BURR, T. J. y HOCH, H. C. (2005): «Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility»; *J. Bacteriol.* (187); pp. 5560-5567.
- NUNNEY, L.; SCHUENZEL, E. L.; SCALLY, M.; BROMLEY, R. E. y STOUTHAMER, R. (2014): «Large-Scale Intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry»; *Appl. Environ. Microbol.* (80); pp. 3026-3033.
- PURCELL, A. H. (2013): «Paradigms: Examples from the Bacterium *Xylella fastidiosa*»; *Ann. Rev. Phytopathol.* (51); pp. 339-356.
- PURCELL, A. H.; F. A. H. y MCLEAN, D. L. (1979): «Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectors»; *Science* (206); pp. 839-841.
- REDDY, J. D.; REDDY, S. L.; HOPKINS, D. L. y GABRIEL, D. W. (2007): «TolC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines»; *Mol. Plant-Microbe Interact.* (20); pp. 403-410.

- RETCHLESS, A. C.; LABROUSSAA, F.; SHAPIRO, L.; STENGER, D. C.; LINDOW, S. E. y ALMEIDA, R. P. P. (2014): «Genomic Insights into *Xylella fastidiosa* interactions with plant and insect hosts»; en GROSS, D. C.; LICHENS-PARK, A. y KOLE, C., eds.: *Genomics of plant-associated bacteria*. Berlin, Heidelberg. Springer; pp. 177-202.
- ROPER, M. C.; GREVE, L. C.; WARREN, J. G.; LABAVITCH, J. M. y KIRKPATRICK, B. C. (2007): «*Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines»; *Mol. Plant-Microbe Interact.* (20); pp. 411-419.
- SADDLER, G. S. y BRADBURY, J. F. (2015): «*Xylella*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria»; pp. 1-10. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01240.
- SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W. y DAVIES, D. G. (2002): «*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm»; *J. Bacteriol.* (184); pp. 1140-1154.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; FATMI, M. y CHANG, C. J. (2004): «*Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei* subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov.»; *Syst. Appl. Microbiol.* (27); pp. 290-300.
- SCHUENZEL, E.; SCALLY, M.; STOUTHAMER, R. y NUNNEY, L. (2005): «A multilocus phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*»; *Appl. Environ. Microbiol.* (71); pp. 3832-3839.
- SU, C. C.; DENG, W. L.; JAN, F. J.; CHANG, C. J.; HUANG, H.; SHIH, H. T.; y CHENE, J. (2016): «*Xylella taiwanensis* sp. nov., causing pear leaf scorch disease»; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (66); pp. 4766-4771.
- VON BODMAN, S. B.; BAUER, W. D. y COPLIN, D. L. (2003): «Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria»; *Annu. Rev. Phytopathol.* (41); pp. 455-482.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H. Y.; WEISBURG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L. y BRENNER, D. J. (1987): «*Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int.»; *J. Syst. Bacteriol.* (37); pp. 136-143.
- YUAN, X.; MORANO, L.; BROMLEY, R.; SPRING-PEARSON, S.; STOUTHAMER, R. y NUNNEY, L. (2010): «Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States»; *Phytopathology* (100); pp. 601-611.

Epidemiología

Juan A. Navas Cortés, Miguel Montes Borrego y Blanca B. Landa
Instituto de Agricultura Sostenible-IAS-CSIC (España, Córdoba)

1. Introducción

El crecimiento sistémico de *Xylella fastidiosa* en los tejidos del xilema de plantas infectadas propicia que la utilización de material de plantación o para injerto, tomado de plantas enfermas, sea una de las vías por las que la bacteria puede ser introducida en una zona de cultivo libre de esta. Sin embargo, la transmisión de *X. fastidiosa* de una planta infectada a otra sana (así como su diseminación entre parcelas a corta y larga distancia) tiene lugar por insectos chupadores capaces de alcanzar el xilema en los tejidos infectados y de succionar para su alimentación la savia bruta donde se encuentra la bacteria. Estas especies pertenecen al orden Hemiptera, suborden Auchenorrhyncha, y más concretamente a las familias Aphrophoridae, Cercopidea, Cicadidae y Cixiellidae que se abordan en el Capítulo 4.

2. Patrón de distribución espacial de epidemias causadas por *Xylella fastidiosa*

Los primeros estudios sobre la dinámica espacial de enfermedades causadas por *X. fastidiosa* se realizaron en vides de California afectadas por la enfermedad de Pierce (EP), y sugerían una dispersión de la bacteria desde fuentes externas al viñedo por *Graphocephala atropunctata* como principal vector en esta zona (Purcell, 1974). Este tipo de dispersión resulta en una mayor incidencia de enfermedad en los bordes del viñedo decreciendo hacia el interior del mismo, siendo la transmisión entre plantas adyacentes más limitada. En este sentido, Purcell (1974) indicó una mayor incidencia de la EP cerca de la vegetación natural riparia que actúa como refugio de los insectos vectores y decrece con la distancia a esta (hasta los 120-150 m). Hewitt *et al.* (1946) ya observaron asimismo un gradiente en la incidencia de esta misma enfermedad cercano al 40 % en las hileras de plantas más próximas a campos de alfalfa con

un descenso gradual hacia el interior del viñedo. Sin embargo, en los estados del «Gulf Coastal Plain» del sudeste de EEUU, la transmisión planta a planta es la que predomina, y se caracteriza por un patrón de distribución agregado (Hopkins y Purcell, 2002). Estas diferencias están en gran medida relacionadas con la especie de insecto vector presente en cada zona y con sus diferentes hábitos alimenticios y ecológicos. Así, este último patrón de dispersión se ha asociado a *Homalodisca coagulata* vector prevalente en dicha zona geográfica, cuyo aparato bucal le permite alimentarse de tallos más maduros de vid y es muy polífago tanto en su alimentación como ovoposición, lo cual le permite desarrollarse en la vegetación adventicia del viñedo y moverse dentro de él sin tener que recurrir a vegetación externa. Asimismo, el gradiente de incidencia de enfermedad no se ve afectado por la presencia de otros viñedos o campos de cítricos en su cercanía que pudiesen actuar como fuente externa (Tubajika *et al.*, 2004). En Florida, los vectores nativos y prevalentes en viñedo son *H. coagulata* y *Oncometopia nigricans*, con una dispersión preferente de planta a planta en el interior del viñedo, que además ocurre durante todo el año (Adlerz *et al.*, 1979).

La incidencia de chamuscado o quemadura foliar del almendro en el Valle de San Joaquín en California, de forma similar a lo indicado para viñedos afectados por la EP en esta misma zona, se ha asociado a la presencia de pastos permanentes o cultivos de alfalfa que alojan a los posibles insectos vectores (Viveros, 2003). Groves *et al.* (2005) identificaron dos genotipos de *X. fastidiosa* infectando almendro en esta zona, que denominaron genotipos G y A, los cuales presentan un patrón espacial diferencial cuando están presentes en un mismo campo. En cultivos de almendros del cultivar 'Sonora' infectados por el genotipo G se observó una distribución agregada, mientras que los infectados por el genotipo A presentaban una distribución aleatoria, que podría estar relacionado con la mayor susceptibilidad de este cultivar de almendro al genotipo G.

En cítricos, el progreso de clorosis variegada es más rápido en primavera y verano (Roberto *et al.*, 2002), alternando períodos con tasas de incremento lento y rápido en la proporción de plantas infectadas, lo que suele dar lugar a epidemias con un progreso temporal de tipo sigmoidea. Los períodos de primavera y verano son asimismo los de mayor tasa de transmisión, fundamentalmente debido a las mayores poblaciones de insectos vectores en las plantaciones de cítricos, que además tienen preferencia por los brotes más numerosos y vigorosos existentes en este período. Las plantas afectadas pre-

sentan además una distribución en rodales, tal y como es de esperar para un patógeno transmitido por insectos vectores. El análisis de la estructura de los focos indica la coalescencia de estos con alta incidencia de enfermedad debida a una transmisión árbol a árbol como método de dispersión secundario por el vector (Laranjeira *et al.*, 1998). Por otro lado, de forma similar a lo descrito para la EP en California, es frecuente la aparición de los primeros focos de plantas infectadas cerca de los bordes de parcelas afectadas, que representan la fuente de inóculo más importante para nuevas infecciones.

3. Supervivencia y variación estacional de las poblaciones de *Xylella fastidiosa*

La detección y densidad de población de *X. fastidiosa* presenta una variación estacional que en gran medida depende de la planta huésped y zona geográfica, como demuestran diversos estudios en naranjo dulce (*Citrus sinensis*), vid (*Vitis* spp.) (Hopkins, 1980), roble rojo (*Quercus rubra*) (Chang y Walker, 1988) o plátano de sombra (*Platanus* spp.) (Henneberger *et al.*, 2004).

En viñedo en California (EEUU) la bacteria no es detectada hasta mayo o principios de junio, alcanza su máximo nivel en el xilema en verano y decrece paulatinamente hasta principio del invierno (Hopkins y Thomson, 1984). En roble rojo en Georgia (EEUU), la bacteria puede ser aislada solo desde agosto hasta enero, con una frecuencia máxima de aislamiento en noviembre (Chang y Walker, 1988). En naranjo dulce en Florida (EEUU) su comportamiento es similar a viñedo, alcanzando su mayor nivel poblacional al final del verano, decrece en otoño, y alcanza un nuevo pico en invierno (Hopkins, 1980); dinámica similar a la que se observa en plátano de sombra en Georgia con un pico de diciembre a febrero y un segundo pico de julio a septiembre (Henneberger *et al.*, 2004). Hopkins (1980) sugiere que esta dinámica poblacional de la bacteria estaría relacionada con la senescencia de la vid que desencadenaría el pico de la población bacteriana en otoño, pero no explicaría un segundo pico en invierno que se produce tras el reposo del huésped. Chang y Walker (1988) sugieren que el pico invernal puede ser debido a la multiplicación de la bacteria en los tejidos subterráneos al final del invierno y su transporte hacia los tejidos aéreos a partir de enero. Por tanto, factores diferentes a los climáticos, como la senescencia de la hoja, hibernación del huésped y variaciones en las poblaciones de los vectores y su eficiencia de transmisión, podrían asimismo contribuir a esta dinámica estacional (Henneberger *et al.*, 2004).

Por otro lado, los estudios que relacionan la dinámica poblacional de *X. fastidiosa* en raíz son escasos. En plátano de sombra, Henneberger *et al.* (2004) no encontraron correlación entre la población bacteriana en el tejido radical y la temperatura del suelo. La población bacteriana en las ramas estuvo negativamente correlacionada con el número de horas acumuladas por debajo de -5 °C. En raíz, temperaturas deletéreas para la bacteria inferiores de 2,5 °C únicamente se alcanzaron a 10 cm de profundidad, nunca a 20 cm, lo cual impediría el efecto negativo de las bajas temperaturas en la población bacteriana. Estos resultados coinciden con los observados en cítricos en Florida, en los que la frecuencia de detección de la bacteria fue máxima de junio a septiembre y de diciembre a febrero (Hopkins *et al.*, 1991). Además, sugieren que, en áreas con clima moderado como el caso de Florida, las temperaturas mínimas invernales no son lo suficientemente bajas como para causar una muerte significativa de la bacteria, al contrario de lo observado en vid en la zona noroeste del Pacífico de EEUU (Purcell, 1980). Esta hipótesis está apoyada por estudios de Feil y Purcell (2001) que relacionan la supervivencia y crecimiento de *X. fastidiosa* con la temperatura tanto *in vitro* como en tejidos infectados. Aunque *in vitro* no se observa crecimiento por debajo de 12 °C, la temperatura mínima para el crecimiento *in planta* estuvo entre 17 y 25 °C, decreciendo, aunque de forma atenuada en plantas a 5 °C que mostraron poblaciones superiores a 10⁶ células bacterianas/g de tejido tras 18 días. A 10 °C la población bacteriana decrece muy ligeramente (x10 veces células/g) durante los nueve primeros días, pero se estabiliza posteriormente a un nivel comparable al de la población inicial antes del tratamiento térmico. Estos resultados sugieren que, aunque los niveles poblacionales de células puedan reducirse o retardarse a temperaturas subóptimas, se puede mantener una población bacteriana remanente en los tejidos. Resultados similares han sido obtenidos en las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*, tipo necrosis marginal o chamuscado foliar, en especies leñosas ornamentales y forestales, que suelen darse en climas más fríos como los que se dan más al norte de EEUU, que aquellas como la EP en vid o la enfermedad del falso melocotonero que prevalecen en climas más cálidos (Purcell y Hopkins, 1996). Así, Kostka *et al.* (1986) aisló la bacteria de robles en el estado de Nueva York y Pensilvania (EE UU) y Sherald *et al.* (1987) describió el chamuscado del arce rojo en el norte de Virginia. Los mecanismos de supervivencia de *X. fastidiosa* en estas especies no se han podido determinar, pero se ha sugerido que el patógeno puede acumularse y sobrevivir en la raíz donde queda aislada del suelo (Chang y Walker,

1988), o bien que las estirpes de *X. fastidiosa* que son capaces de infectar estas especies leñosas en zonas más al norte presentan una mejor adaptación a las bajas temperaturas.

La capacidad de supervivencia de *X. fastidiosa* al invierno puede variar con la estirpe de la bacteria y la planta huésped. Así, infecciones producidas en almendro en primavera con las cepas o estirpes causantes de la enfermedad de Pierce (que también infecta almendro), escasamente persisten al año siguiente (Davis *et al.*, 1980) y a los dos años, en algunos casos, la bacteria ya no puede ser detectada (Purcell, 1997), lo que puede explicar que las diferencias en la distribución de la enfermedad en almendro y vid en California se deben a una mayor capacidad de supervivencia a las bajas temperaturas de las cepas causantes del chamuscado foliar del almendro. Esta capacidad de supervivencia podría explicar la mayor extensión al norte de los EEUU de la enfermedad en roble (Purcell, 1997), lo que apoya que las limitaciones climáticas a *X. fastidiosa* dependen de la estirpe/subespecie de *X. fastidiosa* y de su interacción con el huésped (Purcell, 1997). Por otro lado, la influencia de las altas temperaturas en la incidencia de enfermedades causadas por *X. fastidiosa* no se ha estudiado. Los síntomas generalmente aparecen antes y son más severos en regiones con veranos cálidos, pero que generalmente también tienen temperaturas invernales moderadas (Hewitt *et al.*, 1949). No obstante, la severidad del enanismo de la alfalfa en los desiertos cálidos de California y la de la clorosis variegada de los cítricos en el clima tropical en Brasil (Lee *et al.*, 1991) indicarían que las temperaturas elevadas no limitan la enfermedad causada por ciertas estirpes/subespecies.

4. Tipos de clima en que se desarrolla *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa está presente en una amplia diversidad de zonas climáticas (Figura 1, pág. 64), aunque particularmente prevalece en los países de los trópicos y subtrópicos como Brasil, Costa Rica u Honduras. Se encuentra asimismo en áreas en las que las condiciones climáticas son similares a las que prevalecen en las zonas de clima Mediterráneo como California, o los recientes focos identificados en diversas regiones europeas como sur de Italia, Córcega y la Costa Azul en Francia, o las Islas Baleares y la Comunidad Valenciana en España. No obstante, podemos encontrar registros de enfermedades causadas por *X. fastidiosa* en regiones con climas mucho más fríos como los estados de New Jersey y Washington en EEUU o aún más al norte en la península del

Niágara, sur de Ontario, la Columbia Británica, Saskatchewan o Alberta en Canadá (EFSA, 2015).

Para inferir zonas con condiciones climáticas favorables para *X. fastidiosa* se han utilizado diversas aproximaciones, pero estas se han realizado fundamentalmente para EEUU y para la subespecie *fastidiosa* que causa la EP en vid. Feil y Purcell (2001) utilizando las isotermas de las temperaturas mínimas invernales propusieron para esta enfermedad los siguientes niveles de severidad y rangos térmicos (temperaturas mínimas invernales): impacto severo > 4,5 °C), moderado (1,7 a 4,5 °C), ocasional (1,7 a -1,1 °C) o raro (< -1,1 °C) en vid. No obstante, Anas *et al.* (2008) describen la enfermedad en el sureste de EEUU como de ocurrencia ocasional, estableciendo las áreas con riesgo de enfermedad de Pierce en Georgia y Arizona a temperatura mucho más bajas en base al número de días con temperatura mínima por debajo de -12,2 °C o -9,4 °C. Por otro lado, Hoddle (2004) utilizó el modelo CLIMEX para la elaboración de mapas de distribución potencial de la enfermedad de Pierce y su vector en California *Homalodisca vitripennis* basándose en datos de Feil y Purcell (2001) y concluyendo que regiones con clima tropical, semitropical, templado y mediterráneo moderado son adecuadas para la ocurrencia de ambos organismos. Así, la mayor parte de las regiones vitícolas de Nueva Zelanda, Australia, el sur de Francia, centro y sur de España e Italia presentan condiciones climáticas adecuadas para la EP. Por el contrario, las bajas temperaturas invernales excluirían esta enfermedad de las zonas de cultivo de viñedo de Francia y las zonas norte de España e Italia. Sin embargo, también considera no adecuado debido a las bajas temperaturas la zona de los Balcanes, donde la enfermedad fue descrita en Kosovo (Hoddle, 2004).

5. Idoneidad climática para el desarrollo de epidemias causadas por *Xylella fastidiosa* en España

En el marco de los proyectos internacionales PONTE y XF-ACTORS, financiados por la UE mediante el programa H2020, se están desarrollando modelos de riesgo y distribución potencial de *X. fastidiosa* en Europa a diversas escalas geográficas, desde la continental a la regional. *X. fastidiosa* puede desarrollarse en una gran variedad de tipos climáticos, aunque es particularmente prevalente en climas: subtropical húmedo, mediterráneo, mediterráneo con veranos frescos, estepario frío, sabana, subtropical con invierno seco, oceánico

o continental con veranos cálidos, muchos de los cuales están presentes en distintas regiones de Europa (Figura 2). En particular, España cuenta con climas: mediterráneo, mediterráneo con veranos frescos, oceánico y estepario frío que constituyen gran parte del territorio y en los que *X. fastidiosa* podría establecerse (Figura 1). Por otro lado, las temperaturas mínimas en invierno que prevalecen en gran parte de los países del sur de Europa presentan condiciones climáticas en las que siguiendo el criterio establecido por Purcell y Feil (2001) permitirían la supervivencia de *X. fastidiosa* (Figura 2) y en las que además predominan cultivos tan relevantes para la economía europea como olivar o viñedo. Es de destacar que en Europa todos aquellos lugares en que *X. fastidiosa* ha sido descrita en Italia, Francia y España presentan condiciones climáticas consideradas favorables para su supervivencia (Figura 2), lo que demuestra la validez de este criterio. Esta situación es particularmente preocupante en Andalucía, donde prácticamente la totalidad de las zonas de cultivos de olivar presentarían condiciones climáticas que permitirían la supervivencia y posterior establecimiento de *X. fastidiosa* si llegase a introducirse, en particular en la parte baja del valle del Guadalquivir, en las provincias de Córdoba, Sevilla y Cádiz. En cualquier caso, como se ha indicado anteriormente, estos valores umbrales de temperatura mínima invernal se han desarrollado para las cepas de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* que infectan vid en EEUU, por lo que será necesario estimar dichos umbrales para las estirpes de la bacteria identificadas en Europa y las plantas huésped (incluyendo las variedades específicamente cultivadas) en nuestras regiones, ya que cada una de las subespecies presenta condiciones climáticas diferenciales, y no existen aún estudios suficientes sobre la variabilidad entre cepas (Navas-Cortés, J. A., datos no publicados).

En conclusión, la información disponible confirma que en particular los países del sur de Europa presentan condiciones climáticas que se muestran adecuadas para la supervivencia y posiblemente el establecimiento de *X. fastidiosa* en caso de su introducción y establecimiento, tal y como están demostrando la repetida ocurrencia de epidemias severas causadas por distintas subespecies de *X. fastidiosa* en diferentes plantas huésped en territorio europeo y que apoyan en gran medida las previsiones establecidas por el Panel de Sanidad Vegetal de EFSA en su Análisis de Riesgo de 2015 que establecía el riesgo para la EU como elevado (EFSA, 2015).

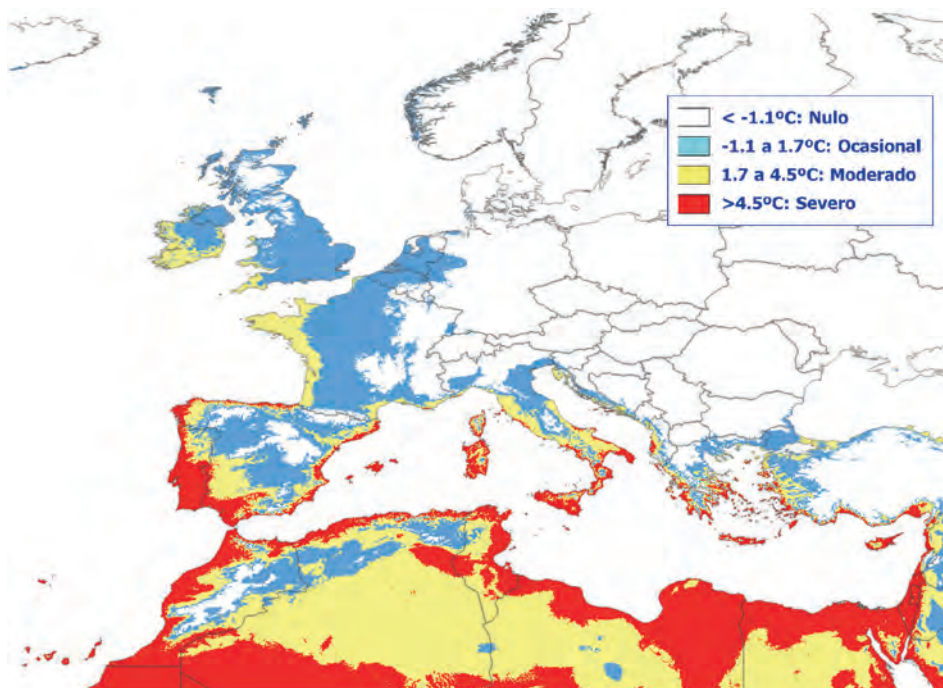
Figura 1. Clasificación climática de Köppen–Geiger para Europa con indicación de tipos climáticos en que se ha citado la ocurrencia de *Xylella fastidiosa* en el mundo (EFSA, 2016) así como los tipos de clima prevalentes en Europa y España



* Grupos climáticos: A: tropical, Af: ecuatorial, Am: monzónico, Aw: sabana; B: seco, BSh: estepario cálido, BSk: estepario frío, BWh: desértico cálido, BWk: desértico frío; C: latitudes medias, Cfa: subtropical húmedo, Cfb: oceánico, D: continental con inviernos muy fríos, Dfa: continental con verano cálido, Dfb: continental con verano fresco, Dfc: continental subártico o boreal, Dsa: continental con verano cálido (Kottek *et al.*, 2006). Datos climáticos: CliMond (Kriticos *et al.*, 2011).

Fuente: Navas Cortes *et al.* (2017).

Figura 2. Potencial para el establecimiento de *Xylella fastidiosa* en Europa en función de la temperaturas mínimas invernales según criterio Fail y Purcell (2001)



* Datos climáticos: WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005).

Fuente: Navas Cortes *et al.* (2017).

Agradecimientos

Parte de la información recogida en este trabajo está financiada por los proyectos N. 635646 POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y N. 727987 XF-ACTORS (*Xylella Fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy) del Programa de Investigación e Innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea.

Referencias bibliográficas

- ADLERZ, W. C. y HOPKINS, D. L. (1979): «Natural infectivity of two sharp-shooter vectors of Pierce's disease of grape in Florida»; *J. Econ. Entomol.* (72); pp. 916-919.
- ANAS, O.; HARRISON, U.; BRANNEN, P. M. y SUTTON, T. B. (2008): «The effect of warming winter temperatures on the severity of Pierce's disease in the Appalachian mountains and Piedmont of the southeastern United States»; disponible en: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2008/pierces/>.
- CHANG, C. J. y WALKER, J. T. (1988): «Bacterial leaf scorch of northern red oak: Isolation, cultivation, and pathogenicity of a xylem-limited bacterium»; *Plant Dis.* (72); pp. 730-733.
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H. y THOMSON, S. V. (1980): «Isolation medium for the Pierce's disease bacterium»; *Phytopathology* (70); pp. 734-739.
- EFSA (2015): «Scientific opinion on the risk to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options»; *EFSA Journal* (13)3989; pp. 262.
- EFSA (2016): «Scientific report on the update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*»; *EFSA Journal* (14)4378; pp. 40.
- FEIL, H. y PURCELL, A. H. (2001): «Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines»; *Plant Dis.* (85); pp. 1230-1234.
- GROVES, R. L.; CHEN, J.; CIVEROLO, E. L.; FREEMAN, M. W. y VIVEROS, M. A. (2005): «Spatial analysis of almond leaf scorch disease in the San Joaquin Valley of California: factors affecting pathogen distribution and spread»; *Plant Dis.* (89); pp. 581-589.
- HENNEBERGER, T. S. M.; STEVENSON, K. L.; BRITTON, K. O. y CHANG, C. J. (2004): «Distribution of *Xylella fastidiosa* in sycamore associated with low temperature and host resistance»; *Plant Dis.* (88); pp. 951-958.
- HEWITT, W. B.; HOUSTON, B. R.; FRAZIER, N. W. y FREITAG, J. H. (1946): «Leafhopper transmission of the virus causing Pierce's disease of grape and dwarf of alfalfa»; *Phytopathology* (36); pp. 117-128.
- HEWITT, W. B.; FRAZIER, N. W. y FREITAG, J. H. (1949): «Pierce's disease investigations»; *Hilgardia* (19); pp. 207-264.

- HIJMANS, R. J.; CAMERON, S. E.; PARRA, J. L.; JONES, P. G. y JARVIS, A. (2005): «Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas»; *Int. J. Climatol.* (25); pp. 1965-1978.
- HODDLE, M. S. (2004): «The potential adventive geographic range of glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata* and the grape pathogen *Xylella fastidiosa*: implications for California and other grape growing regions of the world»; *Crop Prot.* (23); pp. 691-699.
- HOPKINS, D. L. (1980): «Use of the pin-prick inoculation technique to demonstrate variability in virulence of the Pierce's disease bacterium»; en *Proc. VIIth Int. Conf. Viruses Grapevine (ICVG)*. Canadá, Niagara Falls. pp. 177-180.
- HOPKINS D. L.; BISTLINE F. W.; RUSSO L. W. y THOMPSON C. M. (1991): «Seasonal fluctuation in the occurrence of *Xylella fastidiosa* in root and stem extracts from citrus with blight»; *Plant Dis.* (75); pp. 145-147.
- HOPKINS, D. L. y PURCELL, A. H. (2002): «*Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases»; *Plant Dis.* (86); pp. 1056-1066.
- HOPKINS, D. L. y THOMPSON, C. M. (1984): «Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in 'Carlos' and 'Welder' muscadine grapes compared with 'Schuyler' bunch grape»; *HortScience* (19); pp. 419-420.
- KOSTKA, S. J.; TATTAR, T. A. y SHERALD, J. L. (1986): «Elm leaf scorch: Abnormal physiology in American elms infected with fastidious, xylem-inhabiting bacteria»; *Can. J. Forest Res.* (16); pp. 1088-1091.
- KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B. y RUBEL, F. (2006): «World map of the Köppen-Geiger climate classification updated»; *Meteorologische Zeitschrift* (15); pp. 259-263.
- KRITICOS, D. J.; WEBBER, B. L.; LERICHE, A.; OTA, N.; MACADAM, I.; BATHOLS, J. y SCOTT, J. K. (2012): «CliMond: global high-resolution historical and future scenario climate surfaces for bioclimatic modelling»; *Methods Ecol. Evol.* (3); pp. 53-64.
- LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN, F. A. y AMORIM, L. (1998): «Dynamics and structure of citrus variegated chlorosis (CVC) foci»; *Fitopatol. Bras.* (23); pp. 36-41.

- LEE, R. F.; DERRICK, K. S.; BERETTA, M. J. G.; CHAGAS, C. M. y ROSETTI, V. (1991): «Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil»; *Citrus Industry* (10); pp. 12.
- NAVAS CORTÉS, J. A.; MONTES BORREGO, M. y LANDA B. B. (2017): «*Xylella fastidiosa* en el sur de Europa: cuando el clima no es un problema para su establecimiento»; *Phytoma-España* (289); pp. 30-35.
- PURCELL, A. H. (1974): «Spatial patterns of Pierce's disease in the Napa Valley»; *Am. J. Enol. Vitic.* (25); pp. 162-167.
- PURCELL, A. H. (1997): «*Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat?»; *J. Plant Pathol.* (79); pp. 99-105.
- PURCELL, A. H. (1980): «Environmental therapy for Pierce's disease of grapevines»; *Plant Dis.* (64); pp. 388-390.
- PURCELL, A. H. y HOPKINS, D. L. (1996): «Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens»; *Annu. Rev. Phytopathol.* (34); pp. 131-151.
- ROBERTO, S. R.; FARIAS, P. R. S. y BERGAMIN FILHO, A. (2002): «Geostatistical analysis of spatial dynamic of citrus variegated chlorosis»; *Fitopatol. Bras.* (27); pp. 599-604.
- SHERALD, J. L.; WELLS, J. M.; HURTT, S. S. y KOSTKA, S. J. (1987): «Association of fastidious, xylem-inhabiting bacteria with leaf scorch in red maple»; *Plant Dis.* (71); pp. 930-933.
- TUBAJIKA, K. M.; CIVEROLO, E. L.; CIOMPERLIK, M. A.; LUVISI, D. A. y HASHIM, J. M. (2004): «Analysis of the spatial patterns of Pierce's disease incidence in the Lower San Joaquin Valley in California»; *Phytopathology* (94); pp. 1136-1144.
- VIVEROS, M. (2003): «Almond leaf scorch, almond version of Pierce's disease, increasing in Kern County»; publicación digital: *Kern/Tulare GWSS Update, University of California Cooperative Extension*. Disponible en: <http://cekern.ucdavis.edu/> <http://cekern.ucdavis.edu/>.

Vectores de *Xylella fastidiosa*

Marina Morente y Alberto Fereres

Instituto de Ciencias Agrarias, CSIC (España, Madrid)

1. Introducción

La mayoría de los artrópodos vectores de patógenos de plantas son insectos y, dentro de este grupo, los hemípteros constituyen el orden con un mayor número de vectores de enfermedades (Harris y Maramorosch, 2013). Los hemípteros cuentan con un aparato bucal especializado que les permite penetrar en los tejidos de la planta sin ocasionarle ningún daño, lo que favorece la inoculación de patógenos evadiendo las barreras naturales de la epidermis. A diferencia de los virus de plantas, que dependen en su mayoría de un vector para transmitirse (Fereres y Raccach, 2015), la mayoría de los patógenos procariotas no presentan este tipo de dependencia o, al menos, no es indispensable. Este no es el caso de *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*) y otras bacterias como los mollicutes, que necesitan un hospedador intermediario con el que mantienen una relación compleja (Purcell, 1982).

2. Vectores conocidos de *Xylella fastidiosa*

Todos los vectores de *X. fastidiosa* son hemípteros pertenecientes al suborden Cicadomorpha. En concreto, especies pertenecientes a las superfamilias Cercopoidea, Cicadoidea y Cicadellidae (subfamilia: Cicadellinae) han sido identificadas como vectores de *X. fastidiosa*. En términos coloquiales, el nombre en español de este grupo de insectos es el de «cigarrillas». Dentro de este grupo, los vectores pertenecientes a la subfamilia Cicadellinae, llamados en inglés «sharpshooters», son los más conocidos a nivel mundial. En cambio, en Europa, las especies pertenecientes a las familias Cercopoidea (cercópidos) y Cicadoidea (cicadas) son consideradas como los principales vectores potenciales de la bacteria, dado que los Cicadellinae son bastante escasos (EFSA, 2015). Estos insectos, son organismos que se caracterizan por poseer una potente musculatura en la cabeza que les permite succionar el xilema a niveles

altos de tensión negativa (Redak *et al.*, 2004), de manera que la bacteria puede ser transportada desde los vasos del xilema hasta su aparato bucal, donde esta se instala y multiplica.

3. Vectores de *Xylella fastidiosa* en el continente americano

Xylella fastidiosa es una bacteria bien conocida en el continente americano desde hace más de un siglo, donde produce enfermedades en numerosas plantas cultivadas, y especies de ornamentales y forestales. En especial, la enfermedad de Pierce (PD) de la vid, en California, y la clorosis variegada de los cítricos (CVC), en Brasil, han ocasionado problemas considerables en la agricultura americana en el siglo XX (Hopkins y Purcell, 2002).

Actualmente hay identificadas 359 especies de plantas hospedadoras de la bacteria pertenecientes a 75 familias (EFSA, 2015), y 39 especies y 19 géneros de Cicadellinae transmisores de *X. fastidiosa* en el continente americano (EFSA, 2015). En concreto, solo en California existen al menos 20 especies de vectores de la bacteria en vid pertenecientes a las familias Cicadellidae y Cercopidae (Frazier, 1965). De ellas, las más importantes históricamente son *Graphocephala atropunctata* (Signoret), *Draeculacephala minerva* (Ball) y *Xyphon* (*Carneiocephala*) *fulgida* (Nottingham) (Redak *et al.*, 2004). Estas especies pasan el invierno en estado de adulto en la vegetación herbácea que rodea a los viñedos y, una vez llegada la primavera, se desplazan hacia el cultivo para alimentarse. De este modo, la incidencia de la enfermedad es mayor en aquellas plantas cercanas a los bordes del cultivo, disminuyendo hacia el interior, sobre todo en viñedos rodeados de alfalfa con irrigación, y donde se deja crecer la hierba hasta los meses de verano. Según la hipótesis propuesta por Purcell en 1981 y comprobada por Feil *et al.* en 2003, las inoculaciones de la bacteria llevadas a cabo en los meses de primavera y verano temprano favorecen el establecimiento de la enfermedad en la planta, que se hace crónica. Sin embargo, aquellas inoculaciones realizadas más tarde producen la enfermedad en la planta pero esta no persiste. En gran parte, este fenómeno se debe a la poda severa de la vid en los meses de invierno, en la que se eliminan aquellas zonas de la planta que han sido infectadas sin dar tiempo a que la bacteria se propague hasta las zonas maduras de la planta.

La introducción del cicadélido *Homalodisca vitripennis* (Germar) en California en la década de 1990, procedente de México, es un claro ejemplo de

cómo la epidemiología de una enfermedad puede cambiar y hacerse mucho más severa por la entrada de un nuevo vector en una determinada zona geográfica (Fereres, 2015). Este vector se alimenta preferentemente en la base de los nuevos brotes o en la corteza de la vid, favoreciendo un establecimiento rápido de la bacteria en la planta durante el verano, haciendo inútil el control de la enfermedad mediante poda (Purcell y Saunders, 1999). Además, a diferencia de otros vectores de PD, puede transmitir la bacteria entre vides en estado latente durante el invierno (Almeida *et al.*, 2005), aumentando la tasa de plantas que desarrollan la enfermedad de manera crónica y cambiando, así, el patrón de aparición de focos del nuevo brote y aumentando su severidad (Perring *et al.*, 2001). En referencia a la CVC, se conocen 13 especies de vectores en Brasil pertenecientes a la familia Cicadellidae: Cicadellinae (Spotti Lopes y Krugner, 2016), de las cuales *Acrogonia citrina* (Marucci y Cavichioli), *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* (Young), *Macugonalia leucomelas* (Walker) y *Oncometopia fascialis* (Signoret) son considerados los cinco vectores clave en la propagación de la enfermedad. Son especies que se suelen encontrar en las copas de los cítricos, siendo *B. xanthophis* el vector más abundante en viveros y cultivos jóvenes (Paiva Branco *et al.*, 1996). Así, *B. xanthophis* desempeña un papel clave en el establecimiento de la enfermedad, debido a que la inoculación de *X. fastidiosa* en ejemplares jóvenes favorece la colonización rápida del tronco, de manera que la poda no llega a eliminar las partes infectadas. Además, su capacidad de inocular árboles de vivero promueve la dispersión a larga distancia a través del transporte de plantones infectados a otras zonas (Almeida *et al.*, 2005). A nivel general, la tasa de transmisión de estos vectores es baja; sin embargo, la baja especificidad de vector respecto a la cepa de *X. fastidiosa* responsable de la CVC favorece la dispersión de esta hacia nuevas áreas (Spotti Lopes y Krugner, 2016).

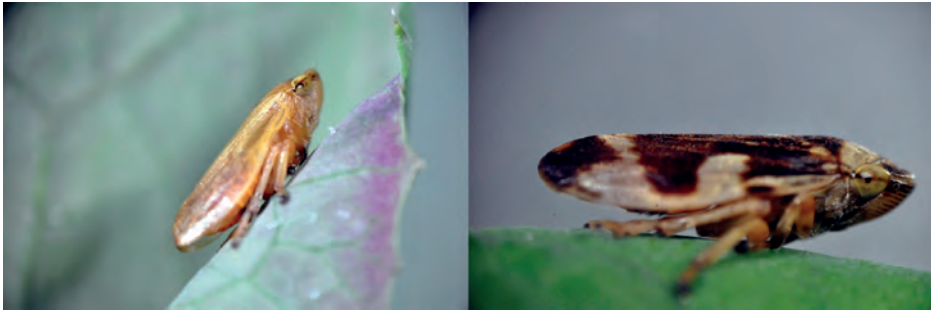
4. Vectores de *Xylella fastidiosa* en Europa

A diferencia de la gran cantidad de información que existe sobre los vectores de *X. fastidiosa* en el continente americano, la reciente detección de la bacteria en Europa hace que la información sea escasa. Además se debe considerar que, a excepción de *Philaenus spumarius* (Linnaeus) (Hemiptera: Aphrophoridae), descrito como vector de la bacteria en California por Severin en 1950, el resto de hemípteros que se alimentan de xilema en Europa son especies diferentes a las americanas (de Jong, 2013).

Tras el brote de *X. fastidiosa* en los olivares de la península de Salento, Saponari *et al.* (2014) lograron identificar a *P. spumarius* como un agente capaz de transmitir la bacteria, pero inicialmente no obtuvieron resultados positivos en la transmisión de *X. fastidiosa* en olivo. Posteriormente, Cornara *et al.* (2016) analizaron la presencia de *X. fastidiosa* en cinco posibles vectores: *P. spumarius*, *Neophilaenus campestris* (Fallén), *Cicada orni* (Linnaeus), *Cercopis sanguinolenta* (Scopoli) y *Euscelis lineolatus* (Brullè), obteniendo un único caso positivo en *N. campestris* y un 50 % de individuos de *P. spumarius* infectados. Además, obtuvieron resultados positivos en los ensayos de transmisión de olivo a olivo, lo que permitió identificar a *P. spumarius* como el primer vector de *X. fastidiosa* en Europa. Por el momento, *P. spumarius* es el único vector conocido en nuestro continente; sin embargo, cualquier Cicadomporpha que se alimente de xilema podría teóricamente actuar como vector de la bacteria (Purcell, 1989). Este podría ser el caso de las cigarras (Hemiptera: Cicadidae), muy comunes en cultivos como el olivo y descritas como vectores poco eficientes de *X. fastidiosa* en América (Paião *et al.*, 2002; Krell *et al.*, 2007).

Philaenus spumarius pertenece al orden Hemiptera, superfamilia Cercopoidea, familia Aphrophoridae. Es un insecto polífago ampliamente distribuido a nivel mundial (Drosopoulos y Remane, 2000) que se caracteriza por su gran polimorfismo (Stewart y Lees, 1996) (Figura 1) y, como todos los Cercopoidea, por la secreción de una espuma envolvente y protectora en el estado de ninfa (Weaver y King, 1954) (Figura 2). A pesar de que cientos de adultos de *P. spumarius* se desplazan a los olivares de Italia a alimentarse durante la primavera (Martelli, 2016), esta especie no había sido clasificada como una plaga importante del olivo anteriormente (Whittaker, 1973). Sin embargo, tras la introducción de *X. fastidiosa*, *P. spumarius* se convierte en un medio de inoculación muy efectivo al desplazarse entre las plantas de olivos propagando la enfermedad y provocando graves problemas en los olivares del sur de Italia (Martelli *et al.*, 2016).

Figura 1. Dos de los morfotipos del adulto de *P. spumarius*



**Figura 2. Ninfa de *P. spumarius* rodeada de espuma.
Aspecto de las espumas en la vegetación**



5. Biología y ecología de los insectos vectores de *X. fastidiosa*

5.1. Cicadellidae: Cicadellinae

5.1.1. Ciclo biológico

La mayoría de trabajos relacionados con el ciclo biológico y la ecología de los *sharpshooters* vectores de *X. fastidiosa* en América toman como especie de estudio *H. vitripennis*. Esta especie tiene un ciclo biológico que produce dos generaciones al año. La primera generación aparece a principios de mayo durante la cual las hembras sufren un proceso de maduración de los huevos tras el que comienzan a ovipositar, dando lugar a la segunda generación. Las puestas son depositadas bajo la epidermis de hojas o de tallos blandos en grupos de 4 a 28 huevos unidos por una secreción cementosa. Pasan el invierno en estado adulto en zonas arboladas (Turner y Pollard, 1959), donde se refugian y alimentan. Durante esta época entran en diapausa reproductiva y, aunque existen observaciones de acoplamiento durante el mes de enero (Turner y Pollard, 1959), la oviposición no comienza hasta principios de la primavera (Lauzière y Sétamou, 2010).

En lo referente al continente europeo, *Cicadella viridis* (L.) es uno de los pocos Cicadellinae identificados como vector potencial de *X. fastidiosa*. Su ciclo biológico se caracteriza por tener tres generaciones al año (Chu y Teng, 1950). Pasa el invierno en forma de huevo, que deposita desde septiembre hasta finales del otoño sobre la corteza de troncos o arbustos (Linskii, 1980). Los adultos mueren cuando empiezan las heladas, y la eclosión de estas puestas se produce en abril (Linskii, 1980). Las ninfas se alimentan de diferentes hospedadores, dando lugar a los nuevos adultos entre mayo y julio. Las hembras de la segunda generación ovipositan sobre gramíneas (Chu y Teng, 1950), dando lugar a la tercera generación que emerge en el mes agosto. Finalmente, los adultos se desplazan a cultivos de frutales y otros árboles en otoño con el objetivo de ovipositar en sus troncos, cerrando el ciclo (Zhixian, 1996).

5.1.2 Distribución geográfica

La subfamilia Cicadellinae es un grupo muy diverso que recoge aproximadamente 1.950 especies (Mejdalani, 1998). Por lo general están ligadas a zonas de vegetación abundante como pastos o cultivos de cereales (Redak *et al.*, 2004). Se divide en dos tribus: Proconiini y Cicadellini. Los Proconiini

están ligados al Nuevo Mundo mientras que los Cicadellini son un grupo más numeroso que se encuentra distribuido por todas las zonas geográficas del planeta (Young 1968, 1977, 1986), aunque la mayoría de ellos son de distribución neotropical.

5.1.3 Hábitos de alimentación

El xilema es un medio pobre en nutrientes que está formado principalmente por agua, algunos aminoácidos (la mayoría de ellos no esenciales) y ácidos orgánicos, y carbohidratos a bajas concentraciones (Andersen y Brodbeck, 1989). Así, algunas adaptaciones, como una alta tasa de alimentación o una eficiencia alta en el uso de los componentes del xilema, son vitales para poder subsistir alimentándose exclusivamente de este recurso (Andersen *et al.*, 1989).

Tanto la ninfa como el adulto de *H. vitripennis* presentan un comportamiento alimenticio similar. Sin embargo, las ninfas necesitan una dieta baja en amidas y con una concentración mayor de otros aminoácidos (Brodbeck *et al.*, 1996). No se conoce aún si las ninfas de estos insectos también se alimentan del floema, además del xilema, durante determinadas fases de su desarrollo. Los adultos son altamente polífagos y tienen un hábito alimenticio diurno con una tasa máxima de alimentación al medio día (Andersen *et al.*, 1989), que coincide con el pico de máxima concentración de nitrógeno y otros constituyentes orgánicos en el xilema (Andersen *et al.*, 1992).

5.2. Cercopoidea

5.2.1 Ciclo biológico

La duración del ciclo biológico y el número de generaciones por año en los Cercopoidea varía con la especie y las condiciones climáticas locales (Valério *et al.*, 2001). En el caso de *P. spumarius*, el ciclo biológico es de metamorfosis sencilla, y está formado por las fases de huevo, ninfa y adulto, dando lugar a una generación al año. Pasa el invierno en forma de huevo, aunque se ha observado que el adulto puede sobrevivir en esta época cuando las temperaturas son suaves (Saponari *et al.*, 2014). Tras aproximadamente 100 días de diapausa, la eclosión de los huevos se produce al principio de la primavera (West y Lees, 1988) e, inmediatamente después, las ninfas se desplazan hacia los primeros brotes vegetales en busca de alimento y protección, completando

su desarrollo en 5-8 semanas tras pasar por 5 estadíos, durante los que se encuentran cubiertas por una espuma mucilaginosa que les protege. Los primeros adultos aparecen durante el mes de abril o mayo y comienzan a acoplarse a principios de verano, permaneciendo en la vegetación colindante hasta que se seca o se elimina. Según Weaver y King (1954), la primera fecha de oviposición en Ohio (EEUU) se da en septiembre, extendiéndose hasta que la hembra muere en invierno. Sin embargo, nuestras observaciones personales nos indican que en España la oviposición empieza a principios de noviembre o incluso más adelante dependiendo de la climatología.

Estos insectos realizan las puestas sobre restos de vegetación seca y trozos de corteza del tronco, normalmente cerca del suelo. Los huevos van unidos por un cemento espumoso en grupos de diferente tamaño (de 1 a 30, con una media de 7), son ovalados, de color amarillento y presentan una mancha anaranjada en uno de sus extremos (Figura 3).

Figura 3. Puesta de *P. spumarius*. Los huevos son depositados en fila rodeados de una espuma cementosa



5.2.2. Distribución geográfica

Los huevos de los Cercopoidea necesitan una humedad superior al 80 % para poder eclosionar (Weaver y King, 1954). Esta dependencia de las condiciones climáticas limita su área de dispersión a zonas templadas con elevada humedad (Chmiel y Wilson, 1979; Halkka y Halkka, 1990). No obstante, su distribución es muy amplia, pudiéndose encontrar en diferentes latitudes y altitudes de la región Holártica, desde América del Norte hasta Japón, pasando por Europa y Rusia (Stewart y Lees, 1996). Además, han sido descritos en el norte de África, América del sur o Nueva Zelanda donde fueron introducidos en las últimas décadas (Thompson, 1984).

5.2.3 Hábitos de alimentación

La ninfa y el adulto de *P. spumarius* son altamente polífagos (Ossiannilsson, 1981). Así, los podemos encontrar en zonas tan diferentes como praderas, cultivos abandonados, cunetas de carretera, rivera de ríos, bosques, terrenos pantanosos, jardines o tierras de cultivo (Yurtsever, 2000). Se ha registrado un amplio número de plantas hospedadoras (Delong y Severin, 1950; Weaver y King, 1954), aunque preferencialmente se les puede encontrar sobre plantas fijadoras de nitrógeno y aquellas con altas concentraciones de aminoácidos en el xilema, como son *Vicia* spp. o *Xanthium strumarium* (Thompson, 1994). Las primeras ninfas se pueden encontrar en plantas vivaces con la base en roseta, o en aquellas que ofrezcan hojas opuestas muy juntas en las que encuentran protección ante la luz solar y el viento hasta que producen las primeras espumas (Weaver y King, 1954). Los adultos tienden a desplazarse a otras zonas debido al pastoreo, la siega, o a la pérdida de turgencia de las plantas, estableciéndose en nuevas áreas que les ofrezcan plantas hospedadoras con los requerimientos alimenticios que necesitan en ese momento, como es el caso del olivo en Italia (Cornara *et al.*, 2016). En España, sin embargo, *P. spumarius* aparece en densidades muy bajas en olivo (Morente *et al.*, 2017).

6. Transmisión de *Xylella fastidiosa*

X. fastidiosa requiere de un vector especializado en alimentarse de xilema para poder transmitirse (Raven, 1983). Así, Purcell en 1981 comprobó que aquellos hemípteros que se alimentan de floema y del mesófilo, a pesar de alimentarse ocasionalmente de xilema, no tienen la capacidad de transmitir la bacteria.

La transmisión se produce en el siguiente orden: a) adquisición de la bacteria desde la planta fuente, b) anclaje y retención de la bacteria en la cutícula del cibario del vector, y c) desprendimiento e inoculación en un nuevo hospedador (Chatterjee *et al.*, 2008). La infección es persistente en adultos (Severin, 1949) y no existe transmisión transovarial (Freitag, 1951) o entre estadíos, ya que la ninfa, al mudar, pierde la cutícula y con ella las bacterias adheridas a ella (Purcell y Finlay, 1979). Cabe destacar su corto periodo de latencia antes de la transmisión (dos horas para *G. atropunctata* en vid (Purcell y Finlay, 1979), de modo que el vector es infectivo prácticamente en el mismo momento en el que adquiere la bacteria. Por tanto, la transmisión es no circulatoria, es decir, que la bacteria se retiene en la cutícula sin pasar a la hemolinfa del insecto antes de ser transmitida (Purcell y Finlay, 1979).

6.1. Adquisición

La efectividad en la transmisión del patógeno aumenta proporcionalmente con el tiempo de adquisición al que está expuesto el vector (Purcell y Finlay, 1979). La alta dilución de los nutrientes en el xilema hace que los hemípteros tengan que succionar grandes cantidades de savia para completar sus requerimientos nutricionales (Horsfield, 1977), aumentando así el tiempo que están en contacto con el xilema de la planta (Mittler, 1967).

Desde el momento de su adquisición, *X. fastidiosa* coloniza paulatinamente la cutícula del precibario y de la bomba cibarial formando biopelículas en la entrada y otros puntos de esta zona (Purcell *et al.*, 1979), donde la bacteria es retenida y expulsada a la planta durante la alimentación del vector (Purcell, 1989). A lo largo de los primeros días tras la adquisición de *X. fastidiosa*, la baja concentración bacteriana en el aparato bucal del vector hace que la bacteria sea indetectable, aunque el vector ya sea infectivo (Purcell *et al.*, 1979). Sin embargo, la densidad de población de la bacteria en la planta hospedadora influye en la eficiencia de adquisición de la bacteria, ya que un

mayor número de células facilita los encuentros vector-patógeno (Hill y Purcell, 1997; Almeida, 2016). Del mismo modo, la distribución heterogénea que presenta la bacteria en la planta, junto con las preferencias alimenticias de cada vector por diferentes especies de plantas y por la zona de la planta donde se alimentan, son también factores determinantes en la eficacia de transmisión de la bacteria (Daugherty *et al.*, 2010).

6.2. Inoculación

Al igual que en el periodo de adquisición, la inoculación se hace más efectiva con el aumento del tiempo que el vector está en contacto con el xilema de la planta (Almeida y Purcell, 2003). Muchas de las células que se inoculan en el hospedador mueren, de modo que un mayor tiempo de inoculación favorecerá un mayor asentamiento de bacterias en la planta (Almeida *et al.*, 2005). La densidad de población de la bacteria en el vector no está relacionada con la eficiencia en la transmisión (Hill & Purcell, 1995). Por tanto, el número de inoculaciones en una planta es más importante que el número de bacterias introducidas por cada vector (Almeida, 2016). Las biopelículas que forma *X. fastidiosa* crecen lentamente colonizando la red de vasos de xilema desde el punto de entrada; por ello, un mayor número de casos de inoculación facilita la colonización del xilema de la planta en diferentes zonas acelerando la aparición de síntomas (Costa *et al.*, 2000). Otro factor determinante en el éxito en la transmisión es el estado fenológico de la planta en el momento de inoculación de la bacteria (Almeida *et al.*, 2005).

7. Medidas de control de los vectores de *Xylella fastidiosa*

La interrupción de la dispersión de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* debe ser llevada a cabo mediante la interferencia con los principales procesos implicados en la transmisión de la bacteria (Almeida *et al.*, 2005). Actualmente, para controlar la enfermedad de Pierce, se combinan diferentes tácticas que interrumpen parcialmente más de una interacción (Almeida *et al.*, 2005). Las medidas dirigidas al/los vector(es) son las más frecuentes y eficaces por no existir medidas curativas frente a la bacteria.

Los métodos de control de *H. vitripennis* a nivel local en EEUU se centran en reducir el número de individuos en grandes áreas, mantenerlos fuera de los viñedos y manipular su interacción con estos. Esta práctica incluye el

uso de agentes de biocontrol a nivel general y, además, el uso de insecticidas en cítricos y viñedos (Wendel *et al.*, 2004). La efectividad de los piretroides contra *H. vitripennis* es buena y su uso es muy común en el manejo convencional de los viñedos (Hix *et al.*, 2003). Además, los insecticidas sistémicos como los neonicotinoides perturban la relación entre el vector y la bacteria afectando a la orientación del vector o su comportamiento alimenticio. Del mismo modo, los reguladores del crecimiento de insectos son muy efectivos en el control de las ninfas de esta especie (Akey *et al.*, 2002).

Actualmente, como alternativa al control convencional de vector, en los viñedos de las zonas afectadas por PD en EEUU, se está aplicando la tecnología de película de partículas de caolín (Almeida *et al.*, 2005). Esta técnica se basa en el uso del caolín como una barrera protectora contra los insectos, repeliéndolos y evitando la oviposición. Puterka *et al.* (2002) observaron que tanto las ninfas como los adultos de *H. vitripennis* evitan aquellas viñas rociadas con caolín, incluso cuando no tienen otra opción para alimentarse, muriendo en este último caso. Redak y Blua en 2002, tras probar diferentes combinaciones de insecticidas, repelentes y antibióticos, propusieron que la mejor combinación para disminuir las poblaciones de *H. vitripennis* es la formada por nicotinoides y caolín, obteniendo una reducción de un 90 % del número de individuos y de un 75 % en la oviposición.

Existen diferentes alternativas al control convencional por agroquímicos de los vectores de *X. fastidiosa*. Akey *et al.* (2002) proponen los productos derivados del neem, *Azadirachta indica*, como una alternativa a tener en cuenta en el control biológico de las ninfas de *H. vitripennis*. Además, el uso de los enemigos naturales de los vectores de *X. fastidiosa* es una buena herramienta en la lucha contra la dispersión de la bacteria. Así, Kanga *et al.*, en 2004, observaron que *H. vitripennis* es susceptible al ataque de los hongos entomopatógenos *Pseudogibellula formicarum* (Mains) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). Además, algunas especies de parasitoides pertenecientes a las familias Mymaridae y Tricogrammatidae parasitan los huevos de diferentes especies del género *Homalodisca* sp. en el sureste de EEUU. El mayor problema de este tipo de control es que, al disminuir las oviposiciones de *Homalodisca* sp. en invierno, la población de los parasitoides disminuye considerablemente, lo que desemboca en una tasa de parasitismo de huevos baja en primavera (Morgan *et al.*, 2001). Del mismo modo, algunos depredadores como hemípteros, mantis, avispa o arañas depredan sobre las ninfas y los adultos de Cicade-

llinae, y otros, como las larvas de coccinélidos y de crisópidos, depredan las plantas (Morgan *et al.*, 2000).

El desarrollo de insecticidas para combatir a la familia Cercopoidea es muy limitado, debido a que muchos de ellos no son plaga o son plaga de pastos, un cultivo con un valor económico bajo en el que el uso de insecticidas es muy limitado (Valério *et al.*, 2001). A pesar de ello, atendiendo a la dinámica de población y al ciclo de vida de *P. spumarius*, Whittaker (1973) destaca la fase de ninfa como la más adecuada para la aplicación de insecticidas de una manera eficiente. Del mismo modo, Weaver (1951) apuesta por la aplicación de insecticidas en otoño, con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de adultos en esta época y reducir la oviposición.

Los adultos de *P. spumarius* también son atacados por diferentes especies de hongos entomopatógenos pertenecientes al género *Entomophthora* sp. (Ben-Ze'Ev y Kenneth, 1981). Además, existen registros de diferentes vertebrados e invertebrados que actúan como enemigos naturales de *P. spumarius*, pero parece que la presión de depredación sobre esta especie es baja (Whittaker, 1973). En cambio, el díptero *Verrallia aucta* (Fallén) (Diptera: Pipunculidae) presenta una alta tasa de parasitismo sobre los adultos de *P. spumarius*, a los que esteriliza (Harper y Whittaker, 1976). Weaver y King en 1954 describieron diferentes especies de himenópteros parasitoides de huevos de *P. spumarius* pertenecientes a las familias Mymaridae y Eulophidae en Ohio, EEUU. En el mismo trabajo hacen referencia al nematodo parásito *Agamermis decaudata* como otro agente que ataca a *P. spumarius*, aunque su incidencia es baja y no lo consideran un buen regulador de la abundancia de este vector.

Referencias bibliográficas

- AKEY, D.; BLUA, M.; HENNEBERRY, T.; CIVEROLO, E.; TOSCANO, N. C. y WENDEL, L. (2002): «Control of the immature and adult glassy winged sharpshooters: evaluation of biorational and conventional insecticides»; *Proceedings of CDFR Pierce's disease research symposium*, 15-18 de diciembre de 2002. Coronado, CA. pp. 133-135.
- ALMEIDA, R. P. P. y PURCELL, A. H. (2003): «Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* Hemiptera: Cicadellidae»; *J. Econ. Entomol.* 96(2); pp. 264-271.

- ALMEIDA, R. P. P.; BLUA, M. J.; LOPES, J. R. y PURCELL, A. H. (2005): «Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying fundamental knowledge to generate disease management strategies»; *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(6); pp. 775-786.
- ALMEIDA, R. P. P.; HASHIM, J. y PURCELL, A. H. (2005): «Vector transmission of *Xylella fastidiosa* to dormant grape»; *Plant Dis.* 89(4); pp. 419-424.
- Almeida, R.P.P., Nunney, L. 2015. How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? *Plant Dis.* 99(11): 1457-1467.
- ALMEIDA, R. P. P. (2016): «*Xylella fastidiosa* vector transmission biology»; en BROWN, J. K., ed.: *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*. Minnesota, St. Paul, APS Press; pp. 165-174.
- ANDERSEN, P. C. y BRODBECK, B. V. (1989): «Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudate from *Vitis rotundifolia*»; *Physiol. Plant.* 75(1); pp. 63-70.
- ANDERSEN, P. C.; BRODBECK, B. V. y MIZELL, R. F. (1989): «Metabolism of amino acids, organic acids and sugars extracted from the xylem fluid of four host plants by adult *Homalodisca coagulata*»; *Entomol. Exp. Appl.* 50(2); pp. 149-159.
- ANDERSEN, P. C.; BRODBECK, B. V. y MIZELL III, R. F. (1992): «Feeding by the leafhopper, *Homalodisca coagulata*, in relation to xylem fluid chemistry and tension»; *J. Insect Physiol.* 38(8); pp. 611-622.
- BEN-ZE'EV, I. y KENNETH, R. G. (1981): «*Zoophthora radicans* and *Zoophthora petchi* sp. nov. (Zygomycetes: Entomophthorales), two species of the 'Sphaerosperma group' attacking leaf-hoppers and frog-hoppers (Hom.)»; *Entomophaga* (26); pp. 131-142.
- BRLANSKY, R. H.; TIMMER, L. W.; FRENCH, W. J. y MCCOY, R. E. (1983): «Colonization of the sharpshooter vector, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata* by xylem-limited bacteria»; *Phytopathology* 73(4); pp. 530-535.
- BRODBECK, B. V.; ANDERSEN, P. C. y MIZELL, R. F. (1996): «Utilization of primary nutrients by the polyphagous xylophage, *Homalodisca coagulata*, reared on single host species. Arch»; *Insect Biochem. Physiol.* 32(1); pp. 65-83.

- CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R. P. P. y LINDOW, S. (2008): «Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*»; *Ann. Rev. Phytopathol.* 46; pp. 243-271.
- CHMIEL, S. M. y WILSON, M. C. (1979): «Estimation of the lower and upper developmental threshold temperatures and duration of the nymphal stages of the meadow spittlebug, *Philaenus spumarius*»; *Environ. Entomol.* 8(4); pp. 682-685.
- CHU, H. Y. y TENG, K. F. (1950): «Life history of the leafhopper, *Cicadella viridis* L. Homoptera: Cicadellidae»; *Acta Entomologica Sinica* 1(1); pp. 14-40.
- CORNARA, D.; SAPONARI, M.; ZEILINGER, A. R.; DE STRADIS, A.; BOSCIA, D.; LOCONSOLE, G.; BOSCO, D.; MARTELLI, G. P.; ALMEIDA, R. P. P. y PORCELLI, F. (2016): «Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy»; *J. P. Sci.* 90(2); pp. 521-530.
- COSTA, H. S.; BLUA, M. S.; BETHK, J. A. y REDAK, R. A. (2000): «Transmission of *Xylella fastidiosa* to Oleander by the glassywinged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*»; *Hortscience* 35(7); pp. 1265-1267.
- DAUGHERTY, M. P.; LOPES, J. y ALMEIDA, R. P. P. (2010): «Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen»; *Ecol. Entomol.* 35(3); pp. 360-366.
- DELONG, D. M. y SEVERIN, H. H. P. (1950): «Spittle-insect vectors of Pierce's disease virus. I. Characters, distribution and food plants»; *Hilgardia* 19(11); pp. 357-380.
- DROSOPOULOS, S. y REMANE, R. (2000): «Biogeographic studies on the spittlebug *Philaenus signatus* Melichar, 1896 species group Hemiptera: Aphrophoridae with the description of two new allopatric species. Annales de la Société entomologique de France»; *Société entomologique de France*; pp. 269-277.
- EFSA (2015): «Scientific opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options»; *EFSA Journal* (13); pp. 1-262.
- FEIL, H.; FEIL, W. S. y PURCELL, A. H. (2003): «Effects of date of inoculation on the within-plant movement of *Xylella fastidiosa* and persistence of Pierce's disease within field grapevines»; *Phytopathology* 93(2); pp. 244-251.

- FERERES, A. (2015): «Insect vectors as drivers of plant virus emergence»; *Curr. Opin. Virol.* (10); pp. 42-46.
- FERERES, A. y RACCAH, B. (2015): «Plant virus transmission by insects»; *eLS*; pp. 1-9.
- FRAZIER, N. y FREITAG, J. (1946): «Ten additional leafhopper vectors of the virus causing Pierce's disease of grapes»; *Phytopathology* 36(8); pp. 634-637.
- Frazier, N. W. (1965): «Xylem viruses and their insect vectors»; *Proceedings of the International Conference on Virus and Vectors on Perennial Hosts, with Special Reference to Vitis*. Davis, University of California, Division of Agricultural Science; pp. 91-99.
- FREITAG, J. H. (1951): «Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission»; *Phytopathology* 41(10); pp. 920-934.
- FREITAG, J. y FRAZIER, N. (1954): «Natural infectivity of leafhopper vectors of Pierce's disease virus of grape in California»; *Phytopathology* (44); pp. 7-11.
- HALKKA, O. y HALKKA, L. (1990): «Population genetics of the polymorphic meadow spittlebug, *Philaenus spumarius* L.»; *Evol. Biol.* (24); pp. 149-141.
- HARPER, G. y WHITTAKER, J. B. (1976): «The role of natural enemies in the colour polymorphism of *Philaenus spumarius* L.»; *J. Anim. Ecol.* 45(1); pp. 91-104.
- HARRIS, K. F. y MARAMOROSCH, K., eds. (2013): *Vectors of Plant Pathogens*. Nueva York, Academic press.
- HILL, B. L. y PURCELL, A. H. (1995): «Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*»; *Phytopathology* 85(2); pp. 209-212.
- HILL, B. L. y PURCELL, A. H. (1997): «Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector»; *Phytopathology* 87(12); pp. 1197-1201.
- HIX, R. L.; TOSCANO, N. C. y GISPERT, C. (2003): «Area-wide management of the glassy-winged sharpshooter in the Temecula and Coachella Valleys»; *Proceedings of CDFR Pierce's disease research symposium*, 8-11 de diciembre de 2003. Sacramento, CA; pp. 292-294.
- HOPKINS, D. L. y PURCELL, A. H. (2002): «*Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases»; *Plant Dis.* 86(10); pp. 1056-1066.

- HORSFIELD, D. (1977): «Relationships between feeding of *Philaenus spumarius* L. and the amino acid concentration in the xylem sap»; *Ecol. Entomol.* 2(4); pp. 259-266.
- DE JONG, Y. (2013): *Fauna Europaea* version 2.6; <http://www.faunaeur.org/>.
- KANGA, L. H. B.; JONES, W. A.; HUMBER, R. A. y BOYD, D. W. J. (2004): «Fungal pathogens of the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca coagulata* Homoptera: Cicadellidae»; *Fla Entomol.* 87(2); pp. 225-228.
- KRELL, R. K.; BOYD, E. A.; NAY, J. E.; PARK, Y. L. y PERRING, T. M. (2007): «Mechanical and insect transmission of *Xylella fastidiosa* to *Vitis vinifera*»; *J. Enol. Vitic.* (58); pp. 21-216.
- LAUZIÈRE, I. y SÉTAMOU, M. (2010): «Life history studies of *Homalodisca vitripennis* Hemiptera: Cicadellidae, a vector of Pierce's disease of grapevine»; *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103(1); pp. 57-65.
- LINSKII, V. G. (1980): «*Cicadella viridis*»; *Zashchita Rastenii* (7); pp. 62.
- MARTELLI, G. P. (2016): «The current status of the quick decline syndrome of olive in southern Italy»; *Phytoparasitica* 44(1); pp. 1-10.
- MARTELLI, G. P.; BOSCIA, D.; PORCELLI, F. y SAPONARI, M. (2016): «The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency»; *Eur. J. Plant Pathol.* 144(2); pp. 235-243.
- MEJDALANI, G. (1998): «Morfologia externa dos Cicadellinae Homoptera: Cicadellidae: comparacao entre *Versigonalia ruficauda* Walker Cicadellini e *Tretogonia cribata* Melichar Proconini; com notas sobre outras especies e analise da terminologia»; *Revta. bras. Zool.* 15(2); pp. 451-544.
- Mittler, T. E. (1967): «Water tension in plants. An entomological approach»; *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60(5); pp. 1074-1076.
- MORGAN, D. J. W.; TRIAPITSYN, S. V.; REDAK, R. A.; BEZARK, L. G. y HODDLE, M. S. (2000): «Biological control of the glassy-winged sharpshooter: current status and future potential»; *Proceedings California Conference on Biological Control*. California, Riverside; pp. 167-171.
- MORENTE, M.; MORENO, A. y FERRERES, A. (2017): «Vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* en olivares de la península Ibérica: prospección, riesgos y estrategias preventivas de control (POnTE)»; *Phytoma* (285); pp 32-37.
- MORGAN, D. J. W.; PICKETT, C. H. y BEZARK, L. G. (2001): «Biological control of the glassy-winged sharpshooter»; *Biological Control Program*. California, Sacramento, CA, Department of Food and Agriculture.

- OSSIANNILSSON, F. (1981): «The Auchenorrhyncha Homoptera of Fennoscandia and Denmark»; Part 2: *The Families Cicadidae, Cercopidae, Membracidae, and Cicadellidae Excl. Deltocephalinae* 7(2); pp. 223-593.
- PAIÃO, F. G.; MENEGUIM, A. M.; CASAGRANDE, E. C. y LEITE, R. P. (2002): «Envolvimento de cigarras Homoptera, Cicadidae na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro»; *Fitopatol. Bras.* (27); pp. 67.
- PAIVA BRANCO, P. E.; DA SILVA, J. L.; GRAVENA, S. y TAKAO, Y. (1996): «Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja do estado de São Paulo»; *Laranja* 17(1); pp. 41-54.
- PERRING, T. M.; FARRAR, C. A. y BLUA, M. J. (2001): «Proximity to citrus influences Pierce's disease in Temecula Valley vineyards»; *Calif. Agric.* 55(4); pp. 13-18.
- PURCELL, A. H. y FINLAY, A. (1979): «Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers»; *Phytopathology* 69(4); pp. 393-395.
- PURCELL, A. H.; FINLAY, A. H. y MCLEAN, D. L. (1979): «Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectors»; *Science* 206(4420); pp. 839-841.
- Purcell, A. H. (1981): «Vector preference and inoculation efficiency as components of resistance to Pierce's disease in European grape cultivars»; *Phytopathology* 71(4); pp. 429-435.
- Purcell, A. H. (1982): «Insect vector relationships with procaryotic plant pathogens»; *Ann. Rev. Phytopathol.* 20(1); pp. 397-417.
- PURCELL, A. H. y FRAZIER, N. W. (1985): «Habitats and dispersal of the principal leafhopper vectors of Pierce's disease bacterium in the San Joaquin Valley»; *Hilgardia* 53(4); pp. 1-32.
- PURCELL, A. H. (1989): «Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria»; en HARRIS F. K., ed.: *Advances in disease vector research*. Springer, New York; pp. 243-266.
- PURCELL, A. H. y SAUNDERS, S. R. (1999): «Glassy-winged sharpshooters expected to increase plant disease»; *Calif. Agric.* 53(2); pp. 26-27.

- PUTERKA, G. J.; LIVISI, D.; CIVEROLO, E.; KAYIMBI, T.; CIOMPERLIK, M.; BARTELS, D. y WENDEL, L. (2002): «Alternatives to conventional chemical insecticides for control of glassy-winged sharpshooter»; *Proceedings of CDFA Pierce's disease research symposium*, 15-18 de diciembre de 2002. Sacramento, CA; pp. 136-138.
- RAVEN, J. A. (1983): «Phytophages of xylem and phloem: A comparison of animal and plant sap-feeders»; *Adv. Ecol. Res.* (13); pp. 135-234.
- REDAK, R. y BLUA, M. J. (2002): «Impact of layering control tactics on the spread of Pierce's disease by the glassy-winged sharpshooter»; *Proceedings of CDFA Pierce's disease research symposium*, 15-18 de diciembre de 2002. Coronado, CA; pp. 311-313.
- REDAK, R. A.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R. S.; BLUA, M. J.; MIZELL III, R. F. y ANDERSEN, P. C. (2004): «The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology»; *Ann. Rev. Entomol.* 49(1); pp. 243-270.
- SAPONARI, M.; LOCONSOLE, G.; CORNARA, D.; YOKOMI, R. K.; DE STRADIS, A.; BOSCIA, D.; BOSCO, D.; MARTELLI, G. P.; KRUGNER, R. y PORCELLI, F. (2014): «Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* Hemiptera: Aphrophoridae in Apulia, Italy»; *J. Econ. Entomol.* 107(4); pp. 1316-1319.
- SEVERIN, H. H. P. (1949): «Transmission of the virus of Pierce's disease of grapevines by leafhoppers»; *Hilgardia* 19(6); pp. 190-202.
- SEVERIN, H. H. P. (1950): «Spittle-insect vectors of Pierce's disease virus. II. Life history and virus transmission. Hilgardia»; *Agricultural Science Published by the California Agricultural Experiment Station* 19(11); pp. 357-380.
- SPOTTI LOPES, J. R. y KRUGNER, R. (2016): «Chapter 14: Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*»; en LOPES, J. R. S. y KRUGNER, R., eds.: *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society. pp. 195-208.
- STEWART, A. J. A. y LEES, D. R. (1996): «The colour/pattern polymorphism of *Philaenus spumarius* L. Homoptera: Cercopidae in England and Wales»; *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* (35); pp. 69-89.

- THOMPSON, V. (1984): «Colour polymorphism in the introduced spittlebug *Philaenus spumarius* Homoptera: Aphrophoridae in New Zealand»; *NZ Entomol.* 8(1); pp. 86-88.
- THOMPSON, V. (1994): «Spittlebug indicators of nitrogen-fixing plants»; *Ecol. Entomol.* 19(4); pp. 391-398.
- TURNER, W. F. y POLLARD, H. N. (1959): *Life Histories and Behavior of five insect vectors of Phony Peach Disease*. Washington, DC. US Dept. of Agriculture.
- VALÉRIO, J. R.; CARDONA MEJÍA, C.; PECK, D. C.; SOTELO, G. y KELEMU, S. (2001): «Spittlebugs: Bioecology, host plant resistance and advances in IPM»; en *International Grassland Congress*. Proceedings: Grassland ecosystem: An outlook into the 21st Century. Brazilian Society of Animal Husbandry, Sao Pedro, Sao Paulo, BR. p. 1-12.
- WEAVER, C. R. (1951): «The seasonal behaviour of the meadow spittlebug and its relation to a control method»; *J. Econ. Entomol.* 44(3); pp. 163-166.
- WEAVER, C. y KING, D. (1954): «Meadow spittlebug, *Philaenus leucophthalmus* L. Ohio Agricultural Experiment Station»; *Research bulletin* (741); pp. 1-99.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H. Y.; WEISBURG, W. G.; MANDELCO-Paul, L. y BRENNER, D. J. A. (1987): «*Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int.»; *J. Syst. Bacteriol.* 37(2); pp. 136-143.
- WENDEL, L.; CIOMPERLIK, M.; BARTELS, D.; LUVISI, D. y ELMS, D. (2004): «The area-wide pest management of glassy-winged sharpshooter in Kern County»; Proceedings of CDFA Pierce's Disease Research Symposium, 15-18 de diciembre. Sacramento, CA; pp. 15-18.
- WEST, J. y LEES, D. R. (1988): «Temperature and egg development in the spittlebug *Philaenus spumarius* L. Homoptera: Aphrophoridae»; *Entomologist* 107(1); pp. 46-51.
- WHITTAKER, J. B. (1973): «Density regulation in a population of *Philaenus spumarius* L. Homoptera: Cercopidae»; *J. Anim. Ecol.* 42(1); pp. 163-172.
- YOUNG, D. A. (1968): «Taxonomic study of the Cicadellinae Homoptera: Cicadellidae»; *Part 1: Proconiini. United States National Museum Bulletin* (261); pp. 1-287.

- YOUNG, D. A. (1977): «Taxonomic study of the Cicadellinae Homoptera: Cicadellidae. 2. New World Cicadellini and the genus Cicadella»; *Technical Bulletin* (239). EEUU, North Carolina Agricultural Experiment Station.
- YOUNG, D. A. (1986): «Taxonomic study of the Cicadellinae Homoptera: Cicadellidae. Part 3. Old World Cicadellini»; *Technical Bulletin* (281). USA, North Carolina Agricultural Experiment Station.
- YURTSEVER, S. (2000): «On the polymorphic meadow spittlebug, *Philaenus spumarius* L. Homoptera: Cercopidae»; *Turk. J. Zool.* 24(4); 447-449.
- ZHIXIAN, K. Z. (1996): «Study on the biological characters of *Tettigella viridis*»; *Journal of Jilin Agricultural University* (3).

Métodos de inspección, diagnóstico y detección

María M. López^a, Blanca B. Landa^b y Ester Marco-Noales^a

^aInstituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (España, Valencia, Moncada)

^bInstituto de Agricultura Sostenible-CSIC (España, Córdoba)

1. Introducción y métodos de inspección y muestreo

La inspección y la toma de muestras son pasos clave del proceso completo del diagnóstico. Una buena toma y un buen manejo de muestras puede influir positivamente en el resultado de los análisis posteriores, y en el caso de graves enfermedades, como las causadas por *Xylella fastidiosa*, la prevención de nuevas introducciones mediante el diagnóstico sensible y específico de las muestras es esencial.

Los métodos de muestreo aconsejados en las inspecciones de material vegetal en envíos de todo tipo, procedentes de países terceros, se describen en el estándar de la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO, 2016a), donde se indican los procedimientos para la inspección de muestras de todas las posibles plantas huéspedes de *X. fastidiosa* y de sus vectores. Los métodos de muestreo relativos a las inspecciones y toma de muestras en viveros o plantaciones se describen en otro estándar similar (EPPO, 2016b), y las recomendaciones del plan de contingencia español se detallan en el Capítulo 14. La toma de muestras de vectores se describe en el Capítulo 4.

La época de inspección y muestreo es también importante tanto para el análisis de plantas asintomáticas como con síntomas, dado que, como se ha indicado en el Capítulo 3, la concentración de la bacteria problema depende de factores ambientales, de la cepa bacteriana y de la planta huésped. Por ello, para maximizar las probabilidades de detectar la bacteria y de aislarla, los muestreos deben realizarse durante el período vegetativo de las plantas (desde final de primavera hasta principios de otoño en España). En el caso de plantas subtropicales o mantenidas invernadero, la inspección y el muestreo pueden ser durante todo el año.

En base a la información de los brotes europeos, se recomiendan las siguientes épocas aconsejadas de muestreo (EPPO, 2016c):

- Para *Polygala* spp., los muestreos se aconsejan desde finales de primavera hasta principios de otoño.
- Para olivo y adelfa, se indica que en Italia los síntomas se expresan con mayor intensidad en verano, por lo que es preferible muestrear entonces, pero se pueden observar durante todo el año.
- Para plantas de hoja caduca, como los frutales y ornamentales del género *Prunus*, se recomienda el muestreo en verano, ya que las muestras tomadas en otras estaciones suelen ser negativas.
- En vid, el mejor período para la observación de síntomas, según la experiencia de EEUU, es el final del verano y el principio de otoño.
- En caso de ser necesario analizar plantas en estado de parada vegetativa, se recomienda tomar estaquillas leñosas, a partir de las cuales se analizará el xilema para la detección de *X. fastidiosa*.

La toma de muestras es similar para el caso de los envíos y de los viveros o las plantaciones. Después de la toma de muestras, estas deben ser enviadas al laboratorio por el método más rápido posible y, como suelen tomarse en verano, es necesario mantenerlas refrigeradas durante el transporte, pero no congeladas.

Las muestras sintomáticas para ser analizadas en el laboratorio deberán ser de ramas o estaquillas con hojas representativas de todos los síntomas observados y unidas al tallo. Deberán contener al menos de 10 a 25 hojas, y no se aconseja tomar muestras de tallos jóvenes porque no conviene analizar hojas inmaduras. Como la bacteria está confinada en el xilema de las plantas, los análisis se realizan usando los peciolo y nervios principales de las hojas, donde se concentra el máximo número de vasos. Si se van a analizar plantas de pequeño tamaño, conviene enviar las plantas enteras; y si, en cambio, las hojas son de gran tamaño, se pueden enviar varias hojas con sus peciolo.

Las muestras asintomáticas para ser analizadas en el laboratorio deberán ser de ramas o estaquillas con hojas maduras y unidas al tallo. El tipo de material es el mismo que para las plantas con síntomas, pero para plantas individuales el número de ramas para enviar al laboratorio será de 4 a 10, dependiendo del huésped y tamaño de la rama. No se dispone de suficientes datos para el análisis de muestras compuestas de distintas especies de plantas, pero en el caso del cafeto se ha detectado *X. fastidiosa* en muestras de 100 a 200 hojas con peciolo.

La norma ISPM31 (IPPC 2008) proporciona la información necesaria para decidir el número de plantas a muestrear en función de la probabilidad de detectar un positivo en casos concretos. Luego en el laboratorio, el analista decidirá el tamaño de material vegetal a analizar, pero generalmente oscila de 0,5 a 1 g de material vegetal por muestra. En el caso de muestras individuales, esto puede ser suficientemente representativo; pero en el caso de muestras de un lote de varias plantas, puede darse frecuentemente el caso de obtener falsos resultados negativos en el análisis, debido a la distribución irregular de la bacteria entre plantas y dentro de la planta.

Para tomar cada muestra se deben emplear nuevos guantes a fin de evitar posibles contaminaciones cruzadas. Los pasos a seguir son, primero tratar la bolsa o recipiente que contiene la muestra por fuera con insecticida, e introducirla en el embalaje de transporte y después añadir la documentación acompañante, y sellar con cinta adhesiva.

Cada muestra debe etiquetarse con un código de identificación y se enviará acompañada del formulario específico de información individualizada, que se adosará al exterior del embalaje, de forma que no contacte directamente con el recipiente primario, que contiene las muestras. De esta manera se puede acceder a toda la información simplemente con abrir el embalaje externo. En él se hará constar la procedencia de la muestra, su número de identificación, tipo de muestra, fecha de la toma de muestra y nombre de la persona que toma las muestras, listado que incluya todas las muestras que contiene el paquete y cualquier información que se considere necesaria para el correcto tratamiento y análisis de la muestra.

Una vez obtenidas la referencia del envío y las muestras, conviene enviar un aviso al laboratorio correspondiente con la fecha/hora de envío de muestras y modo de transporte, así como la fecha/hora de llegada prevista al laboratorio. Las muestras se enviarán acompañadas de la documentación oficial de envío de muestras.

Se recomienda que las partes implicadas en el transporte (remitente, destinatario y empresa de transporte) establezcan anticipadamente una adecuada coordinación para asegurar que el material sea transportado de forma segura, en los embalajes adecuados, y que llegue a su destino oportunamente y en buenas condiciones.

En el laboratorio la muestra debe ser procesada lo antes posible, para la mayor fiabilidad de los resultados y siempre antes de que pase una semana desde que fue recogida y tres días en el caso de realizarse aislamientos (EPPO, 2016c).

2. Diagnóstico de *Xylella fastidiosa* en plantas con síntomas

El diagnóstico de una enfermedad hace referencia a la identificación de la naturaleza y la causa de dicha enfermedad y, por tanto, concierne a aquellas plantas que muestran algún tipo de sintomatología. Las primeras clasificaciones de enfermedades de plantas, allá por la primera mitad del siglo XIX, estaban basadas exclusivamente en los síntomas observados. El primer nombre que hace referencia a una enfermedad causada por *X. fastidiosa* fue «enfermedad misteriosa de la vid», y fue N. B. Pierce quien la describió con gran detalle en 1892 (Janse y Obradovic, 2010). Precisamente, debido a su gran trabajo, esta enfermedad se denominó en 1939 enfermedad de Pierce. Los síntomas causados por *X. fastidiosa* son en realidad inespecíficos, y en el caso de la vid pueden confundirse con los producidos por otros agentes causales de enfermedades como eutipiosis, podredumbre blanca, yesca, y alguna otra producida por hongos u otros patógenos. Y también pueden confundirse los síntomas con estrés hídrico, por salinidad, nutricional, tóxicos ambientales, quemaduras por sol, etc. Debido a que la bacteria invade los vasos del xilema, puede llegar a bloquear el transporte de agua y sales minerales. De modo general, los síntomas incluyen quemadura de hojas, marchitez de hojas, defoliación, clorosis o bronceado en el margen de las hojas y enanismo. Los síntomas dependen de la combinación de planta huésped y cepa de *X. fastidiosa* y, debido a su falta de especificidad, el diagnóstico correcto no puede ser visual, sino que requiere análisis en laboratorio.

Los métodos analíticos actualmente aconsejados por la EPPO, y utilizados en los laboratorios oficiales de diagnóstico de los organismos responsables de Sanidad Vegetal en España, se describen en el apartado 6 de este capítulo. Se deben analizar todas las muestras sospechosas, porque una identificación basada exclusivamente en sintomatología puede llevarnos a interpretaciones equivocadas, lo cual es aplicable a todas las plantas huéspedes de *X. fastidiosa*. De hecho, al Laboratorio Nacional de Referencia han llegado muestras de olivos, almendros, romeros, polígalas y otras especies, con síntomas aparentemente característicos de la presencia de *X. fastidiosa*, pero en los que no se ha podido detectar el patógeno con los métodos más sensibles de que se dispone

hoy en día, sugiriendo que esos daños eran debidos a déficits hídricos o nutricionales y no atribuibles a *X. fastidiosa*.

3. Detección de *Xylella fastidiosa* en plantas asintomáticas

Esta bacteria no causa enfermedad en ciertos casos en las plantas huéspedes, por motivos aún desconocidos. De esta manera, la colonización puede ser asintomática durante mucho tiempo y no necesariamente llegan a desarrollarse los síntomas. Es por ello que los métodos sensibles de detección molecular sean los dirigidos principalmente a estos casos de infección asintomática. La detección e identificación de *X. fastidiosa* en laboratorio es más complicada en plantas asintomáticas que en plantas con síntomas y requiere métodos analíticos de elevada especificidad y sensibilidad, porque la cantidad de bacterias es más baja en plantas sin síntomas y su distribución suele ser bastante irregular en la planta. Puede resultar difícil aislar la bacteria, pero la detección serológica y molecular positiva debe llevar a la toma inmediata de medidas.

Resulta sorprendente, como ya se indicó en el Capítulo 1, la actual globalización del mercado del material vegetal de plantas frutales y ornamentales. Concretamente, al Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas han llegado en los últimos tres años muestras asintomáticas de esquejes, estaquillas u otros tipos de material de reproducción de muy distintas especies y orígenes. El mayor número de muestras importadas era de *Rubus idaeus*, *R. fruticosus*, *R. occidentalis* e híbridos de dicho género, seguidos de fresa, procedentes de EEUU, pero se recibieron también muestras de Argentina, Brasil, Costa Rica, Guatemala, Israel, Kenia, Marruecos y Tanzania de *Aster* sp., *Bidens* sp., *Dianthus* sp., *Fuchsia* sp., *Iberis* sp., *Juglans* sp., *Impatiens* sp., *Lagerstroemia* sp., *Lantana* sp., *Lobelia* sp., *Lavandula* sp., *Nemesia* sp., *Pelargonium* sp., *Rosmarinus* sp., *Salvia* sp., *Schefflera* sp. y *Verbena* sp. De todas ellas, las muestras de *Juglans* sp., procedentes de EEUU, y las de *Pelargonium* sp., de México, resultaron positivas para *X. fastidiosa*.

Por la gravedad del riesgo de introducciones de nuevas cepas de *X. fastidiosa* con plantas importadas, se deberían definir claramente las zonas libres de *X. fastidiosa* en la UE y en países terceros (tras intensivas prospecciones y rigurosos análisis) y no autorizar las importaciones de países terceros en los que no se sabe realmente si está presente la bacteria. Ello es debido a que existe riesgo, aunque figuren en la lista de países libres de *X. fastidiosa*, porque en algunos de ellos no se ha buscado la bacteria, o porque carecen de bacteriólogos

y laboratorios adecuados, como sería el caso de algunos países centroamericanos o africanos que no puedan asegurar su detección con fiabilidad.

Asimismo, los importadores españoles deberían limitar al mínimo imprescindible las importaciones de países en los que está presente la bacteria, aunque las plantas tengan la documentación en regla, porque el análisis de una muestra de 1 g de material vegetal no puede garantizar que un lote de plantas está libre de la bacteria, ya que solo demuestra que el análisis ha resultado negativo en la muestra analizada. Además, en algunos casos como en la vid, se aconseja usar termoterapia en el material importado, cuando sea posible.

Es necesario ser conscientes de que, según lo que hemos aprendido de la experiencia de Italia y de las intercepciones en distintos países europeos, el riesgo mayor es el de la introducción de planta contaminada de países terceros con infecciones latentes. En muchos de esos países los certificados fitosanitarios se emiten de acuerdo a inspecciones visuales y, obviamente, estas pueden no detectar la bacteria, salvo que haya síntomas claros de la misma, siendo muy frecuentes las infecciones latentes de *X. fastidiosa* en plantas ornamentales y cultivadas, que pueden durar varios años o no producir nunca síntomas. En estos casos, si está presente la bacteria en su xilema y de esta planta se alimenta un vector, este podrá transmitir la bacteria a nuevas plantas, algunas desarrollarán los síntomas y todas servirán de nuevas fuentes de inóculo.

4. Detección de *Xylella fastidiosa* en insectos vectores

El mejor modo de coleccionar insectos vectores adultos es mediante manguero, hoja pegajosa o aspiradores, ya que las trampas pegajosas no suelen ser efectivas con los insectos chupadores de xilema (Purcell *et al.*, 2014), aunque si caen también deben analizarse, previo enjuague con etanol/acetona. Los muestreos deben hacerse principalmente desde finales de primavera a principios de otoño. Si los ejemplares capturados no se analizan de modo inmediato se deben conservar en etanol 95-99 % o a -20 o -80 °C (las trampas pegajosas se pueden conservar enteras a -20 °C).

Puesto que *X. fastidiosa* solo coloniza el intestino anterior del insecto, solo debe emplearse la cabeza del mismo para la extracción de ADN, y de esta manera se evita la extracción de posibles inhibidores de la PCR (Purcell *et al.*, 2014). En Italia se ha comprobado que se puede hacer una muestra conjunta con hasta cinco ejemplares de *Philaenus spumarius*. En los ojos puede haber presencia de inhibidores, por lo que se recomienda quitarlos (EPPO, 2016c).

Los insectos se analizan por PCR (o LAMP), ya que el método serológico ELISA no tiene sensibilidad suficiente para la detección de *X. fastidiosa* en esta matriz, puesto que la bacteria, a pesar de multiplicarse en el tracto anterior del aparato digestivo, se encuentra normalmente en niveles poblacionales bajos (Purcell *et al.*, 2014). Para hacer la extracción del ADN, primero se ha de eliminar el solvente utilizado (etanol/acetona) colocando los insectos durante unos minutos en un papel de filtro seco e incluso en una centrifuga de secado al vacío. Se puede utilizar el protocolo de extracción con CTAB, aunque también existen diversos estuches de extracción para ello, pero en Europa no hay experiencia con ellos (EPPO, 2016c). Si se emplea la técnica de LAMP (ver apartado 6.1) no es necesario hacer extracción de ADN.

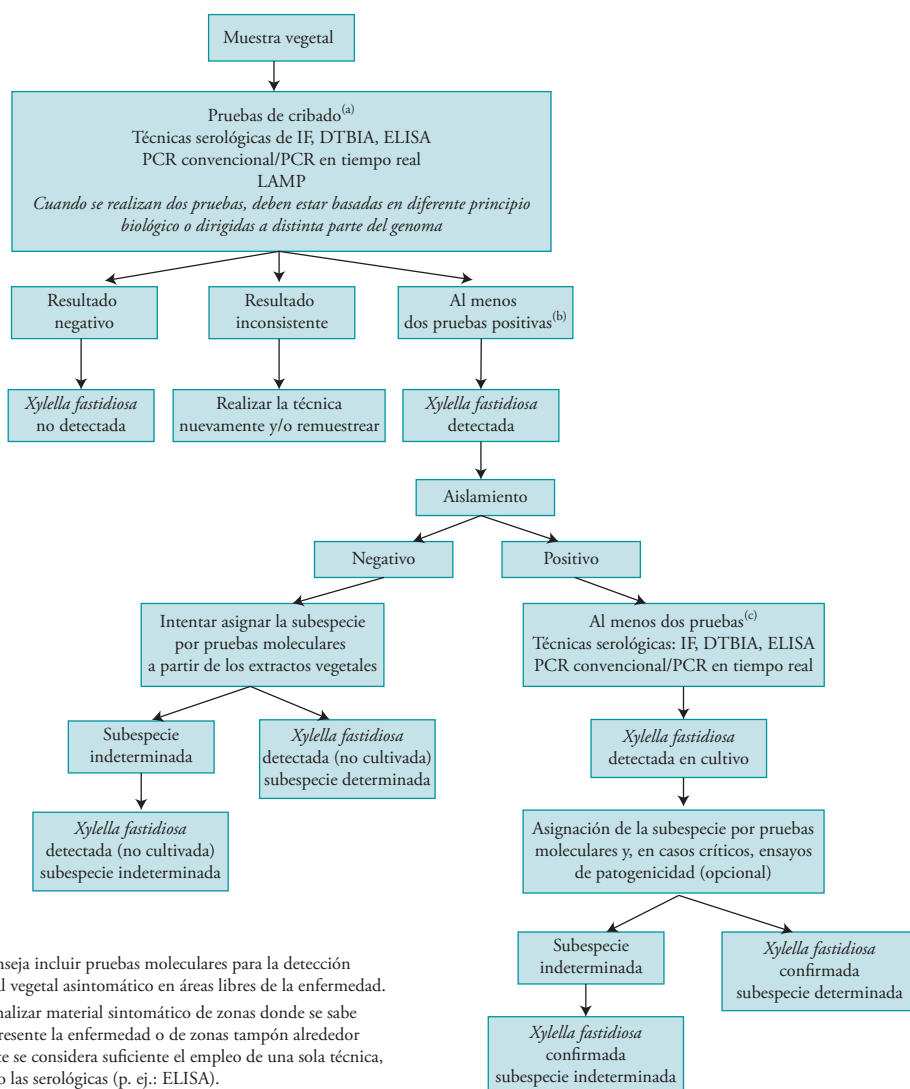
5. Protocolos de análisis de la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)

Dada la importancia de las pérdidas causadas por *X. fastidiosa* y la carencia de protocolos universalmente aceptados que estuvieran disponibles en la década de 1990-2000, la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) publicó un primer protocolo en 2004 (PM7/24), que se basaba en los resultados de EEUU y detallaba los métodos para la detección de dicha bacteria particularmente en vid, incluyendo aislamiento, ELISA y PCR convencional.

Sin embargo, tras la detección de la bacteria en Italia y luego en Francia, dicho protocolo resultó insuficiente y obsoleto, por lo que la EPPO organizó un grupo de trabajo, a principios de 2016, del que formaban parte expertos de siete países, incluida España, a petición de la Comisión Europea. La misión era ampliar y actualizar dicho protocolo, incluyendo nuevas técnicas moleculares como PCR en tiempo real y LAMP, pero además integrar la información obtenida sobre nuevos huéspedes y los resultados de las validaciones de las técnicas evaluando su especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, repetibilidad, precisión, etc., en laboratorios de distintos países. El protocolo se publicó en pocos meses (EPPO, 2016c), es considerado el oficial para todos los laboratorios de los Estados miembros de la UE y permite a los usuarios del mismo conocer la sensibilidad esperada para cada técnica con distintas matrices vegetales o de vectores, e incorporar las de mayor interés en cada laboratorio, en función de su experiencia, equipamiento, huésped y número de plantas a analizar.

El diagrama de dicho protocolo para el análisis de material vegetal se muestra en la Figura 1, y a continuación se resumen brevemente las técnicas aconsejadas en el mismo, con sus ventajas e inconvenientes.

Figura 1. Diagrama de flujo para el procedimiento de diagnóstico de *X. fastidiosa* en material vegetal



(a) Se aconseja incluir pruebas moleculares para la detección de material vegetal asintomático en áreas libres de la enfermedad.

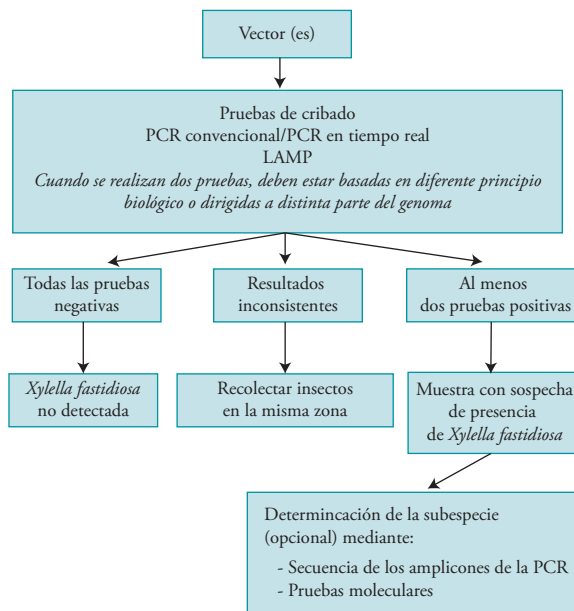
(b) Para analizar material sintomático de zonas donde se sabe que está presente la enfermedad o de zonas tampón alrededor de un brote se considera suficiente el empleo de una sola técnica, incluyendo las serológicas (p. ej.: ELISA).

(c) Las pruebas moleculares para la asignación de subespecie puede emplearse para la confirmación de la identificación de *Xylella fastidiosa*.

Fuente: EPPO (2016c).

Para el análisis de vectores se utilizan las mismas técnicas, como se muestra en la Figura 2. Pero hay que señalar que se dispone todavía de escasa información sobre los protocolos optimizados de análisis para los vectores europeos, ya que en los casos de los brotes de Francia y España, aún no está claro cuál es la especie o especies de vectores implicados.

Figura 2. Diagrama de flujo para el procedimiento de diagnóstico de *X. fastidiosa* en insectos vectores



Fuente: EPPO (2016c).

6. Métodos de análisis

6.1. Métodos moleculares

Se han descrito diversos protocolos de PCR, en tiempo final y en tiempo real, para la detección de *X. fastidiosa*. La PCR en tiempo real constituye la técnica de mayor sensibilidad actualmente disponible, y se puede emplear tanto con muestras vegetales como de insectos. Hay que tener en cuenta que un problema relativamente frecuente con algunas matrices vegetales es la presencia de inhibidores que pueden interferir en la detección, pero habitual-

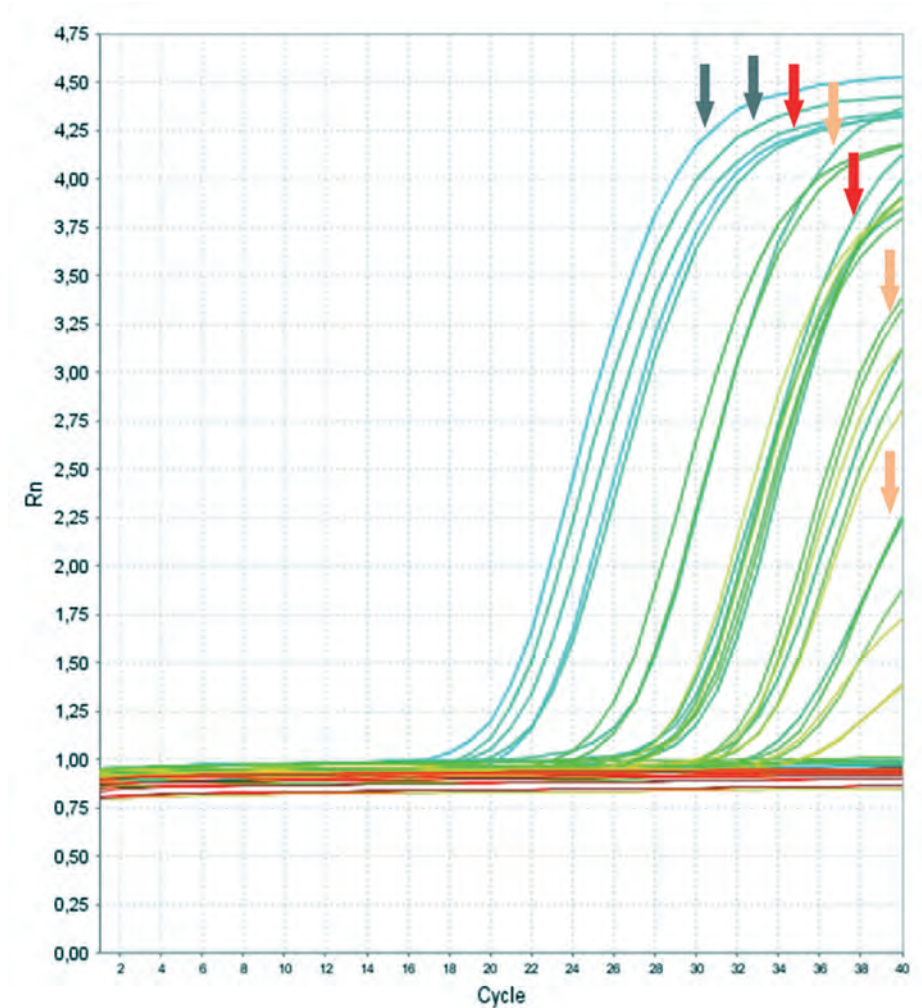
mente este efecto negativo se supera con un protocolo adecuado de extracción del ADN y con diluciones del extracto.

Un paso clave del proceso es la extracción del ADN. Se recomienda utilizar el protocolo del CTAB (Hendson *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003; de Souza *et al.*, 2003) o algunos de los estuches de extracción comercialmente disponibles que han sido validados en laboratorios europeos (EPPO, 2016); los datos de validación se pueden consultar en la base de datos de expertos en diagnóstico de la EPPO. Es esencial hacer pruebas de sensibilidad antes de utilizar rutinariamente algunos de los estuches que hay en el mercado, puesto que la extracción del ADN es una etapa muy importante que influye en el análisis posterior mediante PCR.

Varios protocolos de PCR (convencional y en tiempo real), seleccionados por la EPPO (EPPO, 2016), amplifican los fragmentos diana de todas las subespecies de *X. fastidiosa* y son utilizados para un primer cribado de las muestras. La PCR convencional desarrollada por Minsavage *et al.* (1994) ha sido muy utilizada y por eso se incluye en el protocolo EPPO. Tiene como diana una secuencia localizada en el extremo 3' del gen *rpoD*, que codifica un factor sigma-70 de la RNA polimerasa. El tamaño del amplicón es de 733 pares de bases y la sensibilidad de la técnica es inferior a la de la PCR en tiempo real.

Las dos PCR en tiempo real que se utilizan en los países de la UE, siguiendo el protocolo de la EPPO (EPPO, 2016), son las descritas por Francis *et al.* (2006) y Harper *et al.* (2010; erratum 2013). La PCR de Francis *et al.* (2006) tiene como secuencia diana un gen de una proteína hipotética conservada, HL, y el tamaño del amplicón es de 221 pares de bases. Y en la PCR de Harper *et al.* (2010; erratum 2013) la secuencia diana se encuentra localizada en el gen que codifica la proteína rimM de procesamiento del RNA ribosómico 16S. La sensibilidad de esta segunda PCR es mayor que la de la primera, y por ello, en ocasiones, cuando la cantidad de bacteria en la muestra es baja, es posible detectarla con la PCR de Harper *et al.* (2010) y no con la de Francis *et al.* (2006). En la Figura 3 se ilustra un resultado positivo de PCR en tiempo real, mostrando los Ct (*cycle threshold*), indicativos de la amplificación de la secuencia diana.

Figura 3. Gráfica de amplificación obtenida en el análisis de muestras naturalmente infectadas por *X. fastidiosa* mediante PCR en tiempo real según Harper *et al.* (2010, erratum 2013)



* Las flechas de color gris señalan las curvas exponenciales de dos controles positivos de amplificación de *Xylella fastidiosa* (cultivos puros de la bacteria inactivada por calor). Las flechas de color rojo señalan las curvas exponenciales de muestras de almendro (curvas más a la izquierda) y de olivo (curvas más a la derecha) de Alicante y Baleares, respectivamente, tomadas y analizadas en septiembre de 2017. Y las flechas de color rosa señalan las curvas exponenciales de diluciones decimales de esas mismas muestras. Los controles negativos corresponden a las líneas que no se levantan y no forman curvas exponenciales.

Fuente: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

La técnica de *loop mediated isothermal amplification* (LAMP), desarrollada también por Harper *et al.* (2010; erratum 2013) para *X. fastidiosa*, no se emplea en Europa de modo tan general como las PCR en tiempo real, pero se ha ensayado en Italia con diferentes huéspedes vegetales y con insectos, en este segundo caso incluso sin extracción previa del ADN (Yaseen *et al.*, 2015), por lo que en el protocolo de la EPPO se recomienda para este tipo de muestras. La sensibilidad no es generalmente tan elevada como la de la PCR en tiempo real.

6.2. Métodos serológicos

Desde que se identificó *X. fastidiosa*, hace cuatro décadas, se han ido desarrollando distintas técnicas serológicas para este patógeno y estuches de diagnóstico basados en dichas técnicas. Así, se dispone de al menos dos estuches para ELISA (Sherald y Lei, 1991), que han sido validados para su utilización en olivo, adelfa, almendro, cítricos, roble, vid y otras especies vegetales (Loconsole *et al.*, 2014). Puede emplearse tejido de hojas (incluyendo peciols), tallos o ramillas (a los que se elimina la corteza) y la muestra se prepara en tampón de extracción adecuado, utilizando un mortero o un homogeneizador de tejido o robots apropiados.

También se desarrolló una técnica de inmunofluorescencia con fijación en membrana (MEIF, *membrane entrapment immunofluorescence*) (Hartung *et al.*, 1994), que se basa en la retención de las bacterias en membranas negras de policarbonato de 0,2 µm mediante filtración secuencial del extracto vegetal, y posterior tinción con sueros específicos. Las membranas se observan después en el microscopio de epifluorescencia. En 2004 se puso a punto también una técnica de inmunofluorescencia clásica (Carbajal *et al.*, 2004). La recientemente desarrollada técnica de inmunopresión (DTBIA, *direct tissue blot immunoassay*) (Djelouah *et al.*, 2014) es muy interesante porque permite la impresión directa en membrana, y posterior revelado de secciones directas de tejido (peciols, ramillas) de olivo y otros huéspedes.

La sensibilidad de todas estas técnicas es menor que la de las técnicas moleculares, pero pueden ser muy útiles en zonas donde ya está presente la enfermedad, como Apulia (Italia), porque permiten procesar un gran número de muestras con rapidez y a un coste inferior al de las técnicas moleculares.

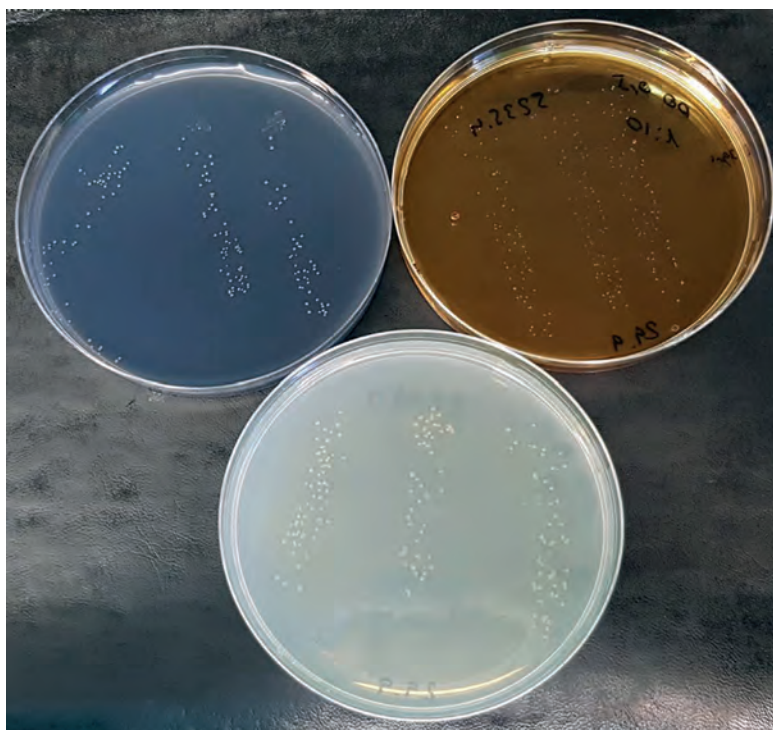
6.3. Aislamiento

El aislamiento de *X. fastidiosa* es difícil, incluso a partir de plantas con síntomas. Esta bacteria no crece en medios rutinarios de laboratorio, sino que requiere medios específicos como PD2 (Davis *et al.* 1980), BCYE (Wells *et al.*, 1981) y PWG (modificado de Hill y Purcell, 1995). Es recomendable emplear al menos dos de los medios citados para aumentar las posibilidades de éxito (EPPO, 2016c). Para el procesamiento de la muestra, esta se debe desinfectar superficialmente, a fin de evitar el crecimiento de organismos saprofitos, ya que *X. fastidiosa* es de crecimiento muy lento y puede quedar enmascarada en la placa de cultivo por organismos de crecimiento más rápido. Las colonias son pequeñas, con un diámetro de 1-1,5 mm después de 1-3 semanas de incubación a 28 °C (Figura 4). Las placas se deben sellar para prevenir la deshidratación del medio de cultivo, dado que los períodos de incubación son largos (hasta varias semanas).

Se han diseñado algunas estrategias con la finalidad de aumentar las probabilidades de lograr el aislamiento de *X. fastidiosa*, como la utilización de ultrasonidos que disgregan las estructuras de biopelícula que forma la bacteria en los vasos del xilema, liberando células individuales que pueden formar colonias en el medio de cultivo. También se ha intentado, con muestras leñosas como olivo o almendro, la impresión directa de secciones de tronco tras ligera presión para facilitar la salida de líquido xilemático.

Dada la dificultad del aislamiento, este método no se recomienda para la detección, basada en métodos independientes del cultivo, pero sí es aconsejable intentarlo, para disponer del cultivo bacteriano y poder estudiar sus características fenotípicas, patogenicidad, etc. y, particularmente, cuando se analizan huéspedes nuevos o cuando se trata de la primera detección de *X. fastidiosa* en una zona.

Figura 4. Colonias de *Xylella fastidiosa* en tres medios de cultivo diferentes:
BCYE (Wells *et al.*, 1981), esquina superior izquierda;
PWG (modificado de Hill y Purcell, 1995), esquina superior derecha;
y PD2 (Davis *et al.*, 1980), parte inferior, tras 15 días de incubación a 28 °C



Fuente: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

6.4. Pruebas de patogenicidad

La verificación de la patogenicidad de los cultivos de *X. fastidiosa* es, en general, compleja y puede requerir varios meses de incubación de las plantas inoculadas. Los ensayos se hacen con plantas huéspedes en maceta. Deben ser plantas no herbáceas, con el tejido xilemático bien diferenciado, y se deben seleccionar las variedades más susceptibles, si se conocen. Las plantas, en crecimiento activo, deben mantenerse en invernadero de seguridad biológica,

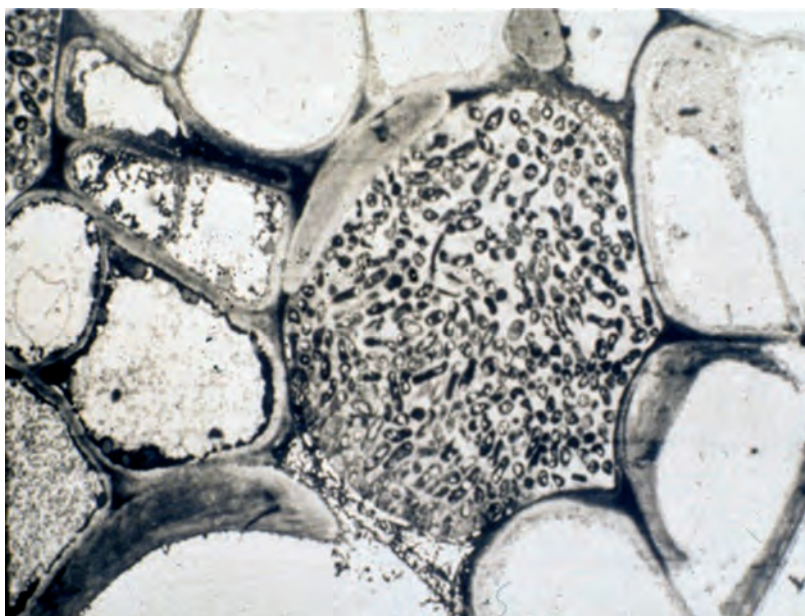
protegidas de insectos o en cámaras de crecimiento a 25-28 °C. Para las inoculaciones, el sustrato de la maceta debe estar seco y las condiciones experimentales deben favorecer la transpiración de la planta. Se deben incluir unas 10-15 plantas por experimento y al menos 3-5 plantas de controles positivos y otras tantas de negativos. En cuanto a las condiciones de crecimiento de la planta, dependen del huésped en cuestión.

Las técnicas de inoculación deben asegurar la infiltración directa en los vasos del xilema. El método más utilizado es la punción con aguja en el tallo, al nivel de inserción del peciolo, o un procedimiento general de pinchazo (Hill y Purcell, 1995; Almeida *et al.*, 2001). Para preparar el inóculo, las células bacterianas procedentes de medio de cultivo sólido se resuspenden en PBS o tampón succinato-citrato, intentando que la concentración de la suspensión sea alta (aproximadamente 10^9 ufc/mL). Se deposita una gota (de 10-50 μ L) de la suspensión en la axila de la hoja, pinchando varias veces con una aguja fina y repitiendo la inoculación en varias partes de la planta. Se espera de 5 a 10 minutos hasta que el inóculo se absorba. Alternativamente, puede pincharse directamente la planta con una aguja cargada con gotas de inóculo (10^8 ufc/mL). En los cítricos se puede emplear un método alternativo, levantando un trozo de corteza con una cuchilla y depositando 10-30 μ L de una suspensión 10^8 ufc/mL. Para plantas con muchos tallos (como *Polygala myrtifolia* o arándano), las inoculaciones deben realizarse en al menos dos tallos por planta. Para incrementar la efectividad, las plantas se pueden volver a inocular a las 3-8 semanas después de la primera inoculación.

6.5. Observación mediante microscopía electrónica

Dado que *X. fastidiosa* coloniza el xilema de las plantas formando agregados en los vasos y además la bacteria presenta una morfología bastante característica, la observación mediante microscopía electrónica de barrido o de transmisión puede ser útil para distinguir de manera no específica, pero sí orientativa, plantas afectadas por *X. fastidiosa*, de otras con sintomatología similar. La Figura 5 muestra el aspecto de un corte de los vasos de una planta infectada y la Figura 6, de una célula de la bacteria.

Figura 5. Micrografía electrónica de un corte transversal de tallo de una planta de vid infectada por *Xylella fastidiosa*



Fuente: fotografía de A. H. Purcell (EEUU, Berkeley, Universidad de California).

Figura 6. Micrografía electrónica de células de *Xylella fastidiosa*, con su característica forma bacilar



Fuente: fotografía de A. H. Purcell (EEUU, Berkeley, Universidad de California).

7. Identificación de *X. fastidiosa* y de sus subespecies

Existen diferentes pruebas moleculares para la asignación a nivel de subespecie de las distintas cepas de *X. fastidiosa* detectadas en un área determinada. Sin lugar a dudas, el análisis MLST basado en la amplificación y secuenciación en ambas direcciones de siete genes de mantenimiento (Yuan *et al.*, 2010) es el más utilizado actualmente y es el recomendado por la UE cuando ocurren nuevas detecciones (bien sean nuevos brotes o nuevos huéspedes). 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 polymerase III (*holC*); subunidad NQO12 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (*nuoL*); y proteína simportadora del glutamato (*glrT*). 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 *glfT*. En ciertos aislados hay veces que faltan 6 pb en la secuencia del gen *cysG*, o 30 pb en el gen *nuoL*.

Una vez obtenidas las secuencias en ambas direcciones, estas tienen que alinearse y ensamblarse eliminando las secuencias de los iniciadores. Posteriormente, las secuencias se cotejan mediante la herramienta de alineación y búsqueda (BLASTN), disponible en la base de datos pubMLST para genes MLST (<http://pubmlst.org/xfastidiosa>) para *X. fastidiosa*. A cada secuencia se le asigna un número y la combinación de estos números es la que indica la subespecie y grupo genético (hasta un total de 80 posibles en la actualidad). Además, esta herramienta permite identificar la existencia de recombinaciones genéticas, al presentar ciertas cepas alelos que son característicos de otras subespecies (Coletta-Filho *et al.*, 2017). Para inferir las relaciones filogenéticas entre cepas o su posicionamiento más preciso ante nuevas detecciones de grupos genéticos nuevos se procede a la concatenación de los siete genes y su análisis filogenético (o MLSA, del inglés *Multilocus Sequence Alignment*), tal y como se ha llevado a cabo para clasificar la nueva cepa de la subespecie *pauca* identificada en Ibiza (Ver Figura 2 en Capítulo 2 y Capítulo 12).

Por otro lado, se ha visto que en base a las secuencias del gen *rpoD* (Minsavage *et al.*, 1994) también se pueden diferenciar todas las subespecies de *X. fastidiosa*, incluyendo *morus* y *tashke*.

En otros casos, la asignación de subespecies puede realizarse por marcadores moleculares que son específicos de subespecie, en los que la amplificación o no de un producto del tamaño esperado, indica la asignación o no a esa subespecie. Por ejemplo, en la PCR de Pooler y Hartung (1995) la amplificación de un fragmento de 500 pb de tamaño indica la presencia de la subespecie *pauca* causante de clorosis variegada de los cítricos o quemadura del café, mientras que este producto no es amplificado por el resto de subespecies. También existe otro protocolo de PCR en tiempo real o cuantitativa que permite asignar un aislado o su secuencia a la subespecie *pauca* (cepas causantes de CVC) (Li *et al.*, 2013).

En la PCR de Hernández-Martínez *et al.* (2006), la utilización de tres parejas de iniciadores permite obtener combinaciones (patrones) de productos de amplificación que diferencian las subespecies *fastidiosa*, *multiplex*, y *sandyi*. Así, se obtienen los siguientes fragmentos: 638 pb con subsp. *sandyi* y *multiplex*; 521 pb con subsp. *multiplex*; 412 pb con subsp. *fastidiosa* y *multi-*

plex. Recientemente se ha observado que algunos aislados de la subsp. *pauca* amplifican los fragmentos de 412 pb y 638 pb.

Hay que indicar que las pruebas descritas se han desarrollado principalmente en cultivos puros, pero se puede utilizar en ADN extraído de las plantas, a excepción de la PCR múltiple de Hernández-Martínez *et al.* (2006) que produce patrones de amplificación poco consistentes cuando se utiliza ADN extraído de tejido vegetal. Sin embargo, hay que señalar que la cantidad y calidad de ADN diana, presencia de inhibidores en las matrices extraídas, o la aparición de posibles infecciones mixtas en las plantas analizadas, puede impedir la obtención de amplicones o la clara asignación de subespecies en ciertas muestras.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, al Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas, y a los proyectos POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y XF-ACTORS (*Xylella Fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy), del programa Horizonte 2020 de la UE, su apoyo y financiación.

Referencias bibliográficas

- ALMEIDA, R. P. P.; PEREIRA, E. F.; PURCELL, A. H. y LOPES, J. R. S. (2001): «Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange»; *Plant Disease* (85); pp. 382-386.
- CARBAJAL, D.; MORANO, K. A. y MORANO, L. D. (2004): «Indirect immunofluorescence microscopy for direct detection of *Xylella fastidiosa* in xylem sap.»; *Current Microbiology* (49); pp. 372-375.
- COLETTA-FILHO, H. D.; FRANCISCO, C. S.; LOPES, J. R.; MULLER, C. y ALMEIDA, R. P. (2017): «Homologous recombination and *Xylella fastidiosa* host-pathogen associations in South America»; *Phytopathology* (107); pp. 305-312.
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H. y THOMSON S. V. (1980): «Isolation medium for the Pierce's disease bacterium»; *Phytopathology* (70); pp. 425-429.

- DE SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G. H.; YANAI, G. M. *et al.* (2003): «Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity»; *Molecular Plant-Microbe Interactions* (16); pp. 867-875.
- DJELOUAH, K.; FRASHERI, D.; VALENTINI, F.; D'ONGHIA, A. M. y DIGIARO, M. (2014): «Direct tissue blot immunoassay for detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees»; *Phytopathologia Mediterranea* (53); pp. 559-564.
- EPPO (2016a): «PM 3/81 (1) Inspection of consignments for *Xylella fastidiosa*»; *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 46(3); pp. 395-406.
- EPPO (2016b): «PM 3/82 (1) Inspection of places of production for *Xylella fastidiosa*»; *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 46(3); pp. 407-418.
- EPPO (2016c): «PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*»; *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 46(3); pp. 463-500.
- FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA ROSA, J.; DODDAPANENI, H. y CIVEROLO, E. L. (2006): «Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*»; *European Journal of Plant Pathology* (115): pp. 203-213.
- HARPER, S. J.; WARD, L. I. y 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); pp. 1282-1288.
- HARTUNG, J. S.; BERETTA, J.; BERLANSKY, R. H.; SPISSO, J. y LEE, R. F. (1994): «Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*»; *Phytopathology* (84); pp. 591-597.
- HENDSON, M.; PURCELL, A. H.; CHEN, D.; SMART, C.; GUILHABERT, M. y KIRKPATRICK, B. (2001): «Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*»; *Applied and Environmental Microbiology* (67); pp. 895-903.
- HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; COSTA, H. S.; DUMENYO, C. K. y COOKSEY, D. A. (2006): «Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay»; *Plant Disease* (90); pp. 1382-1388.

- HILL, B. L. y PURCELL, A. H. (1995): «Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*»; *Phytopathology* (85); pp. 209-212.
- LI, W.; TEIXEIRA, D. C.; HARTUNG, J. S.; HUANG, Q.; DUAN, Y.; ZHOU, L. *et al.* (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); pp. 79-89.
- LOCONSOLE, G.; POTERE, O.; BOSCIA, D.; ALTAMURA, G.; DJELOUAH, K.; EL-BEAINO, T. *et al.* (2014): «Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods»; *Journal of Plant Pathology* (96); pp. 7-14.
- MINSAVAGE, G. V.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS, D. L.; LEITE, R. M. V. B. C. y STALL, R. E. (1994): «Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue»; *Phytopathology* (84); pp. 456-461.
- POOLER, M. R. y HARTUNG, J. S. (1995): «Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis»; *Current Microbiology* (31); pp. 377-381.
- PURCELL, A. H.; PORCELLI, F.; CORNARA, D.; BOSCO, D. y PICCIAU, L. (2014): «Characteristics and identification of xylem-sap feeders»; *Workshop Manual* ftp://ftpfiler.to.cnr.it:21001/Xylella_symposium/Workshop%20manuals/WORKSHOP%20MANUAL%20INSECTS.pdf [last accessed 2016-26].
- RODRIGUES, J. L. M.; SILVA-STENICO, M. E.; GOMES, J. E.; LOPES, J. R. S. y TSAI, S. M. (2003): «Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and gyrB Sequences»; *Applied and Environmental Microbiology* (69); pp. 4249-4255.
- SHERALD, J. L. y LEI, J. D. (1991): «Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees»; *Plant Disease* (75); pp. 200-203.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; NYLAND, G. y LOWE S. K. (1981): «Medium for isolation and growth of bacteria associated with Plum leaf scald and Phony peach diseases»; *Applied Environmental Microbiology* (42); pp. 357-363.

- YASEEN, T.; DRAGO, S.; VALENTINI, F.; ELBEAINO, T.; STAMPONE, G.; DIGIARO, M. *et al.* (2015): «On-site detection of *Xylella fastidiosa* in host plants and in 'spy insects' using the real-time loop-mediated isothermal amplification method»; *Phytopathologia Mediterranea* (54); pp. 488-496.
- YUAN, X.; MORANO, L.; BROMLEY, R.; SPRING-PEARSON, S.; STOUTHAMER, R. y NUNNEY, L. (2010): «Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States»; *Phytopathology* (100); pp. 601-611.

Análisis de riesgos

Antonio Vicent

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

1. Conceptos sobre análisis de riesgos de patógenos vegetales

El glosario de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) define el término introducción como la entrada de un patógeno en una zona que resulta en su establecimiento. A su vez, la entrada se define como el movimiento de un patógeno hacia el interior de un área donde todavía no está presente, o si está presente, no está ampliamente distribuido y se encuentra bajo control oficial. El establecimiento del patógeno implica su perpetuación, para el futuro previsible, dentro del área después de su entrada. Una vez completada la introducción (entrada + establecimiento), el patógeno pasaría a la fase de dispersión, que supone la expansión de su distribución geográfica dentro del área (CIPF, 2017).

Un patógeno se considera cuarentenario cuando es capaz de completar todas estas fases (introducción + dispersión) y causar un daño económico importante en el área para la cual se realiza el análisis de riesgos (CIPF, 2017). Un concepto importante a tener en cuenta es que la CIPF y la legislación fitosanitaria en general, lo que regulan es el patógeno en sí mismo, no la enfermedad que causa, que precisa de la concurrencia de condiciones ambientales favorables y hospedantes susceptibles. En el análisis de riesgos, estos dos factores, condiciones ambientales y hospedantes, se analizan como determinantes del establecimiento, dispersión e impacto del patógeno.

Analizar el riesgo que supone para una región la introducción y dispersión de un organismo fitopatógeno es siempre una tarea complicada. Desde el punto de vista científico, aunque los procedimientos analíticos y las bases de datos han mejorado notablemente, hoy por hoy sigue siendo difícil predecir el comportamiento de los patógenos tras su entrada en una nueva zona. La CIPF publicó en 1995 la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias (NIMF) n.º 2, donde se establecía el marco para el análisis de riesgo de plagas

(patógenos) (CIPE, 1995). Posteriormente se publicó la NIMF n.º 11, que incluye un protocolo detallado para la realización de análisis de riesgos para patógenos cuarentenarios (CIPE, 2001). Por otra parte, la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (EPPO) ha desarrollado también un protocolo que recoge diversas normativas publicadas por esta misma organización desde 1993 y que sigue los criterios establecidos por la CIPF (EPPO, 2000). Actualmente, este protocolo está implementado en el sistema informático CAPRA (*Computer Assisted Pest Risk Analysis*), desarrollado en el marco del proyecto europeo PRATIQUE. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) dispone también de su propio protocolo, basado en los citados anteriormente, y que es el procedimiento estándar de la Comisión Europea en sus análisis de riesgos de organismos nocivos para los vegetales (EFSA PLH Panel, 2010).

En la primera fase de estos protocolos se describen los datos relativos al patógeno, el cultivo y la zona geográfica objeto del estudio. En la segunda fase se realiza un análisis de riesgos, donde se valoran las vías potenciales de entrada, las posibilidades de establecimiento y dispersión, así como el impacto resultante. Este análisis puede realizarse tanto de forma cualitativa, respondiendo a cuestionarios con respuestas si/no, como cuantitativa, empleando por ejemplo escalas ordinales. La EFSA publicó en 2015 un análisis de riesgos muy detallado sobre *Xylella fastidiosa* (EFSA PLH Panel, 2015), que seguiremos como referencia en el presente capítulo.

2. Posibles vías de entrada de la bacteria

2.1. Semillas y frutos

Aunque se ha demostrado la presencia del ADN de *X. fastidiosa* en semillas de naranja (Li *et al.*, 2003), estudios posteriores indican que la bacteria no se transmite mediante las semillas de esta especie de cítricos (Coletta-Filho *et al.*, 2014; Cordeiro *et al.*, 2014; Hartung *et al.*, 2014). No obstante, existe una elevada incertidumbre asociada a esta posible vía de entrada, ya que estos estudios se han realizado únicamente con semillas de naranja y se sabe que la bacteria puede infectar a más de 360 especies de plantas.

De la misma forma, se ha detectado ADN de *X. fastidiosa* en frutos de naranja, pero no hay evidencias de que puedan transmitir la bacteria. Se ha evaluado también el riesgo de transmisión de la bacteria mediante racimos de

uva. Al parecer, los vectores cicadédilos no hacen puestas sobre estos racimos y la concentración de la bacteria en ellos es también muy baja. Experimentos realizados con los vectores *Graphocephala atropunctata* y *Draeculacephala minerva* demostraron que estos insectos no eran capaces de transmitir la enfermedad de Pierce cuando se alimentaban únicamente de racimos de uva. Por otra parte, la conservación frigorífica de los racimos durante su transporte y distribución afectaría negativamente a la supervivencia y viabilidad de la bacteria (Purcell y Saunders, 1995). En general la entrada en nuevas zonas de *X. fastidiosa* con semillas o frutos se considera poco probable, aunque realmente existen muy pocos estudios al respecto.

2.2. Flor cortada y madera

El transporte de flor cortada se realiza a bajas temperaturas, aunque durante períodos relativamente cortos que no afectarían a la viabilidad de *X. fastidiosa*. Se ha demostrado experimentalmente que el insecto vector *Homalodisca vitripennis* puede adquirir la bacteria de tallos de crisantemo inoculados artificialmente (Bextine y Miller, 2005). No obstante, las características de este experimento no son extrapolables a las condiciones reales. Además, la flor cortada no es especialmente atractiva para los vectores, que se alimentan de la savia del xilema.

No hay ningún estudio que demuestre que los vectores puedan adquirir la bacteria de la madera cortada. En general, la entrada de *X. fastidiosa* mediante flor cortada o madera se considera poco probable aunque, como en el caso anterior, hay muy pocos estudios realizados al respecto.

2.3. Material vegetal de plantación o con fines de investigación

La importación de plantas está considerada como la vía de entrada más importante de *X. fastidiosa*. Actualmente hay reconocidas más de 360 especies de plantas hospedantes (DG SANTE, 2017) y en muchas de ellas la bacteria desarrolla infecciones asintomáticas, muy difíciles de detectar en las inspecciones visuales que realizan los puntos de control en frontera. Por otra parte, como se describe con más detalle en el siguiente apartado, las plantas pueden transportar también insectos vectores exóticos, como parece fue el caso de la entrada de *H. vitripennis* en la Polinesia Francesa con importaciones de plantas ornamentales (Grandgirard *et al.*, 2006; Petit *et al.*, 2008).

La información proporcionada por siete Estados miembros de la UE para el período 2000-2007, indica que se importaron más de 150 millones de plantas de la lista de hospedantes de *X. fastidiosa* procedentes de terceros países (EFSA PLH Panel, 2015). Estos datos son ilustrativos de la magnitud e importancia de las plantas hospedantes de la bacteria como vía de entrada de *X. fastidiosa* en una nueva zona. En la Tabla 1 se detallan los datos de estas importaciones de material vegetal procedente de algunos países donde está presente *X. fastidiosa*. Se observa que Costa Rica es el principal proveedor de plantas vivas a la UE, con más de 25.000 toneladas anuales para el período 2008-2013.

Tabla 1. Importaciones anuales en toneladas de material vegetal en la UE procedentes de varios países afectados por *Xylella fastidiosa*

	Argentina	Brasil	Canadá	Costa Rica	México	Turquía	Taiwán	EEUU
Bulbos, tubérculos, raíces, cormos y rizomas	0,1	5.289,9	20,8	161,9	3,2	265,5	882,7	425,6
Esquejes e injertos	0,4	180,9	0,9	1.789,8	20,7	56,3	1.025	26
Árboles y arbustos de frutos comestibles	32,9	0,2	5,7	19,1	59,3	189,6	4,6	134
Plantas vivas	579,7	336,6	8,4	25.811,4	454,2	1.022,7	1.320,8	2.814

Fuente: Datos de EUROSTAT para siete Estados miembros de la UE, los valores son el promedio anual para el período 2008-2013 (EFSA PLH Panel, 2015).

No se dispone de datos desagregados por especies vegetales de estas importaciones, pero teniendo en cuenta el amplio rango de hospedantes de *X. fastidiosa*, seguramente muchas de estas plantas vivas corresponden a especies susceptibles. Las recientes detecciones de plantas infectadas por *X. fastidiosa* en las inspecciones fronterizas de la UE, son indicativas de la alta probabilidad de asociación del patógeno con esta vía de entrada (EFSA PLH Panel, 2015).

En general, el transporte, almacenaje y distribución de las plantas vivas suele realizarse a temperatura ambiente, por lo que no afectaría sustancial-

mente a la supervivencia y viabilidad de *X. fastidiosa*. En el caso de las plantas de vid en parada vegetativa invernada, sin hojas, el transporte y almacenaje se realiza a baja temperatura. No obstante, se ha demostrado que *X. fastidiosa* se mantiene viable en las plantas de vid almacenadas a 4 °C durante el invierno (Feil, 2001). Por otra parte, se ha demostrado que los tratamientos de plantas de vid mediante termoterapia con agua caliente (50 °C, 20 min; 45 °C, 180 min) son capaces de eliminar la bacteria (Goheen *et al.*, 1973), pero actualmente esta práctica tiene un uso todavía muy limitado.

Como ya se ha indicado, las inspecciones visuales de las plantas importadas realizadas en los puntos fronterizos tienen una eficacia limitada. En muchos casos las infecciones de *X. fastidiosa* son asintomáticas. Además, los síntomas causados por *X. fastidiosa* son en general inespecíficos y pueden confundirse fácilmente con estrés hídrico o la propia senescencia natural de la planta. Lógicamente, la inspección visual de plantas en parada vegetativa, sin hojas, es completamente ineficaz.

Una de las características que determinan que el material de plantación sea la principal vía de entrada de *X. fastidiosa*, y de la mayoría de enfermedades en general, es que su destino final suelen ser los campos de cultivo, jardines o el medio natural. En estas condiciones, las plantas infectadas entran fácilmente en contacto con los hospedantes potenciales presentes en la zona. Los insectos vectores nativos del área, o importados junto con el material vegetal, serían los encargados de realizar la transmisión de la bacteria desde la planta importada a la vegetación de la zona, iniciando así el proceso de establecimiento. El amplio rango de plantas hospedantes de *X. fastidiosa* y la diversidad de insectos vectores facilitarían enormemente este proceso.

La importación en la UE de plantas y material vegetal propagativo con fines de investigación, selección o mejora genética se regulan específicamente por la Directiva 2008/61/CE, que establece unas derogaciones específicas a la Directiva 2000/29/CE. Esta vía de entrada es difícil de controlar, ya que implica una amplia gama de especies vegetales hospedantes y gran diversidad de orígenes geográficos. Las plantas con fines de investigación, requieren permisos oficiales específicos para cada importación, pero se importan en muy pequeñas cantidades y es difícil aplicar tamaños de muestra adecuados, lo que afecta negativamente a la fiabilidad de los análisis, si es que se realizan. Algunos hospedantes, como los cítricos y la vid, están regulados específicamente y los materiales importados deben pasar por un estricto proceso de cuarentena en condiciones confinadas y posterior análisis en laboratorio. Sin embargo,

otras especies no están reguladas a ese nivel y los análisis de laboratorio no son obligatorios. Por ejemplo, *X. fastidiosa* se introdujo en Francia con plantas de café importadas con fines de mejora. En este caso, la importancia de esta vía de entrada se considera similar a la de las plantas importadas destinadas a la plantación. No obstante, faltarían los datos de las importaciones de plantas con fines de investigación en el caso de que se realicen de forma irregular, fuera del control oficial.

2.4. Insectos vectores

Una vez adquieren la bacteria, los insectos vectores adultos pueden transmitirla durante todo su período de vida, como se detalla en el Capítulo 4, ya que *X. fastidiosa* se multiplica y persiste en su intestino anterior (Almeida *et al.*, 2005). Las ninfas pueden ser también portadoras de la bacteria, pero la pierden posteriormente durante la muda. Los insectos vectores infecciosos pueden viajar junto con el material vegetal, pero también tienen capacidad para desplazarse como ‘polizones’ en vehículos y otros medios de transporte. En general, la mayor parte de la información disponible sobre los vectores de *X. fastidiosa* es de *H. vitripennis*, que está considerada como la especie con mayor potencial invasivo (Grandgirard *et al.*, 2006). La extrapolación de esta información de *H. vitripennis* a otras especies de insectos vectores potenciales de *X. fastidiosa*, presenta serias limitaciones.

Los insectos vectores de *X. fastidiosa* pueden viajar en las plantas en cualquiera de sus tres estadios; huevo, ninfa o adulto. No obstante, en el caso de *H. vitripennis*, se considera que viaja principalmente en su estadio de huevo. Al no existir transmisión transovárica de *X. fastidiosa*, para desarrollar individuos infecciosos los huevos tendrían que ir adheridos a plantas infectadas, donde las ninfas y los adultos adquirirían posteriormente la bacteria. El riesgo de introducir *X. fastidiosa* con los vectores adheridos a las plantas se reduciría produciéndolas bajo malla y tratándolas con insecticidas antes de su exportación. No obstante, se han detectado individuos vivos de *H. vitripennis* incluso después de aplicaciones de bromuro de metilo (Grandgirard *et al.*, 2006).

Estudios realizados con *H. vitripennis* indican que puede sobrevivir hasta tres semanas sobre una planta de cítricos con temperaturas de 13-24 °C. Temperaturas inferiores a 5 °C o superiores a 30 °C afectan negativamente a su supervivencia (Son *et al.*, 2009). Estos resultados indican que las condiciones de conservación frigorífica, habituales por ejemplo en el transporte y

almacenaje de plantas de vid en parada vegetativa invernal, serían poco favorables para el vector. Sin embargo, las condiciones de temperatura ambiente habituales durante el transporte y almacenaje de plantas vivas con hojas sí que permitirían su supervivencia.

Una vez han entrado en una nueva zona, los adultos infecciosos pueden transmitir la bacteria a las plantas colindantes. Estudios realizados con varias especies de *Homalodisca* indican que su radio de vuelo es de aproximadamente 100 m (Blackmer *et al.*, 2004; Coviella *et al.*, 2006). La polifagia de los insectos vectores y el amplio rango de plantas hospedantes de *X. fastidiosa* aumentan la probabilidad de una transmisión efectiva del patógeno.

Se han detectado también individuos de *H. vitripennis* como ‘polizones’ en el interior de aviones, contenedores y hangares (Grandgirard *et al.*, 2006). En Italia, se han detectado adultos de *Philaenus spumarius* en el interior de los vehículos procedentes de zonas afectadas. En ausencia de una planta como fuente de alimento, *H. vitripennis* puede sobrevivir hasta 16 días a 13 °C (Son *et al.*, 2009). Los estudios realizados con *H. vitripennis* en la Polinesia Francesa sugieren que los insectos ‘polizones’ no serían la principal vía de entrada del vector, ya que curiosamente las zonas cercanas a los aeropuertos son las que presentan sus menores niveles poblacionales (Petit *et al.*, 2008). No obstante, estos resultados podrían estar afectados por otros factores como la densidad y composición de la vegetación o las interacciones con otras especies de artrópodos.

3. Riesgo de establecimiento

La especie *X. fastidiosa* se ha citado en más de 360 especies de plantas pertenecientes a 75 familias botánicas (DG SANTE, 2017). Considerando el contexto agrícola, España es el Estado miembro de la UE con mayor superficie cultivada de olivo (2.515.800 ha), vid (931.065 ha), almendro (527.058 ha) y cítricos (300.838 ha) (FAO, 2017). Estas y otras muchas especies de interés agrícola son hospedantes de *X. fastidiosa*, con susceptibilidad variable en función de la subespecie y el tipo genético concreto de la bacteria. A esto habría añadir un gran número de especies vegetales hospedantes presentes en masas forestales, espacios verdes urbanos, así como vegetación asociada a infraestructuras civiles. En este sentido, es importante recordar que la detección de *X. fastidiosa* en una especie vegetal no implica necesariamente que desarrolle enfermedad sobre ella. Este es un aspecto clave a la hora de evaluar

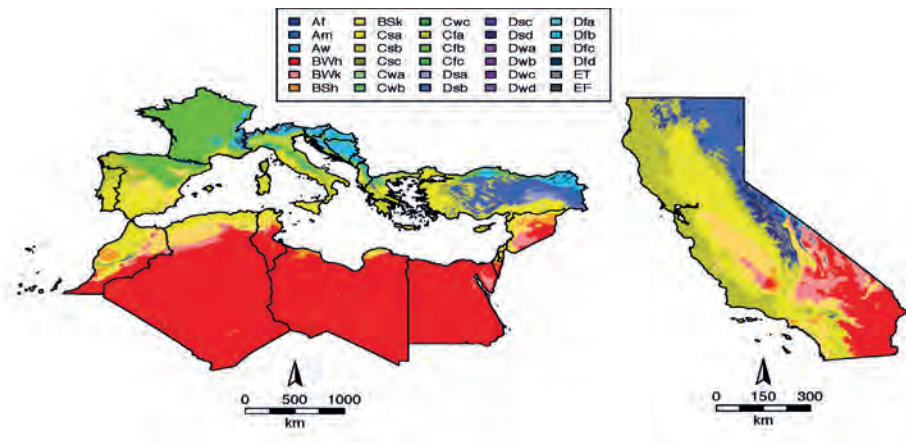
su impacto. La Comisión Europea mantiene una lista completa y actualizada de plantas hospedantes para las diferentes subespecies de *X. fastidiosa* (DG SANTE, 2017).

Por otra parte, en la UE se han descrito varias especies de cercópodos, cicadélidos y cicadas, vectores potenciales de *X. fastidiosa*, incluyendo a *P. spumarius*. (Purcell, 1980; Saponari *et al.*, 2014). No obstante, salvo algunos estudios concretos, en general los datos sobre su abundancia son todavía limitados. Se han descrito algunas especies de parasitoides y depredadores de los vectores potenciales de *X. fastidiosa* en la UE. Aunque se considera que estos enemigos naturales podrían reducir las poblaciones de los vectores, difícilmente podrían eliminarlas por completo (Eilenberg *et al.*, 2001).

La especie *X. fastidiosa* se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, tanto en zonas tropicales y subtropicales, como Brasil y Costa Rica, y otras de clima típicamente mediterráneo como California, sur de Italia, Córcega, la Costa Azul en Francia y ahora también en España en las Islas Baleares y Alicante. Existen citas de *X. fastidiosa* en regiones más frías como Nueva Jersey y Washington DC en EEUU, Ontario, la Columbia Británica, Saskatchewan y Alberta en Canadá (EFSA PLH Panel, 2015). En el Capítulo 3 se describen con más detalle los factores epidemiológicos y climáticos que son determinantes en el establecimiento de *X. fastidiosa*.

La idoneidad climática de la cuenca del Mediterráneo para el establecimiento de *X. fastidiosa* era en cierta forma previsible. Las subespecies *multiplex*, *fastidiosa* y *sandyi* de *X. fastidiosa* están establecidas en California desde hace años. Esta región de EEUU tiene zonas con la misma clasificación climática de Köppen-Geiger (Peel *et al.*, 2007) que algunas áreas del sur de Europa (Figura 1). Además de estas clasificaciones climáticas, se han empleado también otros métodos más elaborados para determinar la distribución geográfica potencial de *X. fastidiosa*, la mayoría en EEUU con la subespecie *fastidiosa* que causa la enfermedad de Pierce de la vid. Feil y Purcell (2001) propusieron el uso de las isotermas de temperaturas mínimas de enero como método para estimar el impacto potencial de la enfermedad de Pierce, siendo grave (4,5 °C), ocasional (1,7 °C) o raro (-1,1 °C). Con algunas modificaciones, esta clasificación ha sido ampliamente utilizada en diferentes países, aunque su extrapolación fuera de EEUU y para otras subespecies de *X. fastidiosa*, no ha sido validada. En el Capítulo 3 se presentan en mayor extensión aspectos relacionados con la idoneidad climática para el desarrollo de epidemias causadas por *X. fastidiosa* en España.

Figura 1. Clasificación climática de Köppen-Geiger según los criterios de Peel *et al.* (2007) para la cuenca del Mediterráneo (izq.) y California, EEUU (der.)



A partir de los datos de Feil y Purcell (2001), Hoddle (2004) empleó el programa CLIMEX para obtener mapas de la distribución geográfica potencial de *X. fastidiosa* y *H. vitripennis*. Aunque muy utilizado en varias disciplinas, este programa presenta serios problemas de replicabilidad. Anas *et al.* (2008) utilizaron como estimadores de la severidad de la enfermedad de Pierce el número de días de invierno por debajo de -12,2 °C o -9,4 °C. Estos mismos parámetros fueron los que emplearon Engle y Magarey (2008) para obtener el mapa de riesgo de *X. fastidiosa* en EEUU con el sistema NAPPFAST. Recientemente, Bosso *et al.* (2016) han desarrollado mapas de riesgo de *X. fastidiosa* para la cuenca del Mediterráneo con el modelo Maxent, incluyendo también escenarios de cambio climático.

Los umbrales de temperaturas mínimas empleados en los mapas de riesgo están relacionados con el proceso de recuperación que sufren las vides infectadas por *X. fastidiosa* después de los inviernos fríos. Aunque se desconoce su base biológica, este proceso está documentado y contrastado en la costa oeste de EEUU. A medida que aumenta la frecuencia de inviernos fríos, la recuperación de las vides es mayor y la severidad de la enfermedad disminuye (Hopkins y Purcell, 2002). La tasa de recuperación de las cepas es mayor cuando las infecciones de *X. fastidiosa* se producen en verano u otoño respecto a las de primavera. En este sentido, es importante señalar de nuevo que este proceso de recuperación con las bajas temperaturas se ha observado únicamente para

la enfermedad de Pierce de la vid (*X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*), principalmente en California, EEUU. En esta misma zona, pero sobre otras especies vegetales susceptibles como el almendro, el proceso de recuperación invernal es menos evidente (Capítulo 7). De ahí la necesidad de ser extremadamente cautelosos al extrapolar estos umbrales de temperatura invernal a otras regiones geográficas y a otras subespecies de *X. fastidiosa*.

La presencia de *X. fastidiosa* en latitudes mucho más frías, como el norte de EEUU y Canadá, serían a priori contradictorias con el carácter termófilo de la bacteria y el efecto de las bajas temperaturas invernales descrito en la vid. No obstante, hay que tener en cuenta que *X. fastidiosa* podría sobrevivir en las raíces de las plantas, donde quedaría protegida de las bajas temperaturas por el efecto tampón del suelo, especialmente en árboles de gran porte que exploran horizontes del terreno más profundos (Henneberger *et al.*, 2004). Como ya se ha indicado, la presencia de la bacteria en una planta no implica necesariamente el desarrollo de síntomas de la enfermedad. Aparentemente, no se han señalado daños graves causados por *X. fastidiosa* en ninguna de estas zonas tan septentrionales de América, de inviernos rigurosos.

Respecto a la pluviometría, *X. fastidiosa* está distribuida tanto en zonas secas, por ejemplo el sur de California y la cuenca del Mediterráneo, como en zonas muy lluviosas, Brasil y Costa Rica entre ellas. El rango diario de temperatura también es muy variable según las zonas. Aquí es importante señalar que la información sobre la influencia del clima sobre *X. fastidiosa* se ha obtenido principalmente a partir de su distribución geográfica. Además del clima, aquí también tienen un papel clave la presencia de hospedantes susceptibles, para una subespecie o genotipo concreto, así como los factores que limitan la dispersión de patógeno. Por ejemplo, el hecho de que en EEUU y Canadá *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* esté presente en zonas más septentrionales que *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* podría deberse a diferencias en su carácter termófilo o también a la propia distribución geográfica de sus hospedantes. Por otra parte, la ausencia del patógeno en una zona no indica necesariamente que el clima no sea favorable, simplemente que no se ha producido todavía una introducción.

En el caso de *X. fastidiosa*, la modelización de su distribución geográfica potencial presenta una dificultad añadida. En distintos casos se ha comprobado que el rango de plantas hospedantes y las características biológicas del patógeno pueden diferir sustancialmente incluso dentro de una misma subespecie, según el genotipo (o ST) que se trate. Por ejemplo, *X. fastidiosa* subsp.

pauc no afecta a cítricos en Italia pero en Brasil causa la enfermedad de la clorosis variegada de los cítricos (CVC) (Saponari *et al.*, 2016). Además, se trata de enfermedades transmitidas por vectores, que presentan diferente eficiencia según la especie de insecto y subespecie de *X. fastidiosa*. Por tanto, los modelos deben considerar a la bacteria y sus insectos vectores de forma integral, incluyendo sus interacciones, lo que supone una complejidad notable.

4. Riesgo de dispersión

Los insectos vectores son el único mecanismo de dispersión natural de *X. fastidiosa*. Tras alimentarse de una planta infectada, adquieren rápidamente la bacteria y se convierten en individuos infecciosos. El período de incubación de la enfermedad, que va desde la infección hasta la aparición de síntomas, es relativamente largo sobre todo en plantas arbóreas de gran porte. Esto implica que una parte importante del proceso de dispersión se da de forma asintomática, con plantas infectadas e infecciosas, pero que todavía no muestran síntomas visibles. Como ya se ha indicado, los insectos vectores pierden la capacidad de transmitir *X. fastidiosa* con la muda, pero cuando un individuo adulto adquiere la bacteria, puede transmitirla durante todo su período de vida.

La dispersión natural de *X. fastidiosa* parece estar limitada por el radio de vuelo de los insectos vectores, que se ha estimado en unos 100 m para *H. vitripennis* (Blackmer *et al.*, 2004) y una distancia similar en el caso de *Scaphoideus titanus* (Lessio y Alma, 2004). En cambio, los estudios de agregación espacial de la CVC en Brasil sugieren que el principal mecanismo de dispersión de la enfermedad en esa región sería la transmisión entre árboles contiguos (Gottwald *et al.*, 1993; Capítulo 3).

Por otra parte, los insectos vectores pueden dispersarse a largas distancias por las corrientes de viento. Por ejemplo, se ha descrito que *Macrostelus fascifrons* puede desplazarse con el viento desde las costas del Golfo de México hasta los estados del norte de EEUU (Hoy *et al.*, 1992). La dispersión por corrientes de viento de los insectos vectores de *X. fastidiosa* de mayor tamaño, como los cicadélidos y cercópidos, sería más limitada.

Como en la mayoría de las enfermedades vegetales, la densidad y conectividad de las plantas hospedantes en una zona determina enormemente la velocidad de dispersión de *X. fastidiosa*. En general, una alta densidad de plantas hospedantes favorece la dispersión, sobre todo en lo que respecta a la transmisión entre plantas contiguas (Plantegenest *et al.*, 2007)

Además de los factores naturales, la acción del hombre es determinante en la dispersión de *X. fastidiosa*. El movimiento de material vegetal infectado es sin duda el mecanismo más eficiente para dispersar el patógeno desde un foco inicial. El transporte de plantas vivas como materiales para plantación o como ornamentales es una práctica generalizada. Se considera que el movimiento de material vegetal desde los focos iniciales ha sido el principal factor de dispersión de la CVC en Brasil (Almeida *et al.*, 2014). El prolongado período de incubación característico de la enfermedad y el hecho de que los injertos procedentes de árboles infectados asintomáticos puedan transmitir *X. fastidiosa*, parecen ser los factores clave en el proceso de dispersión de esta enfermedad en Brasil.

La proximidad a las vías de comunicación es uno de los factores que se están estudiando actualmente como posibles determinantes en la dispersión de *X. fastidiosa* en el sur de Italia. Las vías de comunicación marítima también pueden tener un papel importante en la dispersión de la enfermedad. No solo únicamente por el transporte de plantas y mercancías agrícolas, sino también por el flujo de turistas que pueden trasladar plantas con fines ornamentales o para agricultura de recreo. La acción del hombre también puede favorecer el movimiento de los insectos vectores, junto con las propias plantas o como ‘polizones’ en vehículos de mercancías o pasajeros.

La combinación de la acción humana y natural suele dar lugar a un patrón estratificado de dispersión de la enfermedad. Un primer componente incluiría la dispersión a larga distancia, por ejemplo ligada al transporte de material vegetal infectado, a partir de la cual se establecerían los primeros focos de la enfermedad. A partir de ahí actuarían los mecanismos de dispersión natural, en este caso por acción de los vectores, mediante un proceso de difusión que iría avanzando con velocidad variable según las condiciones climáticas, densidad y susceptibilidad de las plantas hospedantes, y eficiencia de los vectores.

Se han señalado también otros dos posibles mecanismos de dispersión de *X. fastidiosa*, aunque la información científica disponible sobre ellos es inconsistente. Hay un estudio en cítricos que indica la transmisión de *X. fastidiosa* mediante el injerto de raíces, que ocurre de forma natural entre algunas plantas (He *et al.*, 2000). Sin embargo, en un estudio similar en vid no se observaron estos injertos de raíces ni tampoco la transmisión de *X. fastidiosa* (Krell *et al.*, 2007). Este mismo estudio señala también la posibilidad de que *X. fastidiosa* se transmita mediante poda. Sin embargo, esta es una práctica generalizada en todos los cultivos afectados por *X. fastidiosa*, sin que se haya

apreciado que favorezca la dispersión de la enfermedad. De hecho, en Brasil se recomienda la poda como medida de control para la CVC. Aparte del trabajo de Krell *et al.* (2007), no existe ninguna otra referencia que sugiera que *X. fastidiosa* pueda transmitirse mediante poda.

5. Conclusiones del análisis de riesgos

A partir de la información expuesta en los apartados anteriores, el análisis de riesgos de *X. fastidiosa* para el territorio de la UE del Panel PH de EFSA (2015) concluye que, bajo las medidas fitosanitarias en vigor en ese momento (Directiva 2000/29/EC), se considera como muy probable la entrada de *X. fastidiosa* con el material vegetal de plantación debido a que: i) se han importado grandes cantidades de plantas procedentes de zonas afectadas; ii) las plantas importadas pueden estar infectadas, ser infecciosas pero asintomáticas; iii) la bacteria puede sobrevivir a las condiciones del transporte y las prácticas de cultivo habituales en las zonas de destino; iv) las plantas importadas pueden entrar fácilmente en contacto con las plantas hospedantes, que ocupan grandes extensiones del territorio de la UE, en presencia de vectores potenciales.

La entrada de *X. fastidiosa* mediante insectos vectores infecciosos se considera como moderadamente probable, debido a que: i) están presentes en los países de donde se ha importado material vegetal; ii) tienen cierta capacidad para sobrevivir a las condiciones del transporte, aunque las prácticas de cultivo habituales en las zonas de destino pueden afectarles negativamente; iii) existen algunas limitaciones para que entren en contacto con las plantas hospedantes.

El establecimiento se considera como muy probable, ya que las especies vegetales hospedantes están ampliamente distribuidas en el territorio de la UE, así como también sus potenciales insectos vectores, que además presentan una gran polifagia. El clima se considera en general favorable para el establecimiento de *X. fastidiosa* en el territorio de la UE, con la salvedad del posible efecto de las bajas temperaturas invernales en la recuperación de las plantas, que podría ser variable según el cultivo y la subespecie de *X. fastidiosa*. No existe ningún enemigo natural conocido de la bacteria y no existen tampoco medidas completamente efectivas para el control de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*.

La dispersión se considera también muy probable, ya que las plantas hospedantes y los vectores potenciales están ampliamente distribuidos. Por otra parte, no es factible bloquear por completo todos los flujos de personas y

mercancías desde las zonas afectadas hacia el resto del territorio de la UE. El confinamiento de los vectores dentro de las zonas afectadas se considera también una operativa poco factible.

Las conclusiones del análisis de riesgos de EFSA PLH Panel (2015) han servido de base para que la Comisión Europea establezca medidas legislativas de mitigación de riesgos sobre *X. fastidiosa*, especificadas en la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789. Ahí se definen las especies vegetales reguladas, el establecimiento de zonas demarcadas, las medidas de erradicación y contención, así como también determinadas restricciones al movimiento de plantas dentro de la UE (Capítulo 14). Se indican también las condiciones que deben cumplir las importaciones procedentes de determinados países terceros afectados, que en algunos casos considerados de alto riesgo están prohibidas. Estas medidas legislativas específicas para *X. fastidiosa* van actualizándose permanentemente en función de la nueva información científica disponible.

Referencias bibliográficas

- ALMEIDA, R. P. P.; BLUA, M. J.; LOPES, J. R. y PURCELL, A. H. (2005): «Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies»; *Ann. Entomol. Soc. Am.* (98); pp. 775-786.
- ALMEIDA, R. P. P.; COLETTA-FILHO, H. D. y LOPES, J. R. S. (2014): «*Xylella fastidiosa*»; en LIU, D., ed.: *Manual of security: sensitive microbes and toxins*. CRC Press, Boca Raton; pp. 841-850.
- ANAS, O.; HARRISON, U.; BRANNEN, P. M. y SUTTON, T. B. (2008): «The effect of warming winter temperatures on the severity of Pierce's disease in the Appalachian mountains and Piedmont of the southeastern United States»; en: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2008/pierces/>.
- BEXTINE, B. y MILLER, T. A. (2005): «Laboratory-based monitoring of an insect-transmitted plant pathogen system»; *BioTechniques* (38); pp. 184-186.
- BLACKMER, J. L.; HAGLER, J. R.; SIMMONS, G. S. y CAÑAS, L. A. (2004): «Comparative dispersal of *Homalodisca coagulata* and *Homalodisca liturata* (Homoptera: Cicadellidae)»; *Environ. Entomol.* (33); pp. 88-99.

- BOSSO, L.; FEBBRARO, M.; CRISTINZIO, G.; ZOINA, A. y RUSSO, D. (2016): «Shedding light on the effects of climate change on the potential distribution of *Xylella fastidiosa*»; *Biol. Invasions* (18); pp. 1759-1768.
- COLETTA-FILHO, H. D.; CARVALHO, S. A. y CARVALHO SILVA, L. F. (2014): «Seven years of negative detection results confirm that *Xylella fastidiosa*, the causal agent of CVC, is not transmitted from seeds to seedlings»; *Eur. J. Plant Pathol.* (139); pp. 593-596.
- CIPE, CONVENCION INTERNACIONAL DE PROTECCION FITOSANITARIA (1995): *Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias NIMF n.º 2. Directrices para el Análisis del Riesgo de Plagas*. Roma, FAO.
- CIPE, CONVENCION INTERNACIONAL DE PROTECCION FITOSANITARIA (2001): *Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias NIMF n.º 11, Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias*. Roma, FAO.
- CIPE, CONVENCION INTERNACIONAL DE PROTECCION FITOSANITARIA (2017): *Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias NIMF n.º 5. Glosario de términos fitosanitarios*. Roma, FAO.
- CORDEIRO, A. B.; SUGAHARA, V. H.; STEIN, B. y LEITE JUNIOR, R. P. (2014): «Evaluation by PCR of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* transmission through citrus seeds with special emphasis on lemons (*Citrus lemon* (L.) Burm.f)»; *Crop Prot.* (62); pp. 86-92.
- COVIELLA, C. E.; GARCÍA, J. F.; JESKE, D. R.; REDAK, R. A. y LUCK, R. F. (2006): «Feasibility of tracking within-field movements of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae) and estimating its densities using fluorescent dusts in mark-release-recapture experiments»; *J. Econ. Entomol.* (99); pp. 1051-1057.
- DG SANTE, DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, EUROPEAN COMMISSION (2017): «Commission database of host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* in the Union territory»; en: https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures/xylella-fastidiosa/susceptible_en
- EILENBERG, J.; HAJEK, A. y LOMER, C. (2001): «Suggestions for unifying the terminology in biological control»; *BioControl* (46); pp. 387-400.

- ENGLE, J. S. y MAGAREY, R. D. (2008): «Brief weather based pest risk mapping project risk assessment: *Xylella fastidiosa* subsp. *pauc*, citrus variegated chlorosis»; Raleigh, NC, United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine, Center for Plant Health Science and Technology, Plant Epidemiology and Risk Analysis Laboratory (PERAL).
- EFSA PLH PANEL, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2010): «Guidance on a harmonised framework for pest risk assessment and the identification and evaluation of pest risk management options»; *EFSA J.* (8); pp. 1495.
- EFSA PLH PANEL, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2015): «Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options»; *EFSA J.* (13); pp. 3989.
- EPPO, EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (2000): *EPPO Standards PM5/1-4. Pest Risk Analysis*. París, OEPP/EPPO.
- FEIL, H. y PURCELL, A. H. (2001): «Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines»; *Plant Dis. J.* (85); pp. 1230-1234.
- FEIL, H. (2001): «Effects of temperature on the epidemiology of Pierce's disease»; *PhD Dissertation*. EEUU, Berkeley CA, University of California.
- FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2017): «Crop production database FAOSTAT»; en: <http://faostat.fao.org/default.aspx>.
- GOHEEN, A. C.; NYLAND, G. y LOWE, S. K. (1973): «Associaton of a rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines»; *Phytopathology* (63); pp. 341-345.
- GOTTWALD, T. R.; GIDTTI, F. B.; SANTOS, J. M. y CARVALHO, A. C. (1993): «Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis (CVC) in Sao Paulo, Brazil»; en MORENO, P.; DA GRACA, J. V. y Timmer, L. W., eds.: *Proceedings of the 12th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* EEUU, CA. Eds. Riverside; pp. 327-335.

- GRANDGIRARD, J.; HODDLE, M. S.; RODERICK, G. K.; PETIT, J. N.; PERCY, D.; PUTOA, R.; GARNIER, C. y DAVIES, N. (2006): «Invasion of French Polynesia by the glassy-winged sharpshooter, *Homolodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae): A new threat to the South Pacific»; *Pac. Sci.* (60); pp. 429-438.
- HARTUNG, J. S.; NIAN, S.; LOPES, S.; AYRES, A. J. y BRLANSKY, R. (2014): «Lack of evidence for transmission of *Xylella fastidiosa* from infected sweet orange seed»; *J. Plant Pathol.* (96); pp. 497-506.
- HE, C. X.; LI, W. B.; AYRES, A. J.; HARTUNG, J. S.; MIRANDA, V. S. y TEIXEIRA, D. C. (2000): «Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural rot grafts»; *Plant Dis.* (84); pp. 622-662.
- HENNEBERGER, T. S. M.; STEVENSON, K. L.; BRITTON, K. O. y CHANG C. J. (2004): «Distribution of *Xylella fastidiosa* in sycamore associated with low temperature and host resistance»; *Plant Dis.* (88); pp. 951-958.
- HODDLE, S. (2004): «The potential adventive geographic range of glassy-winged sharpshooter, *Homolodisca coagulata* and the grape pathogen *Xylella fastidiosa*: implications for California and other grape growing regions of the world»; *Crop Prot.* (23); pp. 691-699.
- HOPKINS, D. y PURCELL, A. (2002): *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Dis.* 86:1056-1066.
- HOY, C. W.; HEADY, S. E. y KOCH, T. A. (1992): «Species composition, phenology, and possible origins of leafhoppers (Cicadellidae) in Ohio vegetable crops»; *J. Econ. Entomol.* (85); pp. 2336-2343.
- KRELL, R. K.; BOYD, E. A.; NAY, J. E.; PARK, Y. L. y PERRING, T. M. (2007): «Mechanical and insect transmission of *Xylella fastidiosa* to *Vitis vinifera*»; *Am. J. Enol. Viticult.* (58); pp. 211-216.
- LESSIO, F. y ALMA, A. (2004): «Seasonal and daily movement of *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera: Cicadellidae)»; *Environ. Entomol.* (33); pp. 1689-1694.
- LI, W. B.; PRIA JR, W. D.; LACAVA, P. M.; QIN, X. y HARTUNG, J. S. (2003): «Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings»; *Phytopathology* (93); pp. 953-958.

- PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L. y MCMAHON, T. A. (2007): «Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification»; *Hydrol. Earth Syst. Sc.* (11); pp. 1633-1644.
- PETIT, J. N.; HODDLE, M. S.; GRANDGIRARD, J.; RODERICK, G. K. y DAVIES, N. (2008): «Invasion dynamics of the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Hemiptera: Cicadellidae) in French Polynesia»; *Biol. Invasions* (10); pp. 955-967.
- PLANTEGENEST, M.; LE MAY, C. y FABRE, F. (2007): «Landscape epidemiology of plant diseases»; *J. R. Soc. Interface* (4); pp. 963-972.
- PURCELL, A. H. y SAUNDERS, S. R. (1995): «Harvested grape clusters as inoculum for Pierce's disease»; *Plant Dis.* (79); pp. 190-192.
- PURCELL, A. H. (1980): «Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vectors»; *J. Econ. Entomol.* (73); pp. 834-838.
- SAPONARI, M.; BOSCIA, D.; ALTAMURA, G.; D'ATTOMA, G.; CAVALIERI, V.; ZICCA, S.; MORELLI, M.; TAVANO, D.; LOCONSOLE, G.; SUSCA, L. *et al.* (2016): «Pilot project on *Xylella fastidiosa* to reduce risk assessment uncertainties»; *EFSA Supporting Publications* 13(3).
- SAPONARI, M.; LOCONSOLE, G.; CORNARA, D.; YOKOMI, R. K.; STRADIS, A. D.; BOSCIA, D.; BOSCO, D.; MARTELLI, G. P.; KRUGNER, R. C. y PORCELLI, F. (2014): «Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy»; *J. Econ. Entomol.* (107); pp. 1316-1319.
- SON, Y.; GROVES, R. L.; DAANE, K. M.; MORGAN, D. J. W. y JOHNSON, M. W. (2009): «Influence of temperature on *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) survival under various feeding conditions»; *Environ. Entomol.* (38); pp. 1485-1495.

Métodos de control

Juan A. Navas Cortés, Miguel Montes Borrego y Blanca B. Landa

Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC (España, Córdoba)

1. Introducción

Las principales estrategias para el control de enfermedades de plantas conciernen a: (i) la eliminación del patógeno (exclusión y erradicación); (ii) el escape a la infección; (iii) el desarrollo de resistencia genética del huésped al patógeno; y (iv) la protección de la planta contra la infección (terapia). Una vez que *X. fastidiosa* se ha establecido en un área su control es muy difícil o imposible. Por tanto, todos los esfuerzos deben ir dirigidos a la prevención de su introducción en nuevas áreas. A continuación, se presentan los principios de control aplicables para el manejo de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* de acuerdo a las estrategias mencionadas de forma resumida ya que en los Capítulos 8 a 11 se tratan ejemplos de enfermedades concretas y sus medidas de control, y en el Capítulo 14 se cubren con detalle los planes españoles de contingencia y de acción frente a la enfermedad, fundamentalmente centrados en exclusión y erradicación.

2. Exclusión

En todos los países en los que *X. fastidiosa* está presente se ha demostrado que el control de la bacteria es extremadamente difícil una vez que se ha establecido en un área geográfica. Por ello, el principio fundamental para su control deberá ser la medida de exclusión: evitar su entrada en un territorio donde no está presente. Para ello se deben extremar las precauciones en el comercio de material vegetal, especialmente aquel que proceda de países donde conste la presencia de *X. fastidiosa*. Además, la adquisición de plantas que sean huésped de esta bacteria debe realizarse únicamente en viveros autorizados, exigiendo el pasaporte fitosanitario para aquellas especies vegetales contempladas en la legislación (Directiva 2000/29/CE). Por otro lado la Decisión de Ejecución de la Comisión (Decisión 2015/789/UE) de 18 de mayo de 2015 establece

la obligación de los Estados miembros de: (i) realizar inspecciones anuales para detectar la presencia de *X. fastidiosa* en su territorio, concretamente en las especies vegetales especificadas en el Anexo I de esa decisión; (ii) informar sobre la detección o sospecha de la presencia del organismo al Centro de Sanidad y Certificación Vegetal competente; (iii) regular y controlar la circulación de las especies vegetales especificadas (Anexo I); (iv) desarrollar campañas de sensibilización en los Estados miembros que faciliten información al público en general, a los viajeros, a los profesionales y a los operadores de transporte internacional sobre la amenaza que supone el organismo especificado en el territorio de la Unión; y (v) establecer planes de contingencia con objeto de garantizar el control y erradicación en caso de posibles introducciones.

En caso de detectarse la presencia de *X. fastidiosa* en un territorio, al tratarse de un organismo nocivo de cuarentena según la Directiva 2000/29 e incluido en la lista A1 EPPO desde 1981, la legislación obliga a comunicar al organismo responsable de sanidad vegetal la presencia de síntomas sospechosos de la enfermedad. Una vez confirmada la presencia de la *X. fastidiosa* en una comunidad autónoma, por el laboratorio de diagnóstico, ha de ser confirmada por el Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA). Posteriormente, la detección de la bacteria se debe comunicar inmediatamente a la Subdirección General de Sanidad e Higiene Vegetal y forestal del mapama. Los Organismos Oficiales de la Comunidad Autónoma en la que se detecte el brote deberán delimitar una ‘zona demarcada’, con el fin de definir la ‘zona infectada’ y establecer una ‘zona tampón’, para adoptar las medidas de erradicación previstas en el artículo 6 de la Decisión 2015/789/UE, que se detallan en el Capítulo 14. Sin embargo, la legislación establece la posibilidad de no establecer una zona demarcada en casos de presencia aislada de *X. fastidiosa*, pero solo cuando la presencia de la bacteria se pueda eliminar con la destrucción de las especies vegetales en las que se haya detectado. En estos casos, será preciso actuar de inmediato para determinar si se han infectado otras especies vegetales.

La zona demarcada (Decisión 2015/798/UE) estará formada por una zona infectada y una zona tampón. La zona infectada debe incluir un área con un radio de 100 m alrededor de los vegetales cuya infección por el organismo especificado esté confirmada, todos los vegetales que muestren síntomas indicativos de una posible infección por dicho organismo y todos los demás vegetales susceptibles de estar infectados por ese organismo, debido a su proxi-

midad con los vegetales infectados o con una fuente de producción común, si se conoce, con vegetales infectados, o vegetales desarrollados a partir de estos (mismos lotes que las plantas infectadas, o vegetales obtenidos a partir de plantas infectadas). La zona tampón deberá tener una anchura mínima de 10 km alrededor de la zona infectada. La delimitación exacta de las zonas se basará en principios científicos sólidos, la biología del organismo especificado y de sus vectores, el nivel de infección, la presencia de vectores potenciales y de la posible distribución de los vegetales especificados en la zona de que se trate. Si se confirma la presencia del organismo especificado fuera de la zona infectada, se revisará y modificará, en consecuencia, la delimitación de la zona infectada y de la zona tampón.

3. Erradicación

Una vez confirmada la presencia de *X. fastidiosa* en un territorio por vez primera se debe proceder a la destrucción inmediata del material vegetal infectado. Las medidas de erradicación consisten en la destrucción o inactivación del patógeno en la fuente de inóculo (plantas y vectores) e incluyen la eliminación de las plantas infectadas y las plantas huésped que pudieran haber estado expuestas a la infección por *X. fastidiosa*. Para la erradicación habrá que haber establecido previamente las zonas demarcadas (zona infectada y zona tampón). En la zona infectada se aplicarán medidas de erradicación de forma inmediata en un radio de 100 m alrededor de las plantas infectadas, eliminando: (i) las plantas infectadas y sintomáticas; (ii) las plantas huésped (es decir aquellas especies vegetales susceptibles identificadas en la UE), independientemente de su estado fitosanitario; y se llevará a cabo el muestreo y análisis de plantas especificadas en el Anexo I de la Decisión 2015/789/UE que incluye las plantas cuya susceptibilidad a *X. fastidiosa* se ha confirmado tanto a cepas europeas como no europeas de la bacteria. Para erradicar las plantas (Figura 1) se pueden utilizar distintos procedimientos como el arranque, troceado y quema de las mismas (cuando las condiciones ambientales lo permitan) o el triturado directo utilizando máquinas especiales para ello (Figura 2). En la zona tampón, en un radio de 10 km alrededor de la zona afectada: (i) se intensificará la monitorización de plantas especificadas; y (ii) se realizará el muestreo y análisis de plantas con síntomas y asintomáticas en su proximidad. Finalmente, en ambas zonas: (i) se aplicarán medidas de contención y restricción de movimiento de vegetales fuera de la zona; (ii) antes de la eliminación

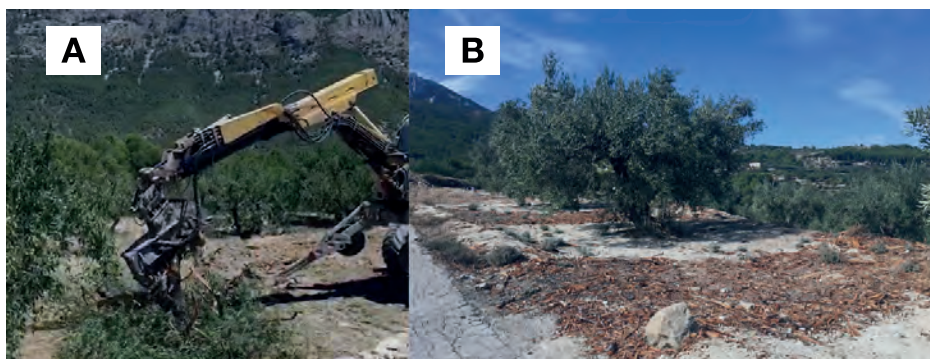
de las plantas infectadas se aplicarán los tratamientos fitosanitarios adecuados contra los vectores de *X. fastidiosa* y las plantas que puedan hospedarlos, y (iii) se prohibirá realizar replantaciones con especies huésped de la bacteria.

Figura 1. Vista general de una de la primera parcela erradicadas tras la detección de *Xylella fastidiosa* en almendro situada en la comarca alicantina de la Marina Baixa



Fuente: fotografía de Juan A. Navas Cortés.

Figura 2. Máquina utilizada en Alicante para la erradicación de los árboles de almendro infectados por *Xylella fastidiosa* (A) y aspecto de los residuos provenientes del triturado de los árboles tras varias semanas en el suelo junto árboles de olivo presentes en la misma finca (B)



Fuente: fotografía de Blanca B. Landa.

Cuando en una zona demarcada no se haya detectado la plaga durante un período de cinco años, basado en las inspecciones realizadas, la comunidad

autónoma en la que se localiza la zona demarcada, comunicará este hecho a la Dirección General de la Sanidad de la Producción Agraria, que a su vez lo comunicará a la Comisión, para que se levante la demarcación (MAPAMA, 2017). En los Capítulos 12 y 13 se describen con detalle los procedimientos de erradicación que se están llevando a cabo en las Islas Baleares y la provincia de Alicante, respectivamente y en el Capítulo 14 la legislación en la que se basan.

No obstante, es necesario tener en cuenta que las acciones mencionadas de erradicación solo son efectivas en el control de la bacteria si son aplicadas en los primeros momentos tras su detección y cuando sean pocas las plantas afectadas, y el número de focos escaso, actuando con rapidez o si se detecta a nivel de frontera. Por el contrario, dichas acciones dejan de ser efectivas una vez que la enfermedad se ha establecido en una zona. Así, en California, EEUU donde la bacteria es endémica y llevan más de 100 años conviviendo con el problema todas las medidas de control que se llevan a cabo están basadas en el escape, terapia y resistencia.

4. Escape

El escape persigue evitar el contacto con el inóculo e infección y se implementaría mediante: (i) producción de material propagativo certificado y analizado frente a este patógeno; (ii) producción a partir de plantas madre libres de *X. fastidiosa* y en zonas libres de la bacteria y (iii) producción de plantas bajo condiciones que aseguren la ausencia de infección por *X. fastidiosa*.

En este sentido, los lugares de producción de material de plantación de vegetales de especificados de acuerdo a la Directiva 5015/789/UE deberán cumplir los siguientes requisitos: (i) estar registrados de conformidad con la Directiva 92/90/CEE; (ii) estar reconocidos por el organismo oficial competente como sitios libres del organismo especificado y de sus vectores, teniendo en cuenta las pertinentes normas internacionales para medidas fitosanitarias; (iii) estar protegidos físicamente contra la introducción del organismo especificado por sus vectores; (iv) estar rodeados por una zona con una anchura de 200 m de la que se ha comprobado, mediante examen visual oficial y, en caso de sospecha de la presencia del organismo especificado, mediante la realización de un muestreo y de pruebas, que están libres del organismo especificado, y están sometidos a los tratamientos fitosanitarios adecuados contra los vectores del organismo especificado; entre estos tratamientos podrá figurar, según proceda, la eliminación de los vegetales; (v) estar sometidos a los

tratamientos fitosanitarios adecuados para mantener la ausencia de vectores del organismo especificado; entre estos tratamientos podrá figurar, según proceda, la eliminación de los vegetales; (vi) se someten anualmente, junto con la zona contemplada en el apartado iv a un mínimo de dos inspecciones oficiales realizadas en las épocas adecuadas; (vii) durante la época de crecimiento de los vegetales especificados, no se han detectado en el sitio signos del organismo especificado ni sus vectores o, si se hubieran observado signos sospechosos, las pruebas realizadas han confirmado la ausencia del organismo especificado; (viii) durante la época de crecimiento de los vegetales especificados, no se han detectado en la zona contemplada en el apartado iv signos del organismo especificado o, si se hubieran observado signos sospechosos, se han realizado pruebas y se ha confirmado la ausencia del organismo especificado.

Por otro lado, de acuerdo a la Decisión 2015/789/UE, estará prohibida la circulación en la UE de los vegetales especificados que se hayan cultivado durante al menos parte de su vida en una zona demarcada, salvo que se cumplan determinados requisitos que garantizan la ausencia de la bacteria y el vector (sitio de producción autorizado, controles intensivos y requisitos durante el traslado), o los vegetales que se han cultivado *in vitro* durante todo el ciclo de producción y cumplen determinadas condiciones. Existe una excepción a esta prohibición para las plantas de *Vitis* sp. en reposo destinadas para plantación, ya que se ha aprobado un tratamiento con agua caliente que se utiliza contra la flavescencia dorada de la vid, que es también eficaz para *X. fastidiosa* (EFSA, 2015). En consecuencia, las plantas que se han sometido a ese tratamiento, no tienen riesgo de dispersar la bacteria, y pueden circular dentro y fuera de las zonas demarcadas. Por último, la Decisión 2015/789/UE prohíbe la introducción de *Coffea* originarios de Costa Rica o de Honduras para la plantación, excepto las semillas.

La utilización de procedimientos rigurosos de producción de material de plantación de vid y cítricos en condiciones fitosanitarias que aseguren la producción de plantas libres de *X. fastidiosa* ha contribuido tanto en California, EEUU (Capítulo 8), como en Brasil (Capítulo 9) a la reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad de Pierce en vid y la clorosis variegada en cítricos, respectivamente.

5. Resistencia del material vegetal

La utilización de cultivares resistentes sería la medida más efectiva para el control eficiente de *X. fastidiosa*. En la actualidad no se dispone de información sobre la reacción de cultivares de olivo a *X. fastidiosa*. La única información disponible proviene de observaciones e investigaciones llevadas a cabo en la zona afectada en el sur de Italia, que han permitido identificar cierto nivel de tolerancia a la enfermedad del OQDS causada por la estirpe CoDIRO de *X. fastidiosa* (subsp. pauca ST53) en el cv. Leccino comparada con la reacción susceptible de los cultivares utilizados comúnmente en la zona como Ogliarola Salentina y Cellina di Nardò (Figura 3) (Capítulo 10). A diferencia de estos últimos, el cv. Leccino presenta un menor desarrollo de síntomas, así como niveles poblacionales de la bacteria muy inferiores (Gianpetruzzi *et al.*, 2016; EFSA, 2017). Asimismo, resultados preliminares indican la existencia de niveles de tolerancia o resistencia en otros cultivares de olivo como el patrón de olivo FS-17® que en condiciones de infección natural presentó un nivel de población de *X. fastidiosa* del 50 % inferior al observado en el cultivar Leccino en las mismas condiciones (EFSA, 2017). Por el momento no se dispone de información sobre la reacción de cultivares de olivo más importantes en España.

Figura 3. Reacción a infecciones naturales de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST53 causante de la OQDS en el sur de Italia en el cultivar Leccino (tolerante) a la izquierda, comparado al cultivar Ogliarola Salentina (susceptible) a la derecha



Fuente: fotografía de Juan A. Navas Cortés.

La dificultad de obtención de cultivares con niveles de tolerancia/resistencia frente a *X. fastidiosa* queda bien patente para el caso de la vid y la enfermedad de Pierce (Landa *et al.*, 2017). En este caso, el uso de cultivares resistentes no es del todo factible, ya que la mayor parte de los cultivares de vid europeos (*Vitis vinifera*), americanos (*V. labrusca*) o híbridos son susceptibles. Sin embargo, recientemente se ha encontrado resistencia a la enfermedad de Pierce en genotipos de *V. rotundifolia*, *Muscadinia rotundifolia*, y *V. girdiana*, entre otras especies, que son nativos del sureste de los EEUU. Por otro lado, existen algunas variedades de *V. vinifera* en California que presentan un cierto nivel de tolerancia a la enfermedad, como ‘Petit Sirah,’ ‘Chenin blanc,’ y ‘Sylvaner’ (Hopkins y Purcell, 2002). Además, se han desarrollado cultivares de vid transgénicos con resistencia a la enfermedad; si bien estos últimos no cuentan con la aceptación del consumidor ni son aceptados por la legislación europea (Landa *et al.*, 2017). En el Capítulo 8 se aborda con mayor extensión la utilización de variedades de vid con resistencia a la enfermedad de Pierce.

Una situación similar se presenta en especies de *Citrus* frente a la clorosis variegada en Brasil, donde las variedades de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) son susceptibles a la enfermedad, a excepción de la variedad Navelina ISA 135 que se ha mostrado resistente (Fadel *et al.*, 2014). No obstante, se han identificado distintos grados de resistencia en mandarinas (*Citrus reticulata*), tangor (*C. sinensis* x *C. reticulata*) (Laranjeira *et al.*, 1998; Della Coletta-Filho *et al.*, 2007) así como en limonero, lima ácida y pomelo (Della Coletta-Filho *et al.*, 2015). Fruto de un amplio programa en el Citrus Research Center «Sylvio Moreira» en Brasil, se identificaron de un total de 305 híbridos de naranjo dulce y tangor, 60 híbridos resistentes (20 %) y 196 tolerantes (64 %) a la enfermedad (Della Coletta-Filho, 2015).

En almendro, se ha observado que la utilización de determinados portainjertos puede contribuir al manejo de la enfermedad. Así, la utilización de «Nemaguard» de melocotonero como portainjerto en almendro conduce a la cura de *X. fastidiosa* a partir del segundo año de crecimiento, ya que impide su colonización por *X. fastidiosa* por debajo de la zona del injerto y por tanto afecta negativamente a la supervivencia de la bacteria en invierno en la parte aérea. No obstante, este efecto no se observó para otros portainjertos (Krugner *et al.*, 2016).

6. Terapia

El uso de terapia cultural o química iría dirigida a la reducción o eliminación de inóculo bacteriano o de las poblaciones de vectores. Entre las medidas culturales se incluirían: (i) poda de ramas afectadas para reducir la fuente de inóculo. Esta medida se ha mostrado efectiva en cítricos afectados por clorosis variegada pero solo cuando es aplicada en árboles con menos de 4 años de edad y en los primeros estadios de desarrollo de la enfermedad, no habiéndose demostrado efectiva en olivos afectados por OQDS en el sur de Italia, ya que los brotes nuevos vuelven a mostrar síntomas de enfermedad en un periodo de tiempo escaso; (ii) tratamiento de termoterapia con agua caliente a 50 °C durante 45 minutos que se ha mostrado efectivo para eliminar *X. fastidiosa* de material de plantación de *Vitis* (EFSA, 2015) y esto va a permitir el movimiento de material de vid sometido a este tratamiento desde áreas demarcadas; y (iii) la eliminación de la bacteria por temperaturas inferiores a 0 °C en vid (Purcell, 1977) y cerezo (Ledbetter *et al.*, 2009); (iv) tratamiento terapéutico y profiláctico con un cóctel de fagos virulentos con actividad lítica frente a la enfermedad de Pierce (Das *et al.*, 2015); o (v) la protección cruzada con cepas no virulentas de *X. fastidiosa* evaluada en Florida frente a enfermedad de Pierce con la cepa EB92-1 (Hopkins, 2005). Si bien esta última opción de control ha sido cuestionada debido a la facilidad con la que *X. fastidiosa* puede generar recombinantes genéticos entre cepas de la misma o distintas subespecies.

7. Aspectos legislativos españoles y de la UE que deben ser considerados por el agricultor

Como se ha indicado en apartados anteriores, la Comisión Europea, con el fin de contener la expansión de *X. fastidiosa* y evitar su posible introducción desde países terceros donde la bacteria se encuentra presente, publicó el 21 de mayo de 2015 la Decisión 2015/789/UE sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la UE de *X. fastidiosa*, que viene a sustituir la anterior de julio de 2014.

La principal vía de entrada de *X. fastidiosa* son los vegetales huésped destinados a la plantación, que proceden de países en los que la bacteria está presente y, con un menor riesgo, la introducción de vectores infectivos procedentes de esas zonas. Por ello, la importación de plantas de cítricos y vid,

principales plantas huésped de *X. fastidiosa* está prohibida ya desde el año 2000 (Anexo III, Directiva 2000/29/CE). Asimismo, también está prohibida la importación de plantas de *Prunus* spp. originarias de países no europeos, con la excepción de material en reposo (sin hojas, flores ni frutos) procedente de países mediterráneos, Australia, Canadá, Nueva Zelanda, y los estados continentales de EEUU. Para la importación del resto de especies vegetales huésped de *X. fastidiosa* destinados a plantación no hay requisitos específicos para esta bacteria contemplados en la Directiva 2000/29/CE, si bien es obligatorio que sean sometidos, al menos, a un control fitosanitario en el país de origen previo a la exportación (necesario para la emisión del certificado fitosanitario), y a un control fitosanitario en frontera y análisis oficiales de laboratorio, previos a su introducción en la UE.

La Decisión 2015/789/UE y sus enmiendas posteriores actualizaron las medidas fitosanitarias para adaptarlas a la nueva situación derivada de la detección de nuevas subespecies de *X. fastidiosa* en zonas geográficas nuevas del territorio de la UE, diferentes a Italia, teniendo en cuenta la sensibilidad (susceptibilidad) de las plantas huésped a la infección por la bacteria. Las plantas huésped son los vegetales para plantación (excepto las semillas) pertenecientes a los géneros y especies que figuran en la base de datos de la Comisión Europea de plantas huésped sensibles a *X. fastidiosa* en el territorio de la Unión, que es actualizable y se encuentra en el enlace: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures/xylella-fastidiosa/susceptible_en.htm.

Además, ante la necesidad de mejorar la trazabilidad de dichas plantas, se introduce la obligación del pasaporte fitosanitario (PF) para la circulación dentro de la UE de todas las plantas huésped sensibles (susceptibles) a *X. fastidiosa* en el territorio de la UE que hayan sido producidas tanto fuera como dentro de una zona demarcada, elaborado y expedido de conformidad con la Directiva 92/105/CEE.

El pasaporte fitosanitario es un documento emitido por las entidades inscritas en el Registro Oficial de Productores, Comerciantes e Importadores de Vegetales (ROPCIV), que garantiza que los productos vegetales que ampara han sido sometidos a los pertinentes controles y tratamientos fitosanitarios, garantizando con ello que en las plantas huésped no se ha detectado el organismo nocivo, *X. fastidiosa*. Las empresas implicadas en la producción y comercialización de plantas huésped sensibles a *X. fastidiosa* entre la que se encuentran el olivo, la vid, varias especies de *Prunus* (almendro, melocoto-

nero, cerezo), plantas ornamentales, etc. deben solicitar su inscripción en el ROPCIV y la autorización para expedir los pasaportes fitosanitarios, junto con un modelo del pasaporte fitosanitario para su autorización, en el Departamento de Sanidad Vegetal de la Delegación Territorial de la Consejería con competencias en agricultura que corresponda. Por todo lo anteriormente indicado, es indispensable que el agricultor adquiera su material vegetal de plantación en viveros o empresas productoras inscritas en el ROPCIV, y que puedan garantizar el origen y el estado fitosanitario del material que proporcionen en lo concerniente a estar libre de *X. fastidiosa*.

Por otro lado, la Decisión 2015/789/UE establece la obligación de los Estados miembros de elaborar un plan de contingencia con objeto de garantizar el control y erradicación en caso de posibles brotes, así como de desarrollar campañas de sensibilización que faciliten información al público en general, a los viajeros, a los profesionales y a los operadores de transporte internacional, sobre la amenaza que supone el organismo especificado en el territorio de la Unión. En este sentido, España cuenta desde 2015 con un plan de contingencia elaborado por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, en cumplimiento a las exigencias comunitarias de la Decisión 2015/789 para evitar la entrada y propagación en la UE de *X. fastidiosa*. Además, algunas CCAA, como las de Andalucía, Aragón y Comunidad Valenciana, cuentan con planes de contingencia específicos adaptados a las peculiaridades climáticas, comerciales, y de cultivos de cada región. Los aspectos específicos del Plan de contingencia en el ámbito nacional serán abordados con detalle en el Capítulo 14.

Desde finales de 2016, cuando se notificó a la Comisión Europea la primera detección de *X. fastidiosa* en las Islas Baleares, se pusieron en práctica en la zona demarcada las medidas que establece la Decisión 2015/789/UE, y en aplicación del artículo 16 de la Ley de Sanidad Vegetal 43/2002, de 20 de noviembre, se adoptó la medida cautelar de prohibir la salida de las Islas Baleares de todos los vegetales para plantación, excepto semillas, de las especies cuya sensibilidad a las estirpes europeas y no europeas de *X. fastidiosa* es conocida. Estas medidas cautelares, que entraron en vigor el 22 de enero de 2017, se pueden consultar en el BOE en la Orden APM/21/2017, de 20 de enero. De forma análoga, tras la detección de *X. fastidiosa* en la Comunidad Valenciana a comienzos del verano de 2017 se puso en marcha de forma inmediata el plan de contingencia del MAPAMA y el específico de la Comunidad Valenciana (Capítulos 12 y 13, respectivamente).

Además, entre las diversas actuaciones propuestas desde la detección de la bacteria en las Islas Baleares y Alicante, a corto plazo se prevé intensificar las labores de monitorización del territorio en la península, fundamentalmente en las zonas geográficas de mayor riesgo por proximidad a las Islas Baleares o por ser zonas de mayor comercio de pasajeros y mercancías con ellas. En este sentido, los gobiernos de las diferentes comunidades autónomas son los responsables de llevar a cabo las inspecciones para garantizar que su territorio está libre de *X. fastidiosa*, y están llevando a cabo muestreos y análisis de muestras vegetales de diversa índole para cumplir la normativa de la Decisión 2015/789.

Agradecimientos

Parte de la información recogida en este trabajo está financiada por los proyectos N. 635646 POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y N. 727987 XF-ACTORS (*Xylella Fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy) del Programa de Investigación e Innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea.

Referencias bibliográficas

- DAS, M.; BHOWMICK, T. S.; AHERN, S. J.; YOUNG, R. y GONZÁLEZ, C. F. (2015): «Control of Pierce's disease by phage»; *PLoS ONE* (10): e0128902.
- DELLA COLETTA-FILHO, H. D. (2015): «Lessons learned with CVC and *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* in Brazil: host range, breeding for resistance, and citrus nursery certification program»; *Workshop on 'Xylella fastidiosa': knowledge gaps and research priorities for the EU*. 12-13 noviembre 2015. Bruselas, Bélgica.
- DELLA COLETTA-FILHO, H. D.; PEREIRA, E. O.; ALVES DE SOUZA, A.; TAKITA, A.; CRISTOFANI-YALE, M. y MACHADO, M. A. (2007): «Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange × Murcott tangor»; *Plant Pathol.* (56); pp. 661-668.
- EFSA (2015): «Hot water treatment of *Vitis* sp. for *Xylella fastidiosa*»; *EFSA Journal* (13)4225; pp. 10. doi:10.2903/j.efsa.2015.4225.

- EFSA (2017): «Susceptibility of *Olea europaea* L. varieties to *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST53: systematic literature search up to 24 March»; *EFSA Journal* (15)4772; pp. 18. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4772.
- FADEL, A. L.; STUCHI, E. S.; DE CARVALHO, S. A.; FEDERICI, M. T. y DELLA COLETTA-FILHO, H. (2014): «Navelina ISA 315: A cultivar resistant to citrus variegated chlorosis»; *Crop Prot.* (64); pp. 115-121.
- GIAMPETRUZZI, A.; MORELLI, M.; SAPONARI, M.; LOCONSOLE, G.; CHIU-MENTI, M.; BOSCIA, D.; SAVINO, V. N.; MARTELLI, G. P. y SILDARELLI, P. (2016): «Transcriptome profiling of two olive cultivars in response to infection by the CoDiRO strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*»; *BMC Genomics* (17); pp. 1-18.
- HOPKINS, D. L. (2005): «Biological control of Pierce's disease in the vineyard with strains of *Xylella fastidiosa* benign to grapevine»; *Plant Dis.* (89); pp. 1348-1352.
- HOPKINS, D. L. y PURCELL, A. H. (2002): «*Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases»; *Plant Dis.* (86); pp. 1056-1066.
- JANSE, J. D. y OBRADOVIC, A. (2010): «*Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks»; *J. Plant Pathol.* (92)(sup. 1); pp. S1.35-S1.48.
- KRUGNER, R. y LEDBETTER, C. A. (2016): «Rootstock effects on almond leaf scorch disease incidence and severity»; *Plant Dis.* (100); pp. 1617-1621.
- LANDA DEL CASTILLO, B. B.; NAVAS CORTÉS, J. A. y MONTES-BORREGO, M. (2017): «*Xylella fastidiosa* y la enfermedad de Pierce de la vid, ¿Una amenaza para la viticultura Española?»; *Phytoma-España* (288); pp. 34-37.
- LARANJEIRA, F. F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J. O.; CARVALHO, S. A. y COLETTA-FILHO, H. D. (1998): «Citrus varieties and species hosts of *Xylella fastidiosa* under field conditions»; *Fitopatologia Brasileira* (23); pp. 147-154.
- LEDBETTER, C.; CHEN, J.; LIVINGSTON, S. y GROVES, R. (2009): «Winter curing of *Prunus dulcis* cv. 'Butte,' *P. webbii* and their interspecific hybrid in response to *Xylella fastidiosa* infections»; *Euphytica* (169); pp. 113-122.
- MAPAMA (2017): *Plan de contingencia de 'Xylella fastidiosa' (Well y Raju)*. Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/>.

PURCELL, A. H. (1977): «Cold therapy of Pierce's disease of grapevines»; *Plant Dis. Rep.* (61); pp. 514-518.

Enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa* en Estados Unidos y Costa Rica

Leonardo De La Fuente^a, Carlos Chacón-Díaz^b y Rodrigo P. P. Almeida^c

^aAuburn University (EEUU, Alabama), ^bUniversidad de Costa Rica (Costa Rica)

y ^cUniversity of California (EEUU, California, Berkeley)

1. Introducción y perspectiva histórica

Estados Unidos (EEUU) es el país con más historia y con más casos de enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*, al menos en materia de informes de detección publicados. Los primeros registros de estas enfermedades datan de mediados de la década de 1880 (Pierce, 1892), cuando aún no se conocía la etiología de la enfermedad. Hoy en día se sabe que *X. fastidiosa* era la causa de los problemas que los bodegueros californianos tenían cuando querían implantar variedades europeas de *Vitis vinifera* para la producción de vinos de alta calidad. Asimismo existen registros de que los colonizadores españoles en el siglo XVI (Stoner, 1953; Hopkins y Purcell, 2002) tenían problemas para crecer *V. vinifera* en el estado de Florida, un estado de EEUU en el cual hasta hoy es prácticamente imposible cultivar la vid debido a la alta presión de infecciones por parte de *X. fastidiosa*. Debido a la naturaleza y el proceso de infección de *X. fastidiosa*, costó varias décadas y el trabajo de muchos investigadores el descubrir que estas enfermedades eran causadas por una bacteria transmitida por insectos vectores. Desde aquellas primeras publicaciones de enfermedades en vid (Pierce, 1892) hasta la prueba definitiva de los postulados de Koch (Davis *et al.*, 1978) y la caracterización taxonómica de la bacteria (Wells *et al.*, 1987) pasaron casi cien años. El largo tiempo transcurrido tiene varias explicaciones posibles, desde la falta de técnicas apropiadas, hasta periodos en los que la urgencia de las epidemias no era un factor impulsor de la investigación, o hasta preconcepciones o paradigmas científicos que influyeron de manera errónea en el entendimiento de este patógeno (para una revisión más extensa sobre este tema se recomienda leer la excelente revisión de Alexander Purcell [Purcell, 2013]).

1.1. Historia del descubrimiento de que una bacteria fastidiosa es responsable de enfermedades de etiología desconocida

Newton Barris Pierce (1856-1916) fue contratado por el Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA, por sus siglas en inglés) hacia finales de 1880. Uno de sus primeros trabajos fue estudiar el problema existente en vides desde 1885, que se empeoró al año siguiente en Anaheim, Orange County, California (EEUU), en donde una ‘oscura pero virulenta’ (James, 1892) enfermedad atacaba las vides de la región. Sus estudios que duraron dos años fueron publicados en un libro en 1892 (Pierce, 1892), del cual una crítica publicada en la revista *Science* en esa fecha (James, 1892) califica de «exhaustivo en muchos aspectos e insatisfactorio en otros». Una de las mayores críticas del libro de Pierce es que las recomendaciones para «... el remedio del mal, o siquiera sugerencias para frenar el problema, son extremadamente pobres». Lamentablemente 125 años más tarde, aunque sí existen sugerencias para «frenar el mal» (ver apartado 6), aún no se cuenta con un «remedio» o cura para esta enfermedad.

La «enfermedad de las vides de California», como la llamó Pierce (Pierce, 1892), se conoció por muchos años como la «enfermedad de Anaheim» y se pensaba que era causada por un virus, ya que no era posible para la época cultivar ningún microorganismo que pudiera ser reconocido como el agente causal (Hopkins, 1977). Sin embargo por la década de 1970 varias líneas de investigación indicaban que alguna bacteria podría ser la responsable de esta y otras enfermedades similares transmitidas por insectos del tipo Cicadélidos (Cicadellidae) (Hopkins, 1977). Finalmente en 1978 M. Davis, en ese momento en UC Berkeley, fue capaz de cultivar la bacteria y probar los postulados de Koch en vid (Davis *et al.*, 1978), incluyendo su transmisión por insectos desde plantas inoculadas artificialmente. Unos años más tarde Wells y otros investigadores (Wells *et al.*, 1987) caracterizaron taxonómicamente aislamientos bacterianos de vid, melocotón, ciruelos, roble y otros huéspedes, y definieron el género y especie de esta bacteria como *Xylella fastidiosa*, que fue ubicado en la subdivisión γ de las Proteobacteria, y se definió que estaba relacionado con el género *Xanthomonas*.

En las últimas décadas, los avances en distintas tecnologías, fundamentalmente de naturaleza molecular, así también como del conocimiento, hacen más fácil hoy en día poder demostrar los postulados de Koch para patógenos de los denominados «procariotas fastidiosos» como es el caso de *X. fastidiosa*.

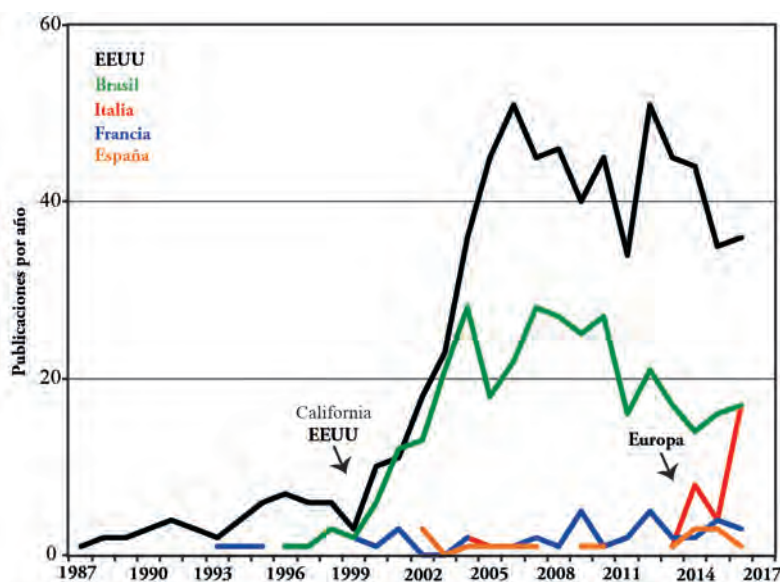
Sin embargo, las dificultades que conllevan las técnicas de aislamiento de la bacteria desde plantas infectadas, así como los ensayos de inoculación artificial, han llevado a que de todas las enfermedades descritas causadas por *X. fastidiosa*, tan solo una pequeña fracción de ellas hayan sido demostradas contundentemente a través de los postulados de Koch (EFSA, 2015). El desarrollo de síntomas en experimentos en invernadero usando inoculación artificial puede demorar desde 3-4 meses hasta más de un año, como en el caso del olivo (EFSA, 2016), dependiendo del huésped.

1.2. Epidemias en Estados Unidos

Aunque las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* abarcan un amplio rango de plantas huésped, la mayoría del conocimiento e investigación en este respecto ha surgido a partir de las epidemias de la enfermedad de Pierce (PD) en vid, ocurridas en California y de la clorosis variegada de los cítricos (CVC) en Brasil (Gráfico 1). Como muestran las tendencias en el número de publicaciones científicas representadas en la Figura 1, se puede ver que la mayoría del conocimiento de este patógeno se ha obtenido a partir de trabajos realizados en EEUU y Brasil. Sin embargo, ya se vislumbra que en los próximos años se dará en Europa un lógico aumento del número de publicaciones a consecuencia de los brotes detectados en Italia, Francia y España. La primera epidemia en el sur de California a fines del siglo XIX condujo a los estudios realizados por Pierce, como se mencionó anteriormente. Una epidemia en el Valle Central de California durante 1940 llevó a la identificación de las especies de insectos vectores (transmisores) de esta enfermedad y la determinación de patrones espaciales de la enfermedad en viñedos; asimismo, al descubrimiento de que el agente etiológico asociado con la enfermedad estaba limitado a los haces vasculares del xilema de las plantas. En los 1990 la introducción de nuevas especies de insectos vectores invasivos, *Homalodisca vitripennis* (chicharrita de alas cristalinas), condujo a un brote de la enfermedad en el sur de California. Esta epidemia promovió la realización de abundante investigación en *X. fastidiosa* usando herramientas moleculares, que llevaron a descubrir la mayoría de los conocimientos que tenemos hoy en día en materia de las interacciones planta-patógeno y diversidad bacteriana de esta especie. A pesar de los esfuerzos recientes y la investigación realizada en PD, un brote del patógeno ocurrió en los últimos años en el norte de California, considerada la zona vinífera más importante del estado, lo cual ilustra el hecho de que

lamentablemente el control efectivo de este patógeno en vid en California aún no es posible. Además de vid, las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* han impactado ocasionalmente cultivos como almendros y alfalfa en California. Asimismo, plantas ornamentales como la adelfa han sido severamente afectadas por la epidemia del chamuscado foliar o quemado de la hoja de adelfa en el sur de California, que llegó a devastar grandes áreas (incluyendo carreteras, ya que las adelfas son usadas como plantas en las barreras de las medianas tal y como ocurre en España).

Gráfico 1. Publicaciones científicas centradas en el tema *Xylella fastidiosa* durante los últimos años



* Para esta grafica se utilizó la base de datos del Web of Science Core Collection, utilizando como palabra clave en el tema «Xylella». La búsqueda fue realizada en Junio del 2017, y se comenzó desde 1987 ya que ese fue el año en que la bacteria fue nombrada como *X. fastidiosa*. Debido a que el número de publicaciones de cada país es asignado de acuerdo a la afiliación de los autores, en el caso de múltiples nacionalidades las publicaciones pueden ser contadas erróneamente. Debido a esto, la presente gráfica debe de ser considerada solo a nivel de tendencias, pero no de números absolutos de publicaciones.

Fuente: Web of Science Core Collection.

Pero *X. fastidiosa* no solo causa enfermedades en vides de los EEUU, si no que gran cantidad de árboles urbanos son susceptibles a este patógeno, principalmente en la región noreste del país. El impacto y distribución de estas enfermedades está escasamente estudiado debido a la falta de informa-

ción disponible. En el sureste de los EEUU otros cultivos como el arándano, melocotón y pecán también son atacados por *X. fastidiosa*. Sin embargo, estas enfermedades no han sido caracterizadas en profundidad. Es importante resaltar que algunas personas consideran que la viticultura en varias regiones de los EEUU no es posible debido a la presencia de esta bacteria.

1.3. Esfuerzos conjuntos de los científicos, los productores y el gobierno

Hasta que ocurrió la epidemia de la enfermedad de Pierce en California en la década de 1990, la investigación sobre *X. fastidiosa* estaba a cargo de un grupo pequeño de investigadores auspiciados por una variedad de agencias. A principios del año 2000 se consolidó un esfuerzo organizado para investigar esta enfermedad e incluyó una agencia de nivel federal (United States Department of Agriculture, USDA), una agencia estatal (California Department of Food and Agriculture, CDFA), así como partes interesadas en la industria vitícola y de viveros de vid en California. Estos esfuerzos contaron con fondos provenientes del gobierno federal, estatal y de la industria vitícola, y aunque ha cambiado con el tiempo, se mantiene vigente. Los resúmenes de los proyectos auspiciados por estas agencias pueden ser consultados gratuitamente en Internet (<https://www.cdca.ca.gov/pdcp/research.html>), y sirven de ejemplo del gran esfuerzo en materia de investigación que se ha desarrollado en vid en California en las últimas décadas. Este programa tiene dos componentes principales: primero, apoyo a proyectos de investigación dirigidos a encontrar soluciones o mejorar estrategias de manejo para reducir el impacto de *X. fastidiosa*. El apoyo económico sostenido por largo tiempo ha permitido mejoras significativas en el conocimiento y de los abordajes usados para el manejo de la enfermedad. En segundo lugar, USDA y CDFA, en conjunto con varias partes interesadas, han desarrollado programas en el área afectada para controlar insectos vectores, monitorizar la incidencia de la enfermedad y trabajar con viveros para limitar el riesgo de diseminación de los insectos vectores en el estado. Debido a que *X. fastidiosa* es endémica a lo largo de California, no existen esfuerzos de erradicación activos ni planeados. Sin embargo, existen esfuerzos de erradicación de especies de insectos vectores invasivos, lo que ha llevado a la erradicación de poblaciones de dichos insectos en regiones en donde no se habían establecido anteriormente.

2. Enfermedades que causa *Xylella fastidiosa* en Estados Unidos

En EEUU varias enfermedades causadas por *X. fastidiosa* han sido descritas a través de los años. La enfermedad de Pierce en vides (apartado 3) y el chamuscado bacteriano del arándano (apartado 4) serán discutidas en detalle en otros apartados de este mismo capítulo. Aquí haremos una revisión breve de algunas de las enfermedades que han sido detectadas en EEUU y que se consideran endémicas, pero que aún no han llegado a tener niveles epidémicos como ha sucedido con vides, cítricos y olivos.

- i) *Almendro*. En el almendro (*Prunus dulcis*) *X. fastidiosa* causa la enfermedad conocida como chamuscado de la hoja del almendro. La enfermedad fue descrita por primera vez en California en 1974 (Moller *et al.*, 1974) y ha sido establecida como un problema crónico solo en ese Estado, ya que California es el único productor de almendras en EEUU (Krugner y Ledbetter, 2016), y uno de los mayores productores mundiales de este fruto. Recientemente, se ha visto que esta enfermedad persiste en California, aunque con baja incidencia, calculada como máximo en un 17 % (Krugner y Ledbetter, 2016). En un estudio reciente (Sisterson *et al.*, 2012) se vió que, aunque más de la mitad de los 61 huertos considerados en ese estudio tenían al menos un árbol infectado, la incidencia media era baja (0.47 %). La enfermedad causa pérdidas de rendimiento de los almendros entre el 20-40 % (Sisterson *et al.*, 2012). En general los árboles infectados mueren después de 3 a 8 años, aunque en un estudio reciente (Sisterson *et al.*, 2012) se indicaba que solo un 9 % de los árboles murieron en el periodo de ~7 años considerado por ese estudio. Como se considera que el riesgo de que los árboles infectados sirvan como fuente de inóculo secundario es bajo (Sisterson *et al.*, 2012), en general los árboles afectados no son eliminados de las plantaciones.
- ii) *Roble*. En general los árboles comúnmente llamados robles están agrupados en diferentes especies del genero *Quercus*. La enfermedad del chamuscado bacteriano de la hoja en robles fue descrita por primera vez en 1994 (McGovern y Hopkins, 1994) en el estado de Florida, EEUU. Una prospección realizada unos años más tarde en ese estado indicó que, por ejemplo, el 65 % de los *Q. laevis* sintomáticos contenían *X. fastidiosa*, de acuerdo a datos basados en diagnósticos

llevados a cabo solamente mediante la técnica serológica ELISA (Barnard *et al.*, 1998), aunque en otras especies de *Quercus* la incidencia era menor. Una prospección más reciente hecha en árboles ornamentales en la ciudad de Washington DC evidenció que entre el 56-95 % de árboles de *Q. palestris* y *Q. rubra* dieron positivo para *X. fastidiosa* por ELISA, y algunas de las muestras positivas fueron confirmadas por técnicas moleculares de PCR (Harris *et al.*, 2014). En general los datos de mayor incidencia de *X. fastidiosa* en roble se han dado en el sureste y noroeste de EEUU, con notables casos en zonas de New Jersey, Maryland, Pennsylvania y New York (Hopkins, 1989; Chen *et al.*, 1995), lugares donde los inviernos son fríos e inclusive con nieve, al contrario de las zonas del sur de EEUU donde *X. fastidiosa* es más prevalente.

- iii) *Adelfa*. Plantas ornamentales como la adelfa (*Nerium oleander*) son afectadas también por *X. fastidiosa*, y en EEUU ha habido casos descritos de esta enfermedad en California y Florida (Wichman y Hopkins, 2002). Los primeros casos descritos fueron en California, en jardines de campos de golf y casas residenciales, en donde las adelfas empezaron a mostrar síntomas de chamuscado de hoja sobre finales de 1980 y principios de 1990 (Purcell *et al.*, 1999). Sin embargo no existen datos de incidencia o prevalencia de esta enfermedad. En la literatura científica solo existen datos de caracterización molecular de cepas en adelfa que difieren de aquellas que afectan vides (Chen *et al.*, 1992; Wichman y Hopkins, 2002) e incluso se propone que se trataría de una subespecie distinta, la subespecie *sandyi* (Schuenzel *et al.*, 2005).
- iv) *Melocotonero*. La enfermedad conocida como «melocotón falso» (*phony peach* en inglés) se conocía en el estado de Georgia desde principios del siglo XX (Neal, 1920; Hutchins, 1930). Esta enfermedad disminuye la cantidad de frutos producidos, causa frutos más pequeños en melocotón y el crecimiento del árbol prácticamente cesa, dándole la apariencia de árbol enano. En el caso de esta enfermedad no se notan síntomas a nivel de la hoja, sin embargo el crecimiento retardado del árbol da esa apariencia de enanismo característico del ‘melocotón falso’. Estudios de la distribución de la bacteria en este huésped han demostrado que hay mayores concentraciones en las raíces que en las hojas (Evert *et al.*, 1981). Si la presión de la enfermedad es muy severa en una zona geográfica, los árboles infectados pueden empezar a mostrar esa sintomatología tan pronto como a los tres años después

de haber sido plantados. En general, se recomienda eliminar y descartar los árboles infectados, ya que se ha visto que los árboles enfermos no mueren pero sirven de inoculo para la diseminación secundaria de la enfermedad (Evert *et al.*, 1981). Varios estudios sobre la fisiología de los árboles de melocotonero infectados por *X. fastidiosa* se realizaron durante las décadas de 1970-1980. Tenían como objetivo ver si la aplicación de fitohormonas como giberelinas ayudaría a curar la enfermedad y demostraron que aunque el árbol crecía mejor con las aplicaciones de fitohormonas, la infección se mantenía (French y Stassi, 1978). Aparte de los casos descritos de esta enfermedad en el estado de Nuevo México (Randall *et al.*, 2011), no ha habido otras descripciones de graves problemas de *X. fastidiosa* en melocotonero en las últimas dos décadas, aunque recientemente en el estado de Georgia se ha notado una reemergencia de esta enfermedad (P. Brannen, comunicación personal).

- v) *Pecanero o pacana*. Desde 1970 existen casos descritos de chamuscado de hojas de pecaneros, que habían sido atribuidos a una enfermedad causada por diferentes hongos; por lo cual la enfermedad se denominó al principio quemadura fúngica de la hoja (Sanderlin y Heyderich-Alger, 2000). En el año 2000 se demostró que esta enfermedad era causada por *X. fastidiosa* (Sanderlin y Heyderich-Alger, 2000). Esta bacteriosis puede ser transmitida mediante el injerto al usar tanto patrones como variedades infectados (Sanderlin y Melanson, 2006). Este tipo de transmisión por injerto puede ser frenada si el material vegetal se trata con baños de agua caliente antes de injertarlos (Sanderlin y Melanson, 2008). Las cepas de *X. fastidiosa* que infectan a los pecaneros parecen ser específicas para ese huésped ya que no infectan a otras plantas como vid y sicomoro entre otros (Sanderlin, 2017). Variedades muy susceptibles a esta enfermedad como «Cape Fear» (Sanderlin and Heyderich-Alger, 2003) están siendo desechadas por los agricultores para evitar pérdidas (Figura 1). El efecto de esta enfermedad en Cape Fear se valoró en una pérdida de peso de las nueces pacanas del ~16 % (Sanderlin y Heyderich-Alger, 2003). Asimismo como ocurre con el melocotonero, esta enfermedad ha incrementado su incidencia en los últimos años en regiones del sur de EEUU (P. Brannen, comunicación personal).

Figura 1. Síntomas de infecciones de *X. fastidiosa* en pecanero.
Apariencia de un árbol de pecanero infectado (A) y detalle de los síntomas típicos de chamuscado de la hoja en arboles de pecaneros de la variedad ‘Cape Fear’ (B)



Fuente: Jennifer Parker (Grupo de investigación de Leonardo De La Fuente, Auburn University).

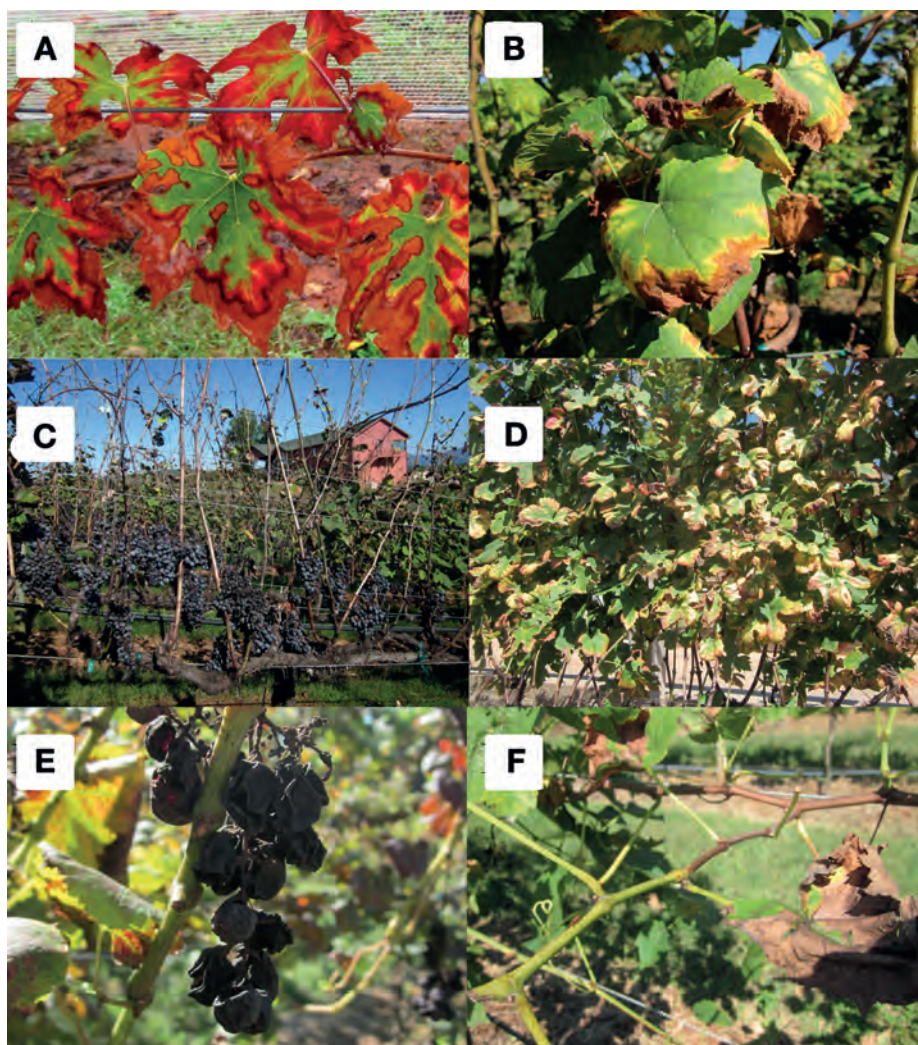
vi) *Ciruelo*. El escaldado de la hoja del ciruelo fue descrito en la primera mitad del siglo XX en Argentina, Paraguay y Brasil, y parece haber sido un problema más importante en Sudamérica (French y Kitajima, 1978; Coletta *et al.*, 2017). En EEUU no se cuenta con suficiente información sobre la incidencia de esta enfermedad. Estudios realizados en el estado de Alabama en 1970 (Latham y Norton, 1980) clasificaron a esta enfermedad como una de las más importantes para el cultivo del ciruelo en esa zona. Una prospección llevada a cargo con personal de extensión de Alabama, a los que se les pidió que mandaran muestras sintomáticas de melocotoneros y ciruelos, llegó a la conclusión de que el 12 % de las muestras de ciruelo eran positivas para *X. fastidiosa* al ser analizadas mediante ELISA (Boyhan *et al.*, 1997). Los síntomas son parecidos al «melocotonero falso», ya que afecta el tamaño y el crecimiento del árbol, la calidad y la producción de fruto. Además de esos síntomas, el escaldado de la hoja del ciruelo causa muerte regresiva de ramas terminales, llevando a la muerte de toda la rama y eventualmente todo el árbol en 1 o 2 años (Latham y Norton, 1980). Como en otras enfermedades causadas por *X. fastidiosa*, se demostró que el uso de insecticidas sistémicos como imidacloprid ralentiza el avance de esta enfermedad en ciruelos (Dutcher *et al.*, 2005).

3. La enfermedad de Pierce de la vid

La enfermedad de Pierce en vid es, por ahora, la mejor estudiada entre las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*. Los trabajos iniciales de Pierce (1892) respecto a una epidemia en el sur de California incluían una descripción detallada de los síntomas de la enfermedad, a pesar de que el patógeno se pensaba que era un virus en ese momento. Los síntomas a nivel foliar varían según que los cultivares de vid sean de uvas tintas o blancas (Figuras 2A y 2B), y normalmente los síntomas foliares son más difíciles de identificar en los de uva blanca. El desarrollo de los síntomas a nivel foliar depende del tipo de planta y de las condiciones climáticas, pero en general los síntomas comienzan a aparecer a finales del verano o principios del otoño, incluyendo coloración roja oscura desarrollándose en los bordes de las hojas (Figura 2A), seguidas de necrosis («acorchamiento») en estas áreas, mientras que una banda roja oscura permanece entre la zona necrótica y los tejidos verdes de la hoja. Finalmente, el limbo de la hoja chamuscada cae del peciolo, resultando en la apariencia de palos de cerillas en las ramas (Figura 2F). Además de la pérdida de hojas, las ramas infectadas tienen maduración desigual con áreas verdes mezcladas con otras áreas más lignificadas/maduras (Figura 2F). Aunque el desarrollo de los síntomas no ha sido estudiado detalladamente en condiciones de producción de campo, los síntomas en hoja se desarrollan en el mismo año en que las plantas son infectadas si la infección ocurre en la primavera. Inicialmente, las infecciones permanecen localizadas en el primer año de la infección y se tornan sistémicas y se mueven a lo largo de la planta al año siguiente. En la mayoría de las áreas de los EEUU, en un periodo de tres años, la planta resulta infectada completamente y tiene una profusa sintomatología, resultando en que no se pueda cosechar nada útil a partir de esas plantas. Las uvas de plantas infectadas se secan (Figura 2E) debido al estrés hídrico, y se producen como síntoma de infecciones avanzadas.

Existen varias herramientas para diagnosticar infecciones de *X. fastidiosa* en vides. Aunque el objetivo de este capítulo no está en la parte de diagnóstico, es suficiente decir que los métodos moleculares son confiables y precisos. En campo, el uso de los síntomas de enfermedad para su detección inicial es más fácil en el caso de variedades de vides tintas que para las variedades blancas. Además, la prospección de los síntomas debe tener lugar en el otoño, cuando los síntomas foliares están completamente desarrollados, ya que el diagnóstico temprano es muy difícil, inclusive para especialistas.

Figura 2. Síntomas de la enfermedad de Pierce en vid. Típico síntoma de chamuscado de la hoja en vides de cultivares de uva tinta (A). Síntoma en hoja en vides de cultivares de uva blanca (B). Defoliación y frutos secos en síntomas avanzados; nótese las vides sanas en la hilera posterior a la foto (C). Síntomas en hojas en variedades de vid de cultivares de uva blanca (D). Uvas secas, tipo «pasa» causadas por la infección (E). Síntomas en el tallo incluyendo islas verdes y palos de cerilla (G)



* Las fotos fueron obtenidas de vides infectadas con *X. fastidiosa* en el estado de Georgia.

Fuentes: Luisa Cruz (A); Jennifer Parker (B-F). Grupo de investigación de Leonardo De La Fuente, Auburn University.

La enfermedad de Pierce ocurre en todas las zonas del sur de EEUU donde se cultiva la vid desde Florida hasta California. En EEUU solo un grupo de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* causa la enfermedad de Pierce, lo cual se especula es resultado de una introducción desde América Central hace más de cien años. De todos modos, un factor limitante para el desarrollo de la enfermedad parecen ser los inviernos fríos, ya que la enfermedad de Pierce no se conoce en las zonas más norteñas de California, Oregón o Washington, por ejemplo. La incidencia de la enfermedad también es menor en zonas con mayores altitudes o en viñedos plantados en climas más fríos. El mecanismo biológico responsable de este fenómeno no se ha identificado, pero ha sido establecido que temperaturas bajas durante el invierno pueden curar a vides de infecciones por *X. fastidiosa*. En otras palabras, plantas que tienen infecciones que son viables durante el ciclo de crecimiento, que puede incluir síntomas de la enfermedad, se recuperan de *X. fastidiosa* el año siguiente si el invierno ha sido frío.

La epidemiología de la enfermedad de Pierce es variable y depende de cada región, clima, vegetación y paisaje, así como de las especies de insectos vectores. Por ejemplo, en el sur de California la enfermedad está asociada con el insecto invasor «chicharrita de alas cristalinas» (*Homalodisca vitripennis*), que llega a tener poblaciones muy grandes en las plantaciones de cítricos, los cuales son comunes en esa región. En ese caso, las grandes poblaciones del vector son las responsables principales de la epidemiología de la enfermedad, y consecuentemente, el control de vector es requerido para la producción de vides. Por otro lado, en el norte de California el insecto vector es una especie nativa que está presente en bajas poblaciones, por lo que el control del vector no es recomendado. Por lo tanto, el manejo de la enfermedad es muy variable según la zona de EEUU que se trate. Sin embargo, como ocurre con otras enfermedades de *X. fastidiosa*, el control del vector y la eliminación de plantas infectadas son componentes importantes del manejo de viñedos para reducir el impacto de la enfermedad.

Es importante recalcar que al igual que en otras bacteriosis causadas por *X. fastidiosa*, no existe cura para la enfermedad de Pierce, a pesar de que ha sido razonablemente bien estudiada. Solamente en California el costo anual de esta enfermedad durante un periodo normal de incidencia ha sido estimado en ~100 millones de dólares americanos por año. A pesar de la inversión en investigación y desarrollo de prácticas de manejo, la incidencia de la enfermedad ha incrementado en los últimos años en California. Aún más, en el

caso de la chicharrita de alas cristalinas, en algunas áreas del estado el insecto está tornándose resistente a los insecticidas.

4. El chamuscado bacteriano de la hoja del arándano

EEUU es el mayor productor de arándanos a nivel mundial, con una producción anual cercana a los 800 millones de dólares americanos (Anonymous, 2015). Históricamente los estados donde la producción de arándanos era mayor estaban en el norte del país, en zonas con climas fríos. Pero la expansión de cultivares que crecen muy bien en climas más cálidos ha llevado a un incremento exponencial en la producción de arándanos en estados del sureste de EEUU tales como Georgia (en donde este cultivo es el número uno en materia de ingresos), Florida y Alabama. El valor económico de la producción de estos estados con climas más cálidos se ha triplicado prácticamente en los últimos 10 años (Economic Research Service, USDA). Lamentablemente la expansión en superficie de producción y los climas más cálidos con inviernos suaves, son más propicios para enfermedades causadas por bacterias como *X. fastidiosa*.

El chamuscado bacteriano de la hoja del arándano es causado por *X. fastidiosa*, como fue demostrado en el sur del estado de Georgia por primera vez hace relativamente poco (Chang *et al.*, 2009); y luego fue descrito en la zona norte del estado de Florida (Harmon y Hopkins, 2009). Los síntomas de esta enfermedad (Figura 4) incluyen, además del chamuscado de la hoja, la muerte regresiva, y el color amarillento del tallo lo que lleva eventualmente a la muerte de los arbustos de arándanos (Chang *et al.*, 2009). El insecto vector más prevalente en arándanos en el estado de Georgia es la chicharrita de alas cristalinas (*Homalodisca vitripennis*) (Holland y Scherm, 2012). Se ha visto que la enfermedad es más severa en los arándanos que son híbridos interespecíficos de *Vaccinium corymbosum*. Sin embargo otros cultivares de la especie *Vaccinium virgatum* así como los cultivares híbridos de *V. corymbosum* ‘Emerald’ y ‘Millenia’ que crecen cerca de otros cultivares susceptibles, muestran poca incidencia o ausencia de síntomas de estas enfermedades (Brannen *et al.*, 2008). Trabajos de investigación han demostrado que los insectos vectores como la chicharrita de alas cristalinas no tiene preferencia para alimentarse en algunos de estos cultivares en especial y por lo tanto se ha sugerido que estos cultivares podrían tener cierto nivel de tolerancia o resistencia a *X. fastidiosa* (Tertuliano *et al.*, 2012), tal vez debido a la mejor conductancia hidráulica por sus vasos de xilema (Holland y Scherm, 2012). En infecciones de campo en arándanos

siempre se han encontrado cepas de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (Hopkins *et al.*, 2012; Parker *et al.*, 2012; Oliver *et al.*, 2014), pero existe evidencia experimental que cepas de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* también pueden causar síntomas en esta planta (Hopkins *et al.*, 2012; Oliver *et al.*, 2015).

Por ahora los métodos de manejo de la enfermedad incluyen el uso de variedades resistentes o tolerantes como ‘Emerald’, y el uso de insecticidas; aunque este último con restricciones debido al desconocimiento del mejor momento para su aplicación, y los problemas inherentes que conlleva el uso excesivo de estos químicos (Holland y Scherm, 2012).

Figura 3. Síntomas del chamuscado bacteriano de la hoja en arándano.
Defoliación en arbustos de arándanos infectados (A). Síntomas del chamuscado en hojas de arándano (B-C): en estadios tempranos (B) o tardíos cuando la necrosis es evidente (C)



* Las fotos fueron tomadas en campos de arándanos en el sur del estado de Georgia (EEUU) que estaban infectados por *X. fastidiosa*.

Fuente: Jonathan Oliver (Grupo de investigación de Leonardo De La Fuente, Auburn University).

5. Enfermedades que causa *X. fastidiosa* en Costa Rica

X. fastidiosa está presente de forma endémica en Costa Rica (Tabla 1). Es interesante considerar que, a pesar del gran potencial de la bacteria para provocar enfermedad y su diseminación por gran parte del territorio nacional, los síntomas asociados a plantas infectadas son leves y en su mayoría asintomáticas. La primera cita de la presencia de la bacteria en el país data de 1979, cuando se aisló *X. fastidiosa* a partir de plantas de vid con síntomas similares a la enfermedad de Pierce. Además, en ese mismo estudio se demostró la similitud fenotípica y serológica de las cepas aisladas de vid de Costa Rica con cepas asociadas a la enfermedad de Pierce en California (Goheen *et al.*, 1979). En los años 90, se empezó a describir por parte de productores de café de diferentes zonas cafetaleras del país, una serie de síntomas a los que en su conjunto se les denominó crespura del café (ver subapartado 3.1). En Costa Rica el cultivo de café es de gran importancia histórica, además de ser una de las principales actividades productivas del país, con gran extensión del territorio nacional dedicado a su cultivo, y donde representa también la principal fuente de ingresos en algunas zonas rurales (Solórzano *et al.*, 2001). No fue hasta el año 2001 cuando se determinó que el agente etiológico de la crespura era *X. fastidiosa* (Rodríguez *et al.*, 2001). Existen pocos estudios que demuestren el impacto negativo en la producción del fruto, en plantas con crespura con respecto a plantas sanas (Solórzano *et al.*, 2001). Posteriormente, se detectó *X. fastidiosa* en cítricos, específicamente en naranjos que eran utilizados con el propósito de dar sombra en los cafetales. Estos árboles presentaban sintomatología similar a la observada para la clorosis variegada de los cítricos (CVC) en Brasil (Aguilar *et al.*, 2005). En el 2008, se determinó indirectamente por medios serológicos y moleculares la presencia de *X. fastidiosa* en aguacate (*Persea americana*), los árboles mostraban síntomas similares a los observados en algunas enfermedades de quemazón provocados por *X. fastidiosa* pero a pesar de los esfuerzos no ha sido posible recuperar bacterias de los árboles infectados (Montero-Astúa *et al.*, 2008b). Finalmente, se determinó la presencia de *X. fastidiosa* en arbustos de adelfa (*Nerium oleander*), utilizados en jardines para fines ornamentales en la región central del país. Las plantas mostraban síntomas similares a los descritos para la quemadura de la hoja de la adelfa (*oleander leaf scorch*) y normalmente estos arbustos con el tiempo llegan a secarse y son cortados (Montero-Astúa *et al.*, 2008a).

Tabla 1. Presencia de *Xylella fastidiosa* en diferentes huéspedes con desarrollo de síntomas en Costa Rica

Planta Huésped	Método de detección	Año	Referencia
Vid (<i>Vitis vinifera</i>)	Aislamiento	1979	(Goheen <i>et al.</i> , 1979)
Café (<i>Coffea arabica</i>)	DAS-ELISA, PCR, Aislamiento	2001	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2001)
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	DAS-ELISA, PCR, Aislamiento	2005	(Aguilar <i>et al.</i> , 2005)
Aguacate (<i>Persea americana</i>)	DAS-ELISA, PCR	2008	(Montero-Astúa <i>et al.</i> , 2008b)
Adelfa (<i>Nerium oleander</i>)	DAS-ELISA, PCR, IFA*	2008	(Montero-Astúa <i>et al.</i> , 2008a)

* *Immunofluorescencia indirecta.*

5.1. La crespada del café

Como se mencionó anteriormente, en 2001 se confirmó que *X. fastidiosa* era el agente causal de la enfermedad denominada crespada del café (Rodríguez *et al.*, 2001). Sin embargo, desde mediados de 1990 los productores de café de diferentes regiones cafeteras habían observado un crecimiento y enrollamiento irregular del margen de las hojas de café y por esta razón se le denominó crespada (similar a *leaf curling* en inglés) (Montero-Astúa *et al.*, 2008). Otros síntomas asociados incluyen malformación de hojas, moteados cloróticos, reducción de tamaño, caída prematura de las hojas, acortamiento de entrenudos y aborto de frutos en los estadios iniciales de desarrollo (Rodríguez *et al.*, 2001). Los síntomas iniciales aparecen en algunas ramas, extendiéndose posteriormente a toda la planta. En condiciones de campo, no se han observado quemaduras en las hojas tal como se ha descrito para la quemadura de la hoja del café en Brasil (Beretta *et al.*, 1996). Se sabe que existe una gran diversidad de cicadélidos y clastopteridos en las zonas productoras de café afectadas por *X. fastidiosa* que podrían ser potencialmente transmisores de la bacteria (Garita-Cambronero *et al.*, 2008), pero sin embargo no se han hecho los ensayos de transmisión para demostrar el posible potencial de estos insectos como vectores de *X. fastidiosa*.

5.2. Cronología de la investigación de enfermedades causadas por *X. fastidiosa* en Costa Rica

El estudio que culminó con la asociación de *X. fastidiosa* como agente causal de la crespada del café (Rodríguez *et al.*, 2001), impulsó la investigación que se realiza en el país sobre *X. fastidiosa*. Con el aislamiento de cepas

principalmente de café, vid y cítricos en los primeros años (Montero-Astúa *et al.*, 2007), se hizo evidente que las cepas de *X. fastidiosa* presentes en el país, adolecen de una diversidad genética mayor en comparación con las de otros países donde se han asociado cepas específicas de *X. fastidiosa* a ciertos brotes o epidemias (Nunney *et al.*, 2014). El uso de técnicas moleculares como el análisis MLST ha permitido cierto consenso en la clasificación de las cepas mundialmente. En el caso de Costa Rica, la mayoría de las cepas descritas en el país se clasifican como *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* a pesar de que también hay citas de la subespecie *pauca* (Nunney *et al.*, 2014). La amplia diversidad genética encontrada en las cepas de *X. fastidiosa* presentes en el país, la gran diseminación de la bacteria en el territorio nacional y la falta de sintomatología asociada a plantas infectadas, ha permitido especular que el origen de la bacteria es centroamericano. Recientemente, la aparición en Europa de *X. fastidiosa* como uno de los agentes involucrados en el síndrome del decaimiento rápido del olivo vuelve a poner a Costa Rica en el contexto global en el estudio del patógeno debido a la similitud genética que existe entre cepas de *X. fastidiosa* ST53 aisladas de adelfa (*Nerium oleander*) de Costa Rica con las cepas de *X. fastidiosa* CoDiRo de olivos (Giampetruzzi *et al.*, 2017). La reciente aparición de diversas subespecies de *X. fastidiosa* en Francia y España hace que Costa Rica participe activamente, aprovechando la experiencia generada en los últimos años, en los esfuerzos globales por generar conocimiento básico sobre el patógeno y sobre las estrategias de contención.

5.3. Implicaciones económicas y sociales

Aunque la descripción de la crespada en café se realizó ya en 1990, y la enfermedad está diseminada en todas las regiones cafetaleras del país, existe poca investigación dirigida a determinar el impacto real en los rendimientos de producción entre plantas sanas y afectadas (Solórzano *et al.*, 2001). Aparte del café, no existe evidencia científica para determinar el impacto en los otros cultivos donde se ha detectado la bacteria. En el año 2015, a raíz del brote de *X. fastidiosa* en Europa, las autoridades fitosanitarias europeas cerraron repentinamente el mercado para la exportación de la planta ornamental *Phoenix roebelenii*, una actividad económica importante para el país, a raíz de un estudio de la EFSA argumentando que la planta se encuentra dentro de la lista de hospederos de *X. fastidiosa* (EFSA, 2015). Esto provocó una reducción de la actividad productora que consistía en más de 800 hectáreas sembradas, pro-

duciendo pérdidas económicas millonarias, así como la pérdida de empleo de más de 800 personas cuya fuente de ingreso principal estaba ligado a esta actividad. A pesar de esfuerzos realizados por las autoridades fitosanitarias del país por revindicar el estatus de la planta como no huésped de *X. fastidiosa* hasta la fecha no ha sido posible modificar dicha normativa (Health *et al.*, 2016).

La situación del control de la enfermedad en Costa Rica no será discutida a pesar de que en el año 2015 se hizo una declaración de situación de emergencia fitosanitaria debido a *X. fastidiosa*, por parte de las autoridades fitosanitarias del país (Decreto Ejecutivo 39058 República de Costa Rica) (Ejecutivo, 2015). Esta declaración responde a las medidas establecidas por las autoridades fitosanitarias de la Unión Europea para la limitación de exportación de ornamentales y no necesariamente establece estrategias que contribuyan a disminuir, controlar o regular la diseminación de la bacteria en el territorio nacional. Debido a la falta de un método de cura, estos métodos y regulaciones a nivel estatal o regional son las únicas herramientas que el productor dispone hoy en día para mitigar el impacto de estas enfermedades.

6. Medidas de manejo de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* en EEUU

En esta sección se discutirán brevemente las diferentes medidas que los productores utilizan para manejar las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* en distintas zonas de EEUU.

6.1. Regulaciones en California

Considerando todas las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* en EEUU, únicamente en el caso de la enfermedad de Pierce en vid y en el estado de California existen regulaciones específicas para controlar esta enfermedad. En particular existe un protocolo de movimiento de materiales de viveros que exige el controlar la presencia de la chicharrita de alas cristalinas en material vegetal a la venta (CDFA, 2016). Este protocolo ha sido exitoso, ya que las intercepciones de este insecto vector bajaron de 149 en el 2001 a 4 en el 2011 (de un total de ~50,000 envíos) (CDFA, 2011).

Además de esta regulación, existe la categorización cuarentenaria (APHIS) para cepas causantes de la clorosis variegada de los cítricos (CVC) de cítricos en Sudamérica, clasificadas como *X. fastidiosa* subsp. *pauc*. Esta enfermedad,

así como otras también causadas por *X. fastidiosa* subsp. *pauca* no han sido descritas aún en EEUU.

Debe indicarse que aunque *X. fastidiosa* no ha sido detectada en todos los estados del país, esta bacteria se considera endémica en las regiones donde causa enfermedades de importancia agronómica. Esta situación es muy diferente a lo que está ocurriendo en Europa, donde *X. fastidiosa* era considerada ausente y era un patógeno de cuarentena. En EEUU no existen esfuerzos para erradicar al patógeno o establecer estrategias de contención. La única excepción es el genotipo causante de CVC como se mencionó anteriormente. Por lo tanto, los esfuerzos de cada estado no se centran en el control de la bacteria en la planta. Sin embargo, sí existe un gran programa para limitar la diseminación y el impacto de especies de insectos invasores como la chicharrita de alas cristalinas (*Homalodisca vitripennis*) en California.

6.2. Estrategias de manejo de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*

La estrategia de manejo de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* más común en EEUU es la utilización de insecticidas (principalmente imidacloprid, un neonicotinoide) para controlar las poblaciones del insecto vector (Hopkins y Purcell, 2002). El uso de insecticidas es la manera de controlar la enfermedad de Pierce más común en el sur de California (Tumber *et al.*, 2014), aunque si la variedad es muy susceptible el efecto de control es poco efectivo (Hopkins y Purcell, 2002). En el valle de Napa (California) en general se usaban insecticidas al principio de la primavera en vegetaciones naturales rodeando a los viñedos para evitar la entrada de insectos contaminados desde estas zonas donde se refugiaban (Hopkins y Purcell, 2002). Asimismo, se realizan pulverizaciones de insecticidas en plantaciones de cítricos cercanos a viñedos, ya que ahí es donde se reproducen los insectos en el invierno (Tumber *et al.*, 2014). En otros huéspedes como los arándanos, también se utilizan insecticidas para controlar al vector (Holland y Scherm, 2012). El uso de insecticidas del tipo neonicotinoide está siendo revisado actualmente debido a que varios países están prohibiendo o regulando su uso.

Con respecto a la resistencia del huésped en vid, se conoce que prácticamente todas los cultivares de uva de vino europeos (*V. vinifera*), americanas (*V. labrusca*) e híbridos franco-americanos son susceptibles a *X. fastidiosa* (Hopkins y Purcell, 2002). Las uvas del tipo ‘muscadina’ (*V. rotundifolia*) son

resistentes/tolerantes a la enfermedad de Pierce, y esa es una de las razones por la que el vino hecho con estas uvas es popular en los estados del sureste americano. Esfuerzos de programas de mejora genética liderados por Andy Walker (UC Davis) han llevado a introducir resistencia procedente de *V. arizonica* (Riaz *et al.*, 2009) en variedades de *V. vinifera*, desarrollando variedades resistentes/tolerantes a la enfermedad de Pierce que estarán disponibles en el mercado próximamente (Jeffries, 2016).

En general todas las prácticas agrícolas que generen estrés en la planta van a incrementar la severidad de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*. Estrés hídrico o demasiada producción de frutos, así como daños causados en las raíces por maquinaria agrícola y hasta la propia senescencia de la planta llevan a incrementar la severidad en vid a la enfermedad de Pierce (Hopkins y Purcell, 2002). Por lo tanto, las prácticas agrícolas que minimicen el estrés en la planta son beneficiosas para reducir la severidad de estas enfermedades.

6.3. Medidas en desarrollo para el control y manejo de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*

Varias propuestas de métodos de control o manejo de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*, en particular en vid, han sido sugeridas en varias publicaciones científicas, aunque aún no existen datos de su eficacia a nivel de campo. Entre ellas se incluyen tratamientos de frío (Purcell, 1977; Lieth *et al.*, 2011), de agua caliente en el caso de pecanero (Sanderlin y Melanson, 2008), o el uso de bacteriófagos que atacan específicamente a la bacteria (Das *et al.*, 2015).

La posibilidad del control biológico ha sido estudiada mediante la utilización de una cepa poco virulenta de *X. fastidiosa* (Hopkins, 2005). La cepa EB92-1 fue aislada de saúco, y se vio que si las vides eran inoculadas con esta cepa, la severidad de la enfermedad disminuía. Esta posibilidad ha sido evaluada a nivel de campo (Hopkins, 2005; Hopkins *et al.*, 2010) con resultados variables. Existen problemas asociados con el uso de cepas avirulentas de *X. fastidiosa* como agentes de control biológico, ya que este enfoque introduciría material genético nuevo en zonas donde existen patógenos virulentos. Esto es relevante porque *X. fastidiosa* es lo que se llama una bacteria ‘competente natural’, lo que quiere decir que tiene la capacidad de tomar ADN del medio e incorporarlo en su genoma. El intercambio de genes y el flujo de ADN entre

cepas virulentas de *X. fastidiosa* y las usadas como agentes de control biológico pueden llevar a resultados inesperados e indeseados.

En las últimas décadas se han estado probando cultivares transgénicos de vid como una solución viable al control de *X. fastidiosa* (CDFA, 2016). Diferentes tipos de plantas transgénicas están siendo evaluados en campo en California y tienen incorporadas propiedades inhibitorias de enzimas bacterianas (Aguero *et al.*, 2005), que llevan a la bacteria a no colonizar la planta ya que la confunden con la producción de moléculas señal, o de inhibición de la respuesta de muerte programada de la planta (CDFA, 2016). Entre estos cultivares transgénicos, se ha demostrado en ensayos de campo que las plantas de vid modificadas para producir una señal de *quorum sensing* de la bacteria hacían que la bacteria una vez dentro de la planta no se desplazase y quedase inmobilizada (Lindow *et al.*, 2014), mostrando menor incidencia de la enfermedad.

Lamentablemente, a pesar de haber pasado ya más de cien años desde que se describió la enfermedad de Pierce en vid, no se conoce aún una cura efectiva para las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*. En lo que sí se ha avanzado es en el conocimiento e implementación de métodos de manejo de la enfermedad, que en muchos casos son efectivos en mitigar el desarrollo de síntomas, pero necesitan ser ajustados a las condiciones específicas de la planta huésped, vector y ambiente de cada caso. Por lo tanto, es necesario que diferentes aspectos de investigación desde epidemiología, entomología, bacteriología y mejora vegetal, tanto en enfoques básicos como aplicados, continúen avanzando. Mantener la comunicación y coordinación entre todas estas disciplinas permitirá llegar cada vez a métodos más efectivos y menos costosos para controlar las enfermedades causadas por esta bacteria. Las características de este patógeno lo hacen particularmente difícil de estudiar y controlar, por eso el esfuerzo conjunto de gobiernos locales y nacionales, productores e investigadores es la única manera de mejorar nuestro conocimiento de estas enfermedades y lograr su control de una manera eficiente, como se ha hecho y se continúa haciendo en el estado de California, EEUU.

Agradecimientos

L. D. agradece a la Universidad de Córdoba (España), por la financiación recibida con el programa de Profesor Visitante, que facilitó una estancia que permitió la escritura de este capítulo. La investigación realizada en el laboratorio de L. D. en torno a *X. fastidiosa* está financiada por los programas Agricul-

ture and Food Research Initiative competitive grant no. 2015-67014-23085 de la USDA National Institute of Food and Agriculture, y HATCH AAES (Alabama Agricultural Experiment Station).

C. CH. La investigación realizada en el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica en torno a *X. fastidiosa* está financiada parcialmente por el Programa de investigación e innovación de la Unión Europea Horizonte 2020 bajo los contratos No 635646: POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y No 727987: XF-ACTORS (*Xylella fastidiosa* active containment through a multidisciplinary oriented research strategy).

Referencias bibliográficas

- AGUERO, C. B.; URATSU, S. L.; GREVE, C.; POWELL, A. L. T.; LABAVITCH, J. M.; MEREDITH, C. P. y DANDEKAR, A. M. (2005): «Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene»; *Molecular Plant Pathology* (6); pp. 43-51.
- AGUILAR, E.; VILLALOBOS, W. L. M.; RODRÍGUEZ, C. M.; KITAJIMA, E. W. y RIVERA, C. (2005): «First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica»; *Plant Disease* (89); p. 1.
- ANONYMOUS (2015): «USDA-NASS Census of Agriculture». Washington, DC.
- BARNARD, E. L.; ASH, E. C.; HOPKINS, D. L. y MCGOVERN, R. J. (1998): «Distribution of *Xylella fastidiosa* in oaks in Florida and its association with growth decline in *Quercus laevis*»; *Plant Disease* (82); pp. 569-572.
- BERETTA, M. J. G.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C. M.; DERRICK, K. S.; BARTHE, G. A.; CECCARDI, T. L. *et al.* (1996): «First report of *Xylella fastidiosa* in coffee»; *Plant Disease* (80); p. 1.
- BOYHAN, G. E.; TANGSUKASEMSAN, B.; NORTON, J. D. y HIMELRICK, D. G. (1997): «Incidence of *Xylella fastidiosa* Wells *et al* on plum and peach in Alabama»; *Fruit Varieties Journal* (51); pp. 31-35.
- BRANNEN, P. M.; SCHERM, H. y CHANG, C. J. (2008): «Survey of cultivar differences in bacterial leaf scorch incidence among southern highbush blueberries»; *Dixie Blueberry News* (8); pp. 6-7.
- CDFA (2011): *Pierce's Disease control program, annual report to the Legislature*.
- CDFA (2016): *Galssy-Winged Sharpshooter Nursery Shipping Protocol*.

- CHANG, C. J.; DONALDSON, R.; BRANNEN, P.; KREWER, G. y BOLAND, R. (2009): «Bacterial leaf scorch, a new blueberry disease caused by *Xylella fastidiosa*»; *Hortscience* (44); pp. 413-417.
- CHEN, J.; CHANG, C. J.; JARRET, R. L. y GAWEL, N. (1992): «Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains»; *Phytopathology* (82); pp. 973-977.
- CHEN, J.; LAMIKANRA, O.; CHANG, C. J. y HOPKINS, D. L. (1995): «Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease and oak leaf scorch pathotypes»; *Applied and Environmental Microbiology* (61); pp. 1688-1690.
- COLETTA, H. D.; FRANCISCO, C. S.; LOPES, J. R. S.; MULLER, C. y ALMEIDA, R. P. P. (2017): «Homologous recombination and *Xylella fastidiosa* host-pathogen associations in south america»; *Phytopathology* (107); pp. 305-312.
- DAS, M.; BHOWMICK, T. S.; AHERN, S. J.; YOUNG, R. y GONZALEZ, C. F. (2015): «Control of Pierce's disease by phage»; *Plos One* (10).
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H. y THOMSON, S. V. (1978): «Pierce's disease of grapevines - isolation of causal bacterium»; *Science* (199); pp. 75-77.
- DUTCHER, J. D.; KREWER, G. W. y MULLINIX, B. G. (2005): «Imidacloprid insecticide slows development of phony peach and plum leaf scald»; *Horttechnology* (15); pp. 642-645.
- EFSA, P.O.P.H. (2015): «Scientific opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options»; *EFSA Journal* (13); pp. 3989-n/a.
- EFSA, P.O.P.H. (2016): «Four statements questioning the EU control strategy against *Xylella fastidiosa*»; *EFSA Journal* (14); pp. n/a-n/a.
- EJECUTIVO, P. (2015): «Declaratoria estado de emergencia fitosanitaria nacional por el incremento de la plaga conocida como *Xylella fastidiosa*»; en *Decreto Ejecutivo 39058*. Costa Rica, San José. Ejecutivo, E. E. P. ediciones.
- EVERT, D. R.; GAINES, T. P. y FRENCH, W. J. (1981): «Rickettsia-like bacteria in peach roots preceded development of visual symptoms of phony peach disease and changes in leaf elemental concentrations»; *Journal of the American Society for Horticultural Science* (106); pp. 780-782.
- FRENCH, W. J. y STASSI, D. L. (1978): «Response of phony-infected peach trees to gibberellic acid»; *Hortscience* (13); pp. 158-159.

- FRENCH, W. J. y KITAJIMA, E. W. (1978): «Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay»; *Plant Disease Reporter* (62); pp. 1035-1038.
- GARITA-CAMBRONERO, J.; VILLALOBOS, W.; GODOY, C. y RIVERA, C. (2008): «Hemipteran diversity (Cicadellidae and Clastopteridae) in three coffee production zones affected by *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*) in Costa Rica»; *Neotrop Entomol* (37); pp. 436-448.
- GIAMPETRUZZI, A.; SAPONARI, M.; LOCONSOLE, G.; BOSCIA, D.; SAVINO, V. N.; ALMEIDA, R. *et al.* (2017): «Genome-wide analysis provides evidence on the genetic relatedness of the emergent *Xylella fastidiosa* genotype in Italy to isolates from Central America»; *Phytopathology*.
- GOHEEN, A. C.; RAJU, B. C.; LOWE, S. K. y NYLAND, G. (1979): «Pierce's disease of grapevines in Costa Rica»; *Plant Disease Reporter* (63); p. 5.
- HARMON, P. F. y HOPKINS, D. L. (2009): «First report of bacterial leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa* on southern highbush blueberry in Florida»; *Plant Disease* (93); pp. 1220-1220.
- HARRIS, J. L.; DI BELLO, P. L.; LEAR, M. y BALCI, Y. (2014): «Bacterial leaf scorch in the district of columbia: distribution, host range, and presence of *Xylella fastidiosa* among urban trees»; *Plant Disease* (98); pp. 1611-1618.
- HEALTH, E.; PANEL O. P.; JEGER, M.; BRAGARD, C.; CAFFIER, D.; CHATZIVASSILIOU, E.; DEHNEN-SCHMUTZ, K. *et al.* (2016): Susceptibility of *Phoenix roebelenii* to *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal* (14); pp. e04600-n/a.
- HOLLAND, R. M. y SCHERM, H. (2012): «Xylem hydraulic conductance in southern highbush blueberry cultivars with different levels of field resistance to bacterial leaf scorch»; *Phytopathology* (102); pp. 54-55.
- HOPKINS, D.; HARMON, P. y BRANNEN, P. (2012): «Host range of *Xylella fastidiosa* strains that cause blueberry leaf scorch»; *Phytopathology* (102); pp. 55-55.
- HOPKINS, D. L. (1977): «Diseases caused by leafhopper-borne, rickettsia-like bacteria»; *Annual Review of Phytopathology* (15); pp. 277-294.
- HOPKINS, D. L. (1989): «*Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants»; *Annual Review of Phytopathology* (27); pp. 271-290.
- HOPKINS, D. L. (2005): «Biological control of Pierce's disease in the vineyard with strains of *Xylella fastidiosa* benign to grapevine»; *Plant Disease* (89); pp. 1348-1352.

- HOPKINS, D. L. y PURCELL, A. H. (2002): «*Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases»; *Plant Disease* (86); pp. 1056-1066.
- HOPKINS, D. L.; KIRKPATRICK, B.; HILL, B. L.; SMITH, R. y JOHNSON, D. (2010): «Biological control of pierce's disease of grapevine with benign strains of *Xylella fastidiosa*»; en *Pierce's Disease Control Program, Symposium Proceedings 2013*. Agriculture, C.D.o.F.a. ediciones CDFA; pp. 187-190.
- HUTCHINS, L. M. (1930): «The phony disease of the peach»; *Journal of Economic Entomology* (23); pp. 555-562.
- JAMES, J. F. (1892): *Book Reviews*.
- JEFFRIES, A. M. (2016): *Pierce's disease-resistant grapes coming soon*.
- KRUGNER, R. y LEDBETTER, C. A. (2016): «Rootstock effects on almond leaf scorch disease incidence and severity»; *Plant Disease* (100); pp. 1617-1621.
- LATHAM, A. J. y NORTON, J. D. (1980): «Incidence of plum leaf scald in Alabama»; *Alabama Agricultural Experiment Station Bulletin*; pp. 3-15.
- LIETH, J. H.; MEYER, M. M.; YEO, K. H. y KIRKPATRICK, B. C. (2011): «Modeling cold curing of Pierce's disease in *Vitis vinifera* 'Pinot noir' and 'Cabernet sauvignon' grapevines in California»; *Phytopathology* (101); pp. 1492-1500.
- LINDOW, S.; NEWMAN, K.; CHATTERJEE, S.; BACCARI, C.; LAVARONE, A. T. y IONESCU, M. (2014): «Production of *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor in transgenic grape causes pathogen confusion and reduction in severity of Pierce's disease»; *Molecular Plant-Microbe Interactions* (27); pp. 244-254.
- MCGOVERN, R. J. y HOPKINS, D. L. (1994): «Association of *Xylella fastidiosa* with leaf scorch and decline of live oak in Florida»; *Plant Disease* (78); pp. 924-924.
- MOLLER, W. J.; SANBORN, R. R.; MIRCETICH, S. M.; WILLIAMS, H. E. y BEUTEL, J. A. (1974): «Newly recognized and serious leaf scorch disease of almond»; *Plant Disease Reporter* (58); pp. 99-101.
- MONTERO-ASTUA, M.; CHACON-DIAZ, C.; AGUILAR, E.; RODRIGUEZ, C. M.; GARITA, L.; VILLALOBOS, W. *et al.* (2008): «Isolation and molecular characterization of *Xylella fastidiosa* from coffee plants in Costa Rica»; *J. Microbiol* (46); pp. 482-490.

- MONTERO-ASTÚA, M.; HARTUNG, J. S.; AGUILAR, E.; CHACÓN, C.; LI, W.; ALBERTAZZI, F. J. y RIVERA, C. (2007): «Genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from Costa Rica, São Paulo, Brazil, and United States»; *Phytopathology* (97); pp. 1338-1347.
- MONTERO-ASTÚA, M.; SABORÍO-R, G.; CHACÓN-DÍAZ, C.; VILLALOBOS, W.; RODRÍGUEZ, C. M.; MOREIRA, L. y RIVERA, C. (2008a): «First report of *Xylella fastidiosa* in *Nerium oleander* in Costa Rica»; *Plant Disease* (92); pp. 1249.
- MONTERO-ASTÚA, M.; SABORÍO-R, G.; CHACÓN-DÍAZ, C.; GARITA, L.; VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L. *et al.* (2008b): «First report of *Xylella fastidiosa* in avocado in Costa Rica»; *Plant Disease* (92); pp. 1.
- NEAL, D. C. (1920): «Phony peaches: a disease occurring in middle Georgia»; *Phytopathology* (10); pp. 106-U107.
- NUNNEY, L.; ORTIZ, B.; RUSSELL, S. A.; RUIZ SANCHEZ, R. y STOUTHAMER, R. (2014): «The complex biogeography of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*: genetic evidence of introductions and subspecific introgression in Central America»; *PLoS One* (9); pp. e112463.
- OLIVER, J. E.; COBINE, P. A. y DE LA FUENTE, L. (2015): «*Xylella fastidiosa* Isolates from Both subsp multiplex and fastidiosa Cause Disease on Southern Highbush Blueberry (*Vaccinium* sp.) Under Greenhouse Conditions»; *Phytopathology* (105); pp 855-862.
- OLIVER, J. E.; SEFICK, S. A.; PARKER, J. K.; ARNOLD, T.; COBINE, P. A. DE LA FUENTE, L. (2014): «Ionome changes in *Xylella fastidiosa*-infected *Nicotiana tabacum* correlate with virulence and discriminate between subspecies of bacterial isolates»; *Molecular Plant-Microbe Interactions* (27); pp. 1048-1058.
- PARKER, J. K.; HAVIRD, J. C. y DE LA FUENTE, L. (2012): «Differentiation of *Xylella fastidiosa* strains via multilocus sequence analysis of environmentally mediated genes (MLSA-E)»; *Applied and Environmental Microbiology* (78); pp. 1385-1396.
- PIERCE, N. B. (1892): *The California Vine Disease*. Washington Division of Vegetable Pathology, U.S. Department of Agriculture
- PURCELL, A. (2013): «Paradigms: examples from the bacterium *Xylella fastidiosa*»; *Annual Review of Phytopathology* 51(51); pp. 339-356.

- PURCELL, A. H. (1977): «Cold therapy of Pierce's disease of grapevines»; *Plant Disease Reporter* (61); pp. 514-518.
- PURCELL, A. H.; SAUNDERS, S. R.; HENDSON, M.; GREBUS, M. E. y HENRY, M. J. (1999): «Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease»; *Phytopathology* (89); pp. 53-58.
- RANDALL, J. J.; FRENCH, J.; YAO, S.; HANSON, S. F. y GOLDBERG, N. P. (2011): First report of *Xylella fastidiosa* in peach in New Mexico. *Plant Disease* 95: 871-872.
- RIAZ, S.; TENSCHER, A. C.; GRAZIANI, R.; KRIVANEK, A. F.; RAMMING, D. W. y WALKER, M. A. (2009): «Using marker-assisted selection to breed pierce's disease-resistant grapes»; *American Journal of Enology and Viticulture* (60); pp. 199-207.
- RODRIGUEZ, C. M.; OBANDO, J. J.; VILLALOBOS, W.; MOREIRA, L. y RIVERA, C. (2001): «First report of *Xylella fastidiosa* infecting coffee in Costa Rica»; *Plant Disease* (85); p. 1.
- SANDERLIN, R. S. (2017): «Host specificity of pecan strains of *Xylella fastidiosa* subsp. *multplex*»; *Plant Disease* (101); pp. 744-750.
- SANDERLIN, R. S. y HEYDERICH-ALGER, K. I. (2000): «Evidence that *Xylella fastidiosa* can cause leaf scorch disease of pecan»; *Plant Disease* (84); pp. 1282-1286.
- SANDERLIN, R. S. y HEYDERICH-ALGER, K. I. (2003): «Effects of pecan bacterial leaf scorch on growth and yield components of cultivar Cape Fear»; *Plant Disease* (87); pp. 259-262.
- SANDERLIN, R. S. y MELANSON, R. A. (2006): «Transmission of *Xylella fastidiosa* through pecan rootstock»; *Hortscience* (41); pp. 1455-1456.
- SANDERLIN, R. S. y MELANSON, R. A. (2008): «Reduction of *Xylella fastidiosa* transmission through pecan scion wood by hot-water treatment»; *Plant Disease* (92); pp. 1124-1126.
- SISTERSON, M. S.; LEDBETTER, C. A.; CHEN, J. C.; HIGBEE, B. S.; GROVES, R. L. y DAANE, K. M. (2012): «Management of almond leaf scorch disease: long-term data on yield, tree vitality, and disease progress»; *Plant Disease* (96); pp. 1037-1044.

- SOLÓRZANO, A.; LEÓN, R. y GARBANZO, M. (2001): «Determinacion del agente causal y evaluacion del efecto en la produccion causado por la crespita en el cultivo de café (*Coffea arabica*) en la zona de Los Santos, Costa Rica»; en *Protección de Cultivos, Dirección de Investigaciones Agropecuarias*. Ministerio de Agricultura y Ganadería; pp. 128-133.
- STONER, W. N. (1953): «Leafhopper transmission of a degeneration of grape in Florida and its relation to Pierce's Disease»; *Phytopathology* (43); pp. 611-615.
- TERTULIANO, M.; SRINIVASAN, R. y SCHERM, H. (2012): «Settling behavior of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca vitripennis*, vector of *Xylella fastidiosa*, on southern highbush blueberry cultivars»; *Entomologia Experimentalis Et Applicata* (143); pp. 67-73.
- TUMBER, K. P.; ALSTON, J. M. y FULLER, K. B. (2014): «Pierce's disease costs California \$104 million per year»; *California Agriculture* (68); pp. 20-29.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H. Y.; WEISBURG, W. G.; MANDELCO PAUL, L. y BRENNER, D. J. (1987): «*Xylella fastidiosa* gen-nov, sp-nov - gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp.»; *International Journal of Systematic Bacteriology* (37); pp. 136-143.
- WICHMAN, R. L. y HOPKINS, D. L. (2002): «Differentiation of pathogenic groups of *Xylella fastidiosa* strains with whole-cell protein profiles»; *Plant Disease* (86); pp. 875-879.

Xylella fastidiosa en Brasil

Edson Bertolini^a, Silvio Lopes^b y Luís Otávio Saggion Beriam^c

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul (Brasil, RS, Porto Alegre),

^bFundo de Defesa da Citricultura-Fundecitrus (Brasil, RS, Araraquara)

^cInstituto Biológico (Brasil, RS, Campinas)

1. Introducción

Xylella fastidiosa es una bacteria limitada al xilema que infecta un gran número de especies vegetales, incluyendo plantas cultivadas de interés agronómico, plantas ornamentales, silvestres y malas hierbas (Hopkins y Adlerz, 1988; Lopes *et al.*, 2003). En algunas especies está asociada a enfermedades que causan grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Además, está presente en una amplia gama de hospedadores sin causar ninguna enfermedad conocida (Schneider y Azevedo-Filho, 2014). La primera enfermedad importante causada por *X. fastidiosa* fue en el cultivo de la vid, siendo conocida como la enfermedad de Pierce, que es un factor limitante de la producción de *Vitis labrusca* y *V. vinifera* en EEUU. En América, además de en EEUU, está presente en México, Costa Rica, Venezuela y probablemente en otros países de América Central y los del norte de América del Sur donde los vectores están presentes (Goheen y Hopkins, 2007). Esta bacteria que es transmitida por distintas especies de cicadélidos, está descrita en varias especies vegetales en Brasil, siendo muchas de ellas malas hierbas o cultivos sin demasiado interés comercial; sin embargo, es el agente causal de enfermedades muy importantes en cultivos estratégicos, causando pérdidas en la producción y teniendo efectos económicos muy importantes.

Las enfermedades más graves causadas por *X. fastidiosa* en Brasil son la clorosis variegada de los cítricos (CVC) y la atrofia de los ramos del cafeto, dos cultivos estratégicos y las principales *commodities* del agronegocio brasileño. Además de causar enfermedades en cítricos y plantas de café, también está descrita en ciruelo, donde es factor limitante del cultivo, y recientemente se ha descrito en olivo causando una gran preocupación en el sector de este cultivo, típicamente Mediterráneo, pero con gran potencial de expansión en el sur de Brasil.

A continuación, se abordarán aspectos relacionados con la sintomatología, pérdidas, transmisión y control de las principales enfermedades causadas por *X. fastidiosa* en cítricos, café, ciruelos y olivo en Brasil.

2. *Xylella fastidiosa* en cítricos

En Brasil el cultivo de los cítricos, en concreto del naranjo, abastece el mercado interno de frutas frescas, y también el mercado externo de zumo. Por esto, el sector citrícola es una importante fuente de empleos y renta. Solamente en el estado de São Paulo (SP), donde se encuentra la mayor zona productora citrícola del país, actualmente se cultivan 174,8 millones de naranjos en edad productiva, ocupando un área de aproximadamente 385,5 mil hectáreas, y con una producción prevista para la cosecha 2017-2018 de 364,5 millones de cajas de 40,8 kg (<http://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>).

Desde hace décadas Brasil produce gran parte de todo el zumo consumido en el mundo, y su importancia en el escenario internacional ha aumentado aún más en los últimos años a causa de la drástica reducción en la producción en Florida (EEUU), por el aumento en la incidencia del *huanglongbing* (HLB) o *greening* de los cítricos.

Sin embargo, el importante patrimonio socioeconómico brasileño que representan las extensas áreas cultivadas con cítricos estuvo, en la opinión de algunos especialistas, amenazado, después de la confirmación de la ocurrencia en naranjos de la bacteria *X. fastidiosa* (Rosseti *et al.*, 1990). Esta bacteria causa la enfermedad conocida en Brasil por los productores como «amarelinho», y CVC en los textos científicos. El temor fue ocasionado principalmente por los graves daños causados a los naranjos infectados y por la rapidez con la que la incidencia de plantas enfermas aumentaba en el campo.

La CVC es una enfermedad típica de naranjos (Laranjeira *et al.*, 1998 y García *et al.*, 2012); no afecta a limas, mandarinos ni limoneros. Al colonizar el xilema, la bacteria se redistribuye en sectores por todo el árbol. El tiempo necesario para la colonización de toda la copa dependerá principalmente de la edad y del porte del árbol desde que ocurrió la infección inicial. Observaciones de campo indican que la colonización es más rápida en árboles jóvenes de hasta tres años. Durante el proceso de colonización se observa la obstrucción de los haces del xilema (Queiróz-Voltan y Paradela Filho, 1999, García *et al.*, 2012) y el consecuente bloqueo del flujo de agua y sales minerales, que acaba comprometiendo el crecimiento del árbol.

Como consecuencia del bloqueo de la savia, el árbol manifiesta síntomas de deficiencia hídrica, amarilleo variegado en las hojas (Figura 1), reducción del tamaño (Figura 2) y calidad gustativa de los frutos y con el paso de los años, también reducción del número de frutos producidos (Ayres, 2000). Los frutos de los árboles infectados quedan endurecidos, son más pequeños y con hasta 75 % menos de masa que los frutos producidos por plantas sanas o por las partes del árbol aún no infectadas por la bacteria (Ayres 2000). El menor tamaño de los frutos lleva a la reducción en la cantidad de zumo, haciéndolo más rico en azúcares, pero más ácido que el de los árboles sanos (Laranjeira y Palazzo, 1999). Los frutos de menor tamaño también son menos atractivos para los consumidores, y además causan daño a los aparatos extractores de zumo.

Figura 1. Síntomas de CVC en hojas de naranjo



Si son manejados (agua, abono, podas, etc.) adecuadamente, los árboles afectados por la CVC no mueren, pero dejan de ser rentables económicamente en un período que varía de acuerdo con la edad en que el árbol fue infectado. Los árboles jóvenes quedan inviables económicamente más rápidamente que los árboles adultos. Las pérdidas son menores en regiones donde las temperaturas no son muy altas y las lluvias están distribuidas más regularmente a lo largo de las estaciones (Ayres, 2000 y Laranjeira *et al.*, 2003).

Figura 2. Síntomas de CVC en frutos y hojas de naranjo



La naturaleza fastidiosa de la bacteria *X. fastidiosa* hizo que se retrasara su asociación con la nueva enfermedad de los naranjos, y su confirmación no tuvo lugar hasta 1993 (Chang *et al.*, 1993), cinco años después de la primera descripción de los síntomas en el norte de la región productora en el estado de São Paulo (Rosseti *et al.*, 1990). A partir de 1993, las investigaciones avanzaron mucho, y se generaron informaciones muy relevantes sobre los diversos aspectos de la enfermedad, lo que ha permitido el desarrollo y la optimización de prácticas efectivas de control. La CVC está causada por distintos grupos genéticos (o STs 'sequence type' en inglés) de *X. fastidiosa* subsp. *pauciflora*.

El descubrimiento de que la CVC estaba causada por una bacteria presente en el xilema y transmitida por insectos (Roberto *et al.*, 1996), ha estimulado a los productores a ensayar distintos procedimientos y productos químicos con el objetivo de sanar la planta enferma. En este sentido se ha destacado la poda de ramos infectados con síntomas (Rodas, 1994). Sin embargo, se verificó que la poda únicamente era efectiva si era realizada en árboles adultos (más de tres años de edad) y si el árbol infectado estaba en el estadio inicial de la manifestación de los síntomas, o sea, con hojas sintomáticas solamente en uno de los ramos secundarios de la copa. En todas las demás situaciones, la práctica de la poda no era efectiva, siendo necesario eliminar el árbol para reducir la fuente de inóculo. De esta forma la poda y/o la eliminación de ár-

boles enfermos se ha demostrado como una de las tres medidas cruciales para el control de la enfermedad.

El conocimiento de que *X. fastidiosa* era transmitida por insectos también propició importantes avances en las investigaciones sobre la transmisión y diseminación de la bacteria en los huertos de cítricos. Se ha demostrado que la transmisión es realizada por diversas especies de cicadélidos que se alimentan del xilema (Krüchner *et al.*, 1998) y se da, de forma más o menos eficiente, después de cortos períodos de alimentación del insecto (Miranda, 2008). Las principales especies de cicadélidos transmisores de la bacteria en Brasil y su eficacia de transmisión son: *Macugonalia leucomelas* (17,3 %), *Bucephalogonia xanthophis* (12,8 %), *Dilobopterus costalimai* (5,5 %), *Plesiommatia corniculata* (2,9 %), *Parathona gratiosa* (2,8 %), *Acrogonia citrina* (2,3 %), *Ferrariana trivittata* (1,9 %), *Oncometopia facialis* (1,3 %), *Sonesimia grossa* (1,2 %), *Homalodisca ignorata* (0,5 %), *Acrogonia virescens* (0,3 %), *Fingeriana dubia* (poco eficiente) (Anónimo, 2007). Aunque los cicadélidos sean frecuentes en regiones y períodos más calurosos del año, estos pueden ser encontrados durante todo el año en los huertos, en cítricos (Yamamoto *et al.*, 2001) y en otros cultivos como ciruelos y cafeto (Lopes y Giustolin, 2000, Azevedo *et al.*, 2016), en malas hierbas presentes en el cultivo (Gravena *et al.*, 1998), o en otras especies de arbustos y árboles de zonas forestales próximas al cultivo (Lopes y Giustolin, 2000). Sin embargo, estas especies no son buenas hospedadoras de la bacteria que causa la CVC (Lopes *et al.*, 2004, Prado *et al.*, 2008, S.A. Lopes, datos no publicados) y probablemente, no sean importantes como fuentes de inóculo para los cítricos.

La confirmación de que los cicadélidos estaban involucrados en la diseminación de la CVC y que estaban ampliamente distribuidos en las fincas, contribuyó al desarrollo e implementación de la segunda medida de control para contener el avance de la enfermedad, que es la producción bajo malla de plantones. De esta forma, los plantones están protegidos de los vectores y consecuentemente libres de la bacteria, hasta el momento de ser llevados a campo. Esta medida es obligatoria por ley desde 2003 en el estado de São Paulo, y sustituyó el modelo de producción de plantones al aire libre vigente hasta entonces. El sistema de viveros protegidos resultó altamente eficiente, no solo para la producción de plantones libres de enfermedades, sino también para la producción de plantones más vigorosos y genéticamente uniformes, contribuyendo a la mejora de la citricultura en São Paulo.

El conocimiento de que distintos cicadélidos de la familia Cicadellidae estaban involucrados en la diseminación de *X. fastidiosa* también llevó a importantes ajustes en las aplicaciones de tratamientos químicos, que hasta entonces eran utilizados básicamente para el control de pulgones (*Toxoptera citricida*, *Aphis* spp.) y el minador de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*). Fueron testados varios productos y establecidas las formas y épocas más propicias de aplicación y de acuerdo con las diferentes edades de la planta (Yamamoto, 2008). Insecticidas sistémicos son aplicados vía *drench* y/o directamente en el tronco de plántones y árboles jóvenes (hasta cerca de 3 años) y se usan productos de contacto en pulverizaciones de las copas de árboles jóvenes y adultos. En este último caso, la eficiencia mejora si las aplicaciones son realizadas basadas en el nivel de incidencia de los vectores en el campo. En este sentido, se ha conseguido reducir la dosis y el volumen de productos aplicados (Scardelato, 2013), debido también a las investigaciones llevadas a cabo sobre el control del psílido *Diaphorina citri* vector de las bacterias que causan la enfermedad del HLB.

Según lo mencionado anteriormente, prácticas importantes para la contención del avance de la CVC fueron desarrolladas a lo largo de los años. Como ocurre con cualquier enfermedad diseminada por insectos altamente prolíficos, eficientes y ampliamente distribuidos en el espacio y en el tiempo, el éxito en el control solo es obtenido si todas las prácticas son adoptadas de manera rigurosa, coordinada y realizada por todos los productores de una zona.

El desconocimiento inicial de la causa y forma de diseminación de la CVC y la no participación y escaso interés de los productores contribuyeron a que la enfermedad fuera diseminada por toda la citricultura de São Paulo. Las pérdidas fueron estimadas en más de 100 millones de dólares anuales (Lopes *et al.*, 2004). La enfermedad también se diseminó y empezó a causar pérdidas significativas en otras importantes regiones productoras de naranjos en Brasil. Cabe resaltar, sin embargo, que en el estado de São Paulo, la incidencia de árboles con síntomas, que durante los años 2003 a 2009 se mantenía por encima del 42 %, ha descendido a niveles de apenas 3 % en 2016 (Anónimo, 2016).

Las razones para la significativa disminución en la incidencia de la CVC en el estado de São Paulo son diversas, pero lo que ha causado más impacto parece haber sido el rigor en el control químico de los vectores y la eliminación de árboles enfermos en grandes áreas adyacentes. Con la detección del HLB en 2004 (Colleta Filho *et al.*, 2004 y Teixeira *et al.*, 2005), el control químico del psílido vector de esta enfermedad ha sido adoptado de forma

coordinada y a gran escala, auxiliado por un sistema regional de monitoreo de *D. citri* en los huertos, organizado por Fundecitrus (<http://www.fundecitrus.com.br/alerta-fitossanitario>). Como la ocurrencia del psílido *D. citri* coincide en muchos casos con la ocurrencia de cicadélidos vectores de *X. fastidiosa*, las acciones de combate frente a los psílicos deben estar impactando también al control de los cicadélidos.

Como conclusión, la CVC, que hasta hace pocos años era la principal causa de pérdidas en la producción de naranjos en Brasil, llevando a la erradicación de más de 100 millones de árboles desde su primera descripción (Anónimo, 2016), hoy no es una preocupación importante, causando solamente pérdidas despreciables en la producción. Favorecido su control por las agresivas acciones tomadas frente a un problema todavía más grave (el HLB), la CVC tuvo su incidencia reducida en más de 10 veces en pocos años. Se espera, por tanto, que mientras dure el esfuerzo de los productores en controlar el HLB, con las mismas armas antes utilizadas solamente para la CVC, la incidencia de esta enfermedad se mantenga baja, sin causar los abultados daños mencionados anteriormente.

3. *Xylella fastidiosa* en cafeto

El cafeto, así como los cítricos, es una de las principales *commodities* brasileñas, generando más de 300.000 empleos. Brasil es el principal productor mundial, exportando en 2016 más de 30 millones de bolsas de 60 kg, generando unos beneficios por encima de los 5.000 millones de dólares (Cecafé, 2017). En el cafeto, la bacteria *X. fastidiosa* fue descrita por primera vez en 1995 (Paradela *et al.*, 1997) asociada a síntomas que colectivamente fueron denominados «atrofia dos ramos do cafeeiro» o ARC (Beriam y Paradela Filho, 2003; Malavolta *et al.*, 2008). Como en los cítricos, la transmisión de la bacteria ocurre por cicadélidos, y no hay ninguna evidencia de transmisión por semillas (Yorinori *et al.*, 2000). La atrofia de los brotes del cafeto está causada por distintos grupos genéticos de *X. fastidiosa* subsp. *pauca*.

Los síntomas en las plantas infectadas son entrenudos cortos, similares a los de deficiencia de zinc, con la presencia de un enmarañado de hojas pequeñas y malformadas en las extremidades, pudiendo o no presentar síntomas de deficiencias minerales. En plantaciones conducidas de manera inadecuada, las hojas también pueden presentar quema de los bordes, similares a los causados por deficiencia de potasio. Con la evolución de los síntomas, hay caída de ho-

jas y seca de los brotes (Figura 3). En plantas severamente afectadas los brotes llegan a tener el doble de entrenudos que los brotes normales (Figura 4). En el tejido interno de las hojas puede haber acúmulo de cristales de oxalato de calcio y reducción del número de cloroplastos (Queiróz-Voltan *et al.*, 1998). La bacteria causa bloqueo parcial de los haces del xilema, con los estreses hídricos o de otra naturaleza pudiendo incrementar los síntomas en las plantas.

Figura 3. Síntomas de caída de hojas y seca de los brotes de cafeto



Fuente: foto de Paradelo Filho.

Se desconoce el nivel de daño que *X. fastidiosa* causa en el cultivo del cafeto. Eso es debido a la inespecificidad de los síntomas que, a su vez, dificultan la estimación de las pérdidas. Además, la bacteria es detectada también en plantas sin ningún tipo de síntoma. Experimentos llevados a cabo por Rocha *et al.* (2006), indicaron que un aumento de solamente 1 % en la incidencia de la enfermedad, causa una pérdida de hasta 1,28 bolsas (60 kg) de café por hectárea, evidenciando la importancia de la enfermedad, que está presente en todas las regiones productoras de café de Brasil.

Figura 4. Síntomas de entrenudos cortos en brotes de cafeto severamente afectados



Fuente: foto de Paradela Filho.

La presencia de *X. fastidiosa* en árboles de cafeto localizados en regiones distantes del cultivo de cítricos y el hecho de que en ambas bacteriosis las estirpes o cepas de *X. fastidiosa* son transmitidas por las mismas especies de cicadélidos, han levantado sospechas que la bacteria se haya originado en cafeto y pasado a los cítricos. Si tal hipótesis fuera cierta, se esperarían niveles similares de susceptibilidad en ambos hospedadores a ambas estirpes. Sin embargo, en combinaciones cruzadas, la infección no se ha dado o ha sido transitoria (Prado *et al.*, 2008). Las prospecciones de campo también evidenciaron que no había transmisiones cruzadas, reforzando la alta especificidad natural de ambas estirpes por sus respectivos hospedadores (Lopes *et al.*, 2003).

Al contrario de lo que ocurre en cítricos, la inespecificidad de los síntomas y el desconocimiento de los daños que *X. fastidiosa* puede causar en cafeto, ha limitado la adopción de medidas de control específicas contra la enfermedad.

Experimentos de poda parcial fueron conducidos en árboles de cafeto del cultivar arábica, pero han sido ineficaces (Queiróz-Voltan *et al.*, 2007). Aun así, se recomienda la aplicación de insecticidas, para mantener bajo control las poblaciones de cicadélidos. Otras medidas generales de control que tratan de minimizar los daños incluyen el aumento del número de árboles por área y las aplicaciones de abonos orgánicos.

4. *Xylella fastidiosa* en ciruelo

El cultivo del ciruelo en Brasil tiene una gran importancia económica, principalmente en los estados del sur del país. Sin embargo, únicamente se produce el 10 % de la cantidad necesaria para el consumo interno, siendo el 90 % importado de otros países, principalmente de Argentina y Chile (Madail *et al.*, 2007). Los principales estados productores son Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Paraná y Minas Gerais (Castro *et al.*, 2008). Según Eidam *et al.* (2012), Rio Grande do Sul destaca como el primer productor nacional con cerca de 12.200 toneladas al año, aunque el estado de Santa Catarina es el que posee la mayor área cultivada, ocupando 1.338 ha, seguido por Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais (Castro y Madail, 2011). En Brasil se cultivan una gran variedad de cultivares siendo las especies europeas (*Prunus domestica*) y japonesas (*P. salicina*) las más importantes (Dalbó *et al.*, 2010).

Aunque en Brasil se dan las condiciones climáticas adecuadas y se han desarrollado varios cultivares adaptados a las diferentes regiones de producción, el principal factor limitante a la expansión del cultivo es la enfermedad del escaldado de las hojas del ciruelo (EHC), o *plum leaf scald* (PLS) en inglés, causado por la bacteria *Xylella fastidiosa* (Müller, 2013). A diferencia de la clorosis variegada de los cítricos y de la atrofia de los brotes del cafeto que son causadas únicamente por *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, el escaldado de las hojas del ciruelo esta causado por distintos grupos genéticos de la subsp. *multiplex* (Coletta-Filho *et al.*, 2016). La primera detección del EHC fue en Argentina en el año 1935 (Fernandez-Valiela, 1954). En Brasil fue detectado por primera vez en 1978 en la ciudad de Cascata, Rio Grande do Sul, en ciruelos europeos y japoneses (French y Kitajima 1978). En la actualidad la enfermedad es endémica en gran parte de las regiones productoras y la principal causa de la reducción de las plantaciones desde la década de 1970 (Müller, 2013). Los síntomas de la enfermedad pueden tardar meses en aparecer tras la infección

de la bacteria y la propagación de material asintomático infectado fue la principal causa de diseminación de *X. fastidiosa* (Castro, 2010).

El escaldado de la hoja del ciruelo es una enfermedad que presenta síntomas mal distribuidos, tanto en los brotes y hojas del mismo árbol, como en los distintos árboles dentro del mismo huerto (Schneider y Azevedo, 2014). Los primeros síntomas de la bacteriosis se observan en los meses de enero y febrero (verano en Brasil) y consisten en el amarilleo de los bordes de las hojas adultas, que evolucionan a necrosis y terminan con la caída de la hoja (Figura 5). La parte de transición entre las zonas sanas e infectadas de las hojas presenta color amarillo mientras que la parte necrosada presenta coloración gris a marrón oscuro con aspecto de escaldado como si hubiera sido quemada por el fuego, lo que da nombre a la enfermedad. Con el avance de los síntomas, se observan, además de la disminución de la producción, la seca de brotes e incluso la muerte del árbol (Schneider y Azevedo, 2014). Según Ducroquet *et al.* (2001), apenas tres a cinco años tras la observación de los primeros síntomas, la plantación puede ser ya improductiva.

Figura 5. Síntomas de escaldado en hojas de ciruelo



Fuente: foto de G. Marodin.

La diseminación de la bacteria se da principalmente por material de propagación contaminado y por insectos vectores (Ducroquet *et al.*, 2001). La transmisión por instrumentos de poda no ha podido ser demostrada experimentalmente (Schneider y Azevedo, 2014). Los cicadélidos de la familia Cicadellidae) son también los principales vectores de la bacteria en ciruelo. En total, 39 especies encontradas en Brasil y EEUU pueden transmitir la bacteria (Redak *et al.*, 2004). Se han realizado tests ELISA en cicadélidos encontrados en campos de ciruelo y se ha detectado la bacteria en las especies *Plesiommata corniculata* (Walker), *Hortensia similis* (Walker), *Haldorus* sp. (Stal) y *Macugnalia leucomelas* (Walker) (Azevedo-Filho *et al.*, 2011). Sin embargo, no hay estudios que demuestren que estos cicadélidos sean realmente transmisores de la bacteria.

No hay muchos trabajos sobre el manejo y control de la enfermedad. La utilización de material de propagación certificado libre de la bacteria y la eliminación de plantas infectadas son las principales medidas utilizadas en Brasil. La gran mayoría de cultivares comerciales son altamente susceptibles a la bacteria y solo unos pocos cultivares de interés presentan cierta resistencia. En trabajos de mejora realizados en la «Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)», se han obtenido materiales con buenas características comerciales y con cierta resistencia, incluso se han encontrado algunos que parecen ser inmunes a la bacteria y con buenas características agronómicas (Dalbó *et al.*, 2010).

5. *Xylella fastidiosa* en olivo

El cultivo del olivo en Brasil está limitado a los estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul. En 2017, el área plantada se acerca a las 4.000 ha, de las cuales aproximadamente 2.000 ha están en Minas Gerais y 1.500 ha en Rio Grande do Sul. La mayoría de los olivares son muy jóvenes y están en fase de formación. Según investigaciones realizadas por la EMBRAPA, el estado de Rio Grande do Sul tiene un enorme potencial para el cultivo, principalmente por la calidad del clima y del suelo. Según estos trabajos hay más de 1 millón de ha apropiadas para el cultivo del olivo. Los principales problemas fitosanitarios del olivo en Brasil son los hongos, aunque recientemente se ha descrito también la presencia de la bacteria *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Coletta-Filho *et al.*, 2016).

En 2014 olivos con síntomas de quemado de las hojas y decaimiento, idénticos a los descritos en Italia (ver capítulo 10), han sido observados en la Serra da Mantiqueira en los municipios de Maria da Fé en Minas Gerais y São Bento do Sapucaí en São Paulo. Análisis moleculares de muestras con síntomas han demostrado que estaban infectados por la bacteria *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, la misma especie encontrada en cítricos y cafeto. Además, la bacteria ha podido ser cultivada y las colonias presentaron las características morfológicas típicas de *X. fastidiosa*. Como en la región donde fue detectado el quemado de las hojas en olivo también se cultiva cafeto, probablemente la bacteria haya sido transmitida por cicadélidos vectores del cafeto al olivo (Coletta-Filho *et al.*, 2016). Hasta la fecha no se han observado síntomas de esta enfermedad, ni tampoco se ha detectado la bacteria en otras zonas de cultivo en Brasil. Sin embargo, el quemado o escaldado de las hojas del olivo asociado a la presencia de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* también ha sido detectado en olivos en Argentina (Haelterman *et al.*, 2015).

Referencias bibliográficas

- ANÓNIMO (2007): *Manual Técnico de CVC*. Araraquara, SP. Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Disponible en http://www.citrusbr.com/manuaistecnicos/fundecitrus_cvc.pdf; acceso en 25/09/2017.
- ANÓNIMO (2016): «Desafio superado»; en *Revista Citricultor*. Araraquara, SP. Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Disponible en <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/revistas>; acceso en 25/09/2017. pp. 7-10.
- AYRES, A. J. (2000): «Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro»; *Dissertação de mestrado*. Brasil, Jaboticabal, SP. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- AZEVEDO FILHO, W. S.; TOLOTTI, A.; CARVALHO, G. S.; MÜLLER, C.; BOTTON, M. y LOPES, J. R. S. (2016): *Guia ilustrado cigarrinhas na cultura da ameixeira*. Pelotas. 1ª. edición. RS: USEB; pp. 135.
- AZEVEDO FILHO, W. S.; PALADINI, A.; BOTTON, M.; CARVALHO, G. S.; RINGENBERG, R. y LOPES, J. R. S. (2011): «Manual de identificação de cigarrinhas em videira»; *Embrapa Informação Tecnológica*. Brasil, Brasília.

- BERIAM, L. O. S. y PARADELA FILHO, O. (2003): *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. p. 281-293. En: Zambolim, L. (ed.), Tecnologia de produção de café com qualidade. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- CASTRO, L. A. S. (2010): «Protocolo para diagnóstico de escaldadura das folhas da ameixeira»; *Documento* (324). Brasil, Pelotas. Embrapa Clima Temperado.
- CASTRO, L. A. S. y MADAIL, J. C. M. (2011): *Ameixa: pólos de produção*. Agência Embrapa de informação tecnológica. www.agencia.cnptia.embrapa.br; acceso en 29/04/2017.
- CASTRO, L. A. S.; NAKASU, B. H. y PEREIRA, J. F. M. (2008): «Ameixeira: histórico e perspectivas do cultivo»; *Circular técnica* (70). Brasil, Pelotas. Embrapa Clima Temperado.
- CECAFÉ (CONSELHO DE EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL): *Relatório mensal, março de 2017*. Disponible en <https://www.slideshare.net/luizvaleriano/cecafe-relatorio-mensal-marco-2017>; acceso en 02/03/2017.
- CHANG, C. J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V. y BOVÉ, J. M. (1993): «Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*»; *Curr. Microbiol.* (27); pp. 137-142.
- COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU, JÚNIOR, J.; MACHADO, M. A.; DO AMARAL, A. M. y MULLER, G. W. (2004): «First report of the causal agente of huanglongbing '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Brazil»; *Plant Dis.* (88); pp. 1382.
- COLETTA-FILHO, H.; FRANCISCO, C. S.; LOPES, J. R. S.; DE OLIVEIRA, A. F. y DA SILVA, L. F. O. (2016): «First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*»; *Phytopathol. Mediterran.* (55); pp. 130-135.
- DALBÓ, M. A.; KLABUNDE, G. H. F.; NODARI, R. O.; FERNANDES, D. y BASO, M. F. (2010): «Evolution of the response of segregation populations of plums and the association with microsatellite markers of leaf scald»; *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* (10); pp. 337-344.
- DUCROQUET, J. P. H. J.; ANDRADE, E. R. y HICKEL, E. R. (2001): «A escaldadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina»; *Boletim Técnico* (180). Brasil, Florianópolis. EPAGRI.

- EIDAM, T.; PAVANELLO, A. P. y AYUB, R. A. (2012): «A ameixeira no Brasil»; *Rev. Brasil. Fruticult.* (34); pp. 001-319.
- FERNÁNDEZ-VALIELA, M. V. y BAKARCIC, M. (1954): «Nuevas enfermedades del ciruelo en el delta del Paraná, Argentina»; *Informativo Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* (84); pp. 2-6.
- FRENCH, W. J. y KITAJIMA, E.W. (1978): «Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay»; *Plant Dis. Rep.* (62); pp. 1035-1038.
- GARCÍA, A. L.; TORRES, S. C. Z.; HEREDIA, M. y LOPES, S. A. (2012): «Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection»; *Plant Dis.* (96); pp. 1245-1249.
- GOHEEN, A. C. y HOPKINS, D. L. (2007): «Enfermedad de Pierce»; en *Plagas y Enfermedades de la vid.* Madrid Mundi-Prensa. The American Phytopathological Society; pp. 44-45.
- GRAVENA, S.; LOPES, J. R. S.; PAIVA, P. E. B.; YAMAMOTO, P. T. y ROBERTO, S.R. (1998): «The *Xylella fastidiosa* vectors»; en DONADIO, L. C. y MOREIRA, C. S.: *Citrus Variegated Chlorosis*. Brasil, Bebedouro, SP; pp. 36-53.
- HAELTERMAN, R. M.; TOLOCKA, P. A.; ROCA, M. E.; GUZMÁN, F. A.; FERNÁNDEZ, F. D. y OTERO, M.L. (2015): «First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina»; *J. Plant Pathol.* (97); pp. 393.
- HOPKINS, D. L. y ADLERZ, W. C. (1988): «Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida»; *Plant Dis.* (72); pp. 429-431.
- KRÜGNER, R.; LOPES, M. T. V. C.; SANTOS, J. S.; BERETTA, M. J. G. y LOPES, J. R. S. (1998): «Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species»; *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.* 14th. Brasil; pp. 81.
- LARANJEIRA, F. F. y PALAZZO, D. (1999): «Danos qualitativos à produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros»; *Laranja* (20); pp. 77-91.
- LARANJEIRA, F. F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. y LOPES, J. R. S. (2003): «Comportamento sazonal da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo»; *Fitopatol. Basil* (28); pp. 633-641.
- LARANJEIRA, F. F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAVA, R.; FIGUEIREDO, J. O.; CARVALHO, S. A. y COLETTA FILHO, H. D. (1998): «Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo»; *Fitopatol. Basil* (23); pp. 47-154.

- LOPES, J. R. S. y GIUSTOLIN, T. A. (2000): «Outros hospedeiros de cigarrinhas»; *Revista do Fundecitrus* (79); pp. 14.
- LOPES, S. A.; MARCUSSI, S.; TORRES, S. C. Z.; SOUZA, V.; FAGAN, C.; FRANÇA, S. C.; FERNANDES, N. G. y LOPES, J. R. S. (2003): «Weeds as alternative hosts of the citrus, coffee, and plum strains of *Xylella fastidiosa* in Brazil»; *Plant Dis.* (87); pp. 544-549.
- LOPES, S. A.; LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L. y BERGAMIN FILHO, A. (2004): «Clorose variegada: perdas anuais de US\$ 100 milhões»; *Visão Agrícola* (1); pp. 20-23.
- MADAIL, J. C. M.; BELARMINO, L. C. y NEUTZLING, D. M. (2007): «Custo de produção da ameixa, um caso da Serra Gaúcha»; *Comunicado Técnico* (157). Brasil. Pelotas. Embrapa Clima Temperado.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J. y ROBBS, C. F. (2008): «Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização»; *Summa Phytopathologica* (34); pp. 1-88.
- MIRANDA, M. P. (2008): «Caracterização do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) em citros e suas implicações na transmissão de *Xylella fastidiosa*»; *Tese de doutorado*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; pp. 87.
- MÜLLER, C. (2013): «*Xylella fastidiosa* da ameixeira: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras»; *Tese de doutorado*. Brasil, Piracicaba. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; GARCÍA JÚNIOR, A.; BERETTA, M. J. G.; HARAKAVA, R.; MACHADO, M. A.; LARANJEIRA, F. F.; RODRIGUES NETO, J. y BERIAM, L. O. S. (1997): «Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil»; *Summa Phytopathologica* (23); pp. 46-49.
- Prado, S.S., Lopes, J.R.S., Demétrio, C.G.B., Borgatto, A.F., Almeida, R.P.P. (2008): «Host colonization differences between citrus and coffee isolates of *Xylella fastidiosa* in reciprocal inoculation»; *Scientia Agrícola* (65); pp. 251-258.
- QUEIRÓZ-VOLTAN, R. B. y PARADELA FILHO, O. (1999): «Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*»; *Laranja* (20); pp. 55-76.

- QUEIRÓZ-VOLTAN, R. B.; CABRAL, L. R.; PARADELA FILHO, O. y FAZUOLI, L.C. (2007): «Efeito da poda do tipo decote no controle de *Xylella fastidiosa* em cultivares de cafeeiro»; *Bragantia* (66); pp. 69-80.
- QUEIRÓZ-VOLTAN, R. B.; PARADELA FILHO, O.; CARELLI, M. L. C. y FAHL, J. I. (1998): «Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*»; *Bragantia* (57); pp. 23-33.
- REDAK, R. A.; PURCELL, A. H.; LOPES, J. R. S.; BLUA, M. J.; MIZEL III, R. F. y ANDERSEN, P.C. (2004): «The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology»; *Annu. Rev. Entomol.* (49); pp. 243-270.
- ROBERTO, S. R.; COUTINHO, A.; LIMA, J. E. O.; MIRANDA, V. S. y CARLOS, E.F. (1996): «Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros»; *Fitopatol. Brasil.* (21); pp. 517-518.
- ROCHA, J. G.; ZAMBOLIM, F.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M.; BERGAMIN FILHO, A.; JESUS JÚNIOR, W. C. y HAU, B. (2006): «Quantificação dos danos causados por *Xylella fastidiosa* em cafeeiro»; *Summa Phytopathologica* (32 S); pp. 90-91.
- RODAS, V. Z. (1994): «Convivência com a clorose variegada dos citros»; *Laranja* (15); pp. 129-133.
- ROSSETI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J. M.; BERETTA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R.; QUAGGIO, J. A. y DE NEGRI, J. D. (1990): «Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. C. R.»; *Acad. Sci. Paris Ser. III* (310); pp. 345-349.
- SCARDELATO, D. A. (2013): *Adequação do volume de calda no controle de Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em pomar de laranja, no município de Colômbia, SP*. Dissertação de Mestrado, MasterCitrus, Fundecitrus, Araraquara. Disponible en <http://www.fundecitrus.com.br/mestrado/dissertacoes/diaphorina-citri/24#dissertacoes>; pp. 29.
- SCHNEIDER, N. A. y AZEVEDO FILHO, W. S. (2014): «Epidemiologia da escaladadura das folhas da ameixeira»; *Caderno de Pesquisa, Série Biologia* (26); pp. 25-40.

- TEIXEIRA, D. C.; DANE, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JÚNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C. y BOVÉ, J. M. (2005): Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the «*Candidatus*» Liberibacter species associated with the disease»; *Mol. Cel. Probes* (19); pp. 173-179.
- YAMAMOTO, P. T. (2008): «Controle de insetos vetores de bactérias causadoras em doenças dos citros»; en *Manejo integrado de pragas dos citros*. Brasil, Araquara, SP. Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus); pp. 237-260.
- YAMAMOTO, P. T.; DALLA PRIA JÚNIOR, W.; ROBERTO, S. R.; FELLIPE, M. R. y FREITAS, E. P. (2001): «Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação»; *Neotrop. Entomol.* (30); pp. 175-177.
- YORINORI, M. A.; RIBAS, A. F. *et al.* (2000): «Presença de *Xylella fastidiosa* em sementes e mudas de cafeeiro»; en *Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Brasil. Belo Horizonte. Embrapa Café; pp. 294-297.

Xylella fastidiosa en Italia en olivo y otras especies

Donato Boscia, Maria Saponari, Giovanni P. Martelli
Institute for Sustainable Plant Protection-CNR (Italia, Bari)

1. Introducción y situación de *Xylella fastidiosa* en Italia

El síndrome del decaimiento rápido del olivo (OQDS, *olive quick decline syndrome*) es una enfermedad que apareció en un área restringida de la costa Jónica de la provincia de Lecce en la península de Salento (Apulia, al sureste de Italia), probablemente entre 2008 y 2010. Cuando a principios de otoño de 2013 se identificó el agente putativo de la enfermedad como *X. fastidiosa* (Saponari *et al.* 2013), esta se encontraba ya afectando una superficie de más de 8.000 ha de olivar. Actualmente, se estima que el área afectada se extiende a la totalidad de la superficie cultivada de olivo de la provincia de Lecce y a parte de las provincias vecinas de Brindisi y Taranto (Figura 1, pág. 193), que representan un total de aproximadamente 5.000 km².

2. El decaimiento rápido del olivo

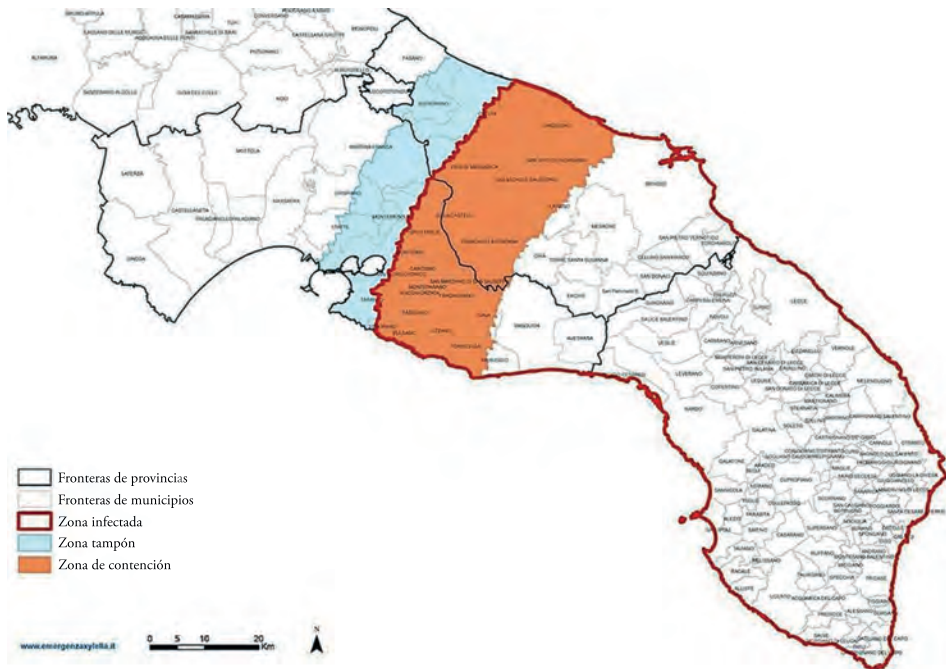
El OQDS se caracteriza por la quemadura o chamuscado de hojas y desecación en ‘salpicaduras’, o dispersa, de ramillas y ramas, que generalmente comienza en la parte superior del árbol y que luego se extiende al resto de la copa, a la que confiere un aspecto quemado (Figura 2A). La desecación del tejido comienza en el extremo apical de las hojas (puntisecas) y avanza hacia el peciolo, extendiéndose a toda la hoja (Figura 2B). Las hojas muertas permanecen cierto tiempo unidas a las ramas y se desprenden después de las lluvias de invierno. Estos síntomas recuerdan los de los ataques muy severos de *brusca* (‘chamuscado’ de las hojas), un trastorno fisiológico recurrente del olivo (Sanzani *et al.*, 2012) que se conoce desde finales del siglo XVIII en las mismas áreas donde el OQDS está expandiéndose (Frisullo *et al.*, 2014). Así, al principio, la *brusca* se incluyó entre las posibles causas del OQDS, junto a otras como la fitotoxicidad debida a la contaminación del agua subterránea, los ataques severos de *Colletotrichum* spp. (el agente de la antracnosis de la

aceituna), el mal manejo de los árboles, infestaciones severas del lepidóptero *Zeuzera pyrina* (el taladro amarillo o barrenador o polilla de la madera), y que fueron identificadas inicialmente por los agricultores locales y los asesores agrícolas como los posibles inductores de la condición de declive observada en los olivos. Sin embargo, ninguno de estos factores llega a destruir totalmente las plantas, a diferencia de *X. fastidiosa*, el agente causal de este nuevo trastorno, cuyos ataques culminan con la muerte de los árboles a los pocos años de la aparición de los síntomas (Figura 2C). Los olivos afectados de forma más severa e impactante son los árboles centenarios de los cultivares locales de las variedades Cellina di Nardò y Ogliarola Salentina, que son altamente susceptibles, y que los olivicultores intentan salvar sin éxito mediante una poda drástica para estimular un nuevo crecimiento. De hecho, la nueva vegetación que brota de estos árboles de aspecto esquelético se marchita y se seca al poco tiempo (Figura 2D). Muchos de estos árboles muestran también un oscurecimiento de los haces vasculares de ramitas, ramas y troncos que se asocia con la presencia de especies de hongos de los géneros *Phaeoacremonium*, *Phaeomonliella*, *Pleumostomophora* y *Neofusicoccum* (Nigro *et al.*, 2013, 2014), cuya infección se ve favorecida por las galerías de la polilla de la madera (Figura 3).

Esta enfermedad, que originalmente se denominó *Complesso del disseccamento rapido dell'olivo* (CoDiRO) debido a la presencia concomitante en árboles viejos y en declive de los agentes putativos mencionados anteriormente (polilla del ramo, hongos y *X. fastidiosa*), fue más tarde renombrada como OQDS, cuando las extensas observaciones de campo revelaron que la presencia de la polilla del ramo era incidental y que los hongos estaban en gran parte ausentes en árboles jóvenes infectados por *X. fastidiosa* que mostraban los mismos síntomas. Por lo tanto, los hongos se postulan ahora como agentes agravantes de la enfermedad cuando están presentes junto con *X. fastidiosa*.

La cepa asociada al síndrome del olivo se denominó CoDiRO y se ha conseguido aislar en cultivo axénico a partir de plantas de olivo y otras especies de plantas naturalmente infectadas (Cariddi *et al.*, 2014, Elbeaino *et al.*, 2014), y se ha identificado como perteneciente a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* y, concretamente, a un genotipo bacteriano (ST53) idéntico al de la misma subespecie presente en adelfa y cafeto en Costa Rica. Desde dicho país pudo haber aterrizado en Salento con una planta ornamental no identificada (Loconsole *et al.*, 2014). El genoma de una cepa tipo de CoDiRo, una molécula de ADN de 2,46 MB, se ha secuenciado recientemente en su totalidad (Giampetruzzi *et al.*, 2015).

Figura 1. Zonas demarcadas para *X. fastidiosa* en la región de Apulia (mayo de 2016) según la aplicación de la Decisión (UE) 2016/764 de la Comisión Europea



Fuente: Regione Puglia (http://old.regione.puglia.it/web/files/agricoltura/DDS_203.pdf).

Figura 2. Olivos infectados por *X. fastidiosa* mostrando desecación en ‘salpicaduras’, o dispersa, de ramillas y ramas (A). Síntomas de quemadura de hojas de olivo comenzando en el extremo apical de las hojas y avanzando hacia el peciolo, extendiéndose a toda la hoja (B). Fase final de la infección, con los árboles de olivo ya muertos (C). Síntomas apareciendo sobre los nuevos brotes emitidos por árboles podados severamente (D)



Lo mismo que ocurre con todas las subespecies y cepas de *X. fastidiosa*, la cepa CoDiRO coloniza los vasos del xilema de las plantas huésped, donde se mueve de forma ascendente y descendente y donde se multiplica. Las células bacterianas y la biopelícula que forman obstruyen los vasos, lo que resulta en una restricción del movimiento ascendente del líquido del xilema que se traduce en una respuesta fisiológica de la planta similar al estrés hídrico (Capítulo 2). El quemado de las hojas y la consiguiente desecación de ramillas y ramas se debe principalmente al bloqueo de los vasos y se agrava por factores de virulencia secretados por las células bacterianas (Nascimento *et al.*, 2016; Gouran *et al.*, 2016).

Figura 3. Oscurecimiento del tejido vascular debido a la colonización por hongos que han penetrado a partir de las galerías originadas por *Zeuzera pyrina*, la polilla de la madera



3. Programa de seguimiento y monitorización de la epidemia

Dado que el área que ya estaba invadida por la bacteria en el momento de su primera identificación en el otoño de 2013 era muy amplia, el objetivo del programa de monitorización fue, desde el principio, la demarcación de áreas libres de *Xylella*, en lugar del inventario de plantas infectadas. En particular, la campaña de monitorización más retadora realizada hasta el momento, tuvo lugar entre septiembre de 2016 y marzo de 2017, en un área de aproximadamente 150.000 ha que comprende: (i) toda la «zona tampón», es decir, una franja de casi 50 km de largo, de costa a costa, a través de la península de Salento y 10 km de ancho, lo que representa aproximadamente 50.000 ha; (ii) la «zona de contención» fronteriza con la zona infectada; es decir, una franja de 20 km de ancho (alrededor de 100.000 ha) en la que la Decisión de Ejecución (UE) 2016/764 exigía, como medida de contención, el arranque obligatorio de todas las plantas positivas para *X. fastidiosa*.

En la última campaña de monitorización (primer semestre de 2017) se tomaron muestras de 180.000 olivos georreferenciados y se analizaron individualmente en el laboratorio para determinar si estaban infectados por la

bacteria. Esta campaña, coordinada por el Servicio Fitosanitario Regional de Apulia y encomendada a una agencia regional (ARIF), involucró a unos 200 técnicos (inspectores y agentes de protección fitosanitaria) para la recolección de muestras, mientras que los análisis se realizaron en cinco laboratorios diferentes, cuatro de los cuales analizaron todas las muestras mediante ELISA, mientras que el quinto laboratorio actuaba como «laboratorio de referencia» al que se le encomendaron análisis moleculares confirmatorios de todas las muestras positivas y dudosas y del 5 % de las muestras negativas (ver métodos de detección en el Capítulo 5).

El muestreo de las plantas se realizó siguiendo las pautas aprobadas por el Servicio Fitosanitario Regional. Para ello, todo el territorio monitorizado se dividió en 150.000 parcelas de 1 ha de tamaño, donde un equipo de dos operadores inspeccionó todas las «plantas especificadas» (en la zona de contención) o «plantas hospedadoras» (zona tampón) (Capítulo 14). En cada una de estas parcelas se tomó una muestra de al menos una planta por parcela, dando prioridad a las que mostraban síntomas sospechosos. Todas las plantas muestreadas fueron fotografiadas y georreferenciadas con la ayuda de una tableta y una aplicación específicamente desarrollada (Xylapp), en la que también se registró la presencia de síntomas. Las muestras tomadas consistieron en la recolección de al menos ocho ramillas de 15-20 cm de largo, o de 10-12 hojas tomadas de diferentes partes de la planta. Las muestras, una vez tomadas, se llevaron inmediatamente al laboratorio para su análisis. Fruto de esta monitorización se detectaron aproximadamente 900 árboles infectados en la zona de contención, y la mayoría de ellos ya han sido eliminados. Uno de estos árboles se detectó en el aparcamiento de una gasolinera en la zona tampón, donde los camiones provenientes del área infectada suelen parar a descansar. En este caso se efectuó de forma inmediata la eliminación del árbol infectado y de todas las plantas huésped en un radio de 100 m.

4. Gama de huéspedes en Italia

La primera lista de plantas huésped que incluía tan solo tres especies en octubre de 2013 (olivo, adelfa y almendro), ha aumentado constantemente con el tiempo. La base de datos de las plantas huésped en la UE para las diferentes subespecies de *X. fastidiosa* se actualiza periódicamente («Base de datos de la Comisión sobre las plantas hospedantes consideradas susceptibles a *Xylella fastidiosa* en el territorio de la Unión»; Capítulo 1). La actualización n.º 9,

publicada en julio de 2017, informa de 30 plantas huésped de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* encontradas en Apulia (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas huésped infectadas de forma natural por *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* en Apulia, Italia

Planta huésped	Nombre común
<i>Acacia saligna</i> (Labill.) Wendl.	Acacia azul
<i>Asparagus acutifolius</i> L.	Esparraguera
<i>Catharanthus</i> sp.	Vinca, catarantus
<i>Chenopodium album</i> L.	Cenizo blanco
<i>Cistus creticus</i> L.	Estepa menorquina
<i>Dodonaea viscosa</i> Jacq.	Dodonea, olivo de la arena, jarilla
<i>Eremophila maculata</i> F. Muell.	Arbusto Emu manchado
<i>Erigeron sumatrensis</i> Retz.	Coniza, zamarraga
<i>Erigeron bonariensis</i> L.	Coniza, cola de caballo
<i>Euphorbia terracina</i> L.	Lechetrezna
<i>Grevillea juniperina</i> L.	Grevillea, laurel manchado
<i>Heliotropium europaeum</i> L.	Hierba verruguera, verrucaria
<i>Laurus nobilis</i> L.	Laurel
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Espliego común, alhucema, lavanda
<i>Lavandula stoechas</i> L.	Alucema, cantueso blanco
<i>Myrtus communis</i> L.	Mirto, arrayán
<i>Myoporum insulare</i> R. Br.	Siempreverde, myoporum
<i>Nerium oleander</i> L.	Adelfa
<i>Olea europaea</i> L.	Olivo
<i>Pelargonium x fragrans</i>	Geranio
<i>Phillyrea latifolia</i> L.	Labiérnago, agracejo
<i>Polygala myrtifolia</i> L.	Poligala, lechera del cabo
<i>Prunus avium</i> L.	Ciruelo
<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A. Webb	Almendro
<i>Rhamnus alaternus</i> L.	Aladierno, alaterno
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romero
<i>Spartium junceum</i> L.	Genista, gayomba
<i>Vinca</i> sp.	Vinca, hierba doncella
<i>Westringia fruticosa</i> (Willd.) Druce	Romero australiano
<i>Westringia glabra</i> L.	Romero australiano

5. Diseminación de la enfermedad

De acuerdo con el concepto de que la transmisión de planta a planta de *X. fastidiosa* está mediada por insectos que se alimentan del fluido de xilema, se ha determinado experimentalmente que *Philaenus spumarius* (Capítulo 4), que es una especie muy abundante en los olivares del Salento (Ben Moussa *et al.*, 2016), es un vector de transmisión de las cepas del tipo CoDiRO (Saponari *et al.*, 2014; Cornara *et al.*, 2016). Los experimentos de transmisión con adultos de este insecto que resultaban positivos y portadores de *X. fastidiosa* entre un 25 y un 71 % de la población, se han llevado a cabo con plantas de olivo, vid, cítricos, adelfa, GF677 (*Prunus persica* x *Prunus dulcis*) y Vinca. Se demostró que *P. spumarius* transmite la bacteria a todas las especies vegetales excepto a vides y cítricos (Cornara *et al.*, 2017). Sin embargo, puesto que pueden existir otros vectores, se siguen muestreando los olivares para determinar otras posibles especies que sean portadoras de la bacteria que, si este es el caso, se utilizarán para los nuevos experimentos de transmisión.

Mientras tanto, el ciclo biológico de *P. spumarius* (Figura 4) ha sido esclarecido (Cornara y Porcelli, 2014). Los adultos se alimentan del olivo desde finales de primavera hasta mediados del verano, y adquieren la bacteria mientras se alimentan, y se pueden mover a los árboles vecinos. A mitad del verano, cuando los olivos detienen su crecimiento, los adultos migran hacia el suelo a las plantas huésped que están aún verdes, siendo estas arbustos, principalmente. El apareamiento y la puesta de huevos ocurren en otoño. Los juveniles que emergen a finales de invierno o principios de primavera se alimentan de hierbas espontáneas donde están protegidos por la cubierta de espuma. La muda tiene lugar a finales de primavera y los adultos emergen hacia la copa del olivo donde, si el árbol está infectado, adquieren la bacteria y la retienen en su aparato bucal hasta su muerte (ver Capítulo 4).

Se piensa que los vectores de *X. fastidiosa* pueden volar a distancias cortas [hasta 100 metros, EFSA (2013)] pero, por otro lado, pueden ser transportados por el viento a distancias más largas. Esto y la densidad y composición de plantas hospedadoras en cada zona, tienen un papel importante en la dispersión de vectores y la propagación de la enfermedad de planta a planta dentro y entre plantaciones. Sin embargo, existen otros métodos de propagación que son mediados por el hombre y de suma importancia para el establecimiento de nuevos focos de infección en lugares que el vector no puede alcanzar por medios naturales. De hecho, los vectores pueden moverse

a través de tres rutas principales: (i) viajando a larga distancia como polizones (pasajeros ocultos); (ii) asociados con plantas o partes de la planta; (iii) siendo transportados en vehículos (coches, camiones, autobuses, vehículos agrícolas) y, sobre todo, por los seres humanos. Mientras que como polizones la probabilidad de entrada en un nuevo entorno y establecimiento es moderada, ya que la capacidad de los vectores infecciosos para sobrevivir durante el transporte o el almacenaje es generalmente baja, la probabilidad de entrar asociada con las plantas o por el transporte pasivo por los vehículos puede ser mucho más alta. Por ejemplo, la repentina aparición en 2015 de los focos de OQDS en el campo de Oria, una aldea en la provincia de Brindisi, a una distancia de vuelo de aproximadamente 30 km del frente más avanzado de la infección en la provincia de Lecce y en 2016 en la costa del municipio de Ostuni (provincia de Brindisi) fue atribuido al transporte pasivo de vectores infecciosos. Para evitar este tipo de eventos no deseados se deben observar algunas reglas simples después de visitar un lugar infectado: cepillarse el pelo y la ropa a los que pueden adherirse los insectos antes de entrar en el medio de transporte; mantener las ventanas del vehículo cerradas durante el estacionamiento o la conducción a través de las áreas afectadas; y abstenerse de recoger hierbas y plantas silvestres de áreas infectadas y sus alrededores.

6. Medidas de control

No se conocen métodos para curar los árboles infectados con *X. fastidiosa* y los procedimientos de erradicación no pueden funcionar cuando las condiciones climáticas son favorables y la bacteria ya está arraigada en la flora nativa, como en el caso de la península de Salento. En estas condiciones, la aplicación de las «buenas prácticas de manejo» y los tratamientos con varios tipos de bioestimulantes y fertilizantes foliares (Dongiovanni *et al.*, 2017; El Panel EFSA PLH, 2016) puede resultar en una mejora temporal del crecimiento vegetativo de los árboles infectados, pero no los salva ni se detiene la propagación de la infección en el árbol. Por ello, el peligro actual de la ampliación de la zona infectada a las provincias nortenas de la Apulia y las regiones vecinas, donde se cultiva ampliamente el olivo, ha promovido el diseño de una estrategia destinada a controlar los vectores. El plan de contención del OQDS fue concebido en el año 2015 y su ejecución le fue confiada a un comisario extraordinario.

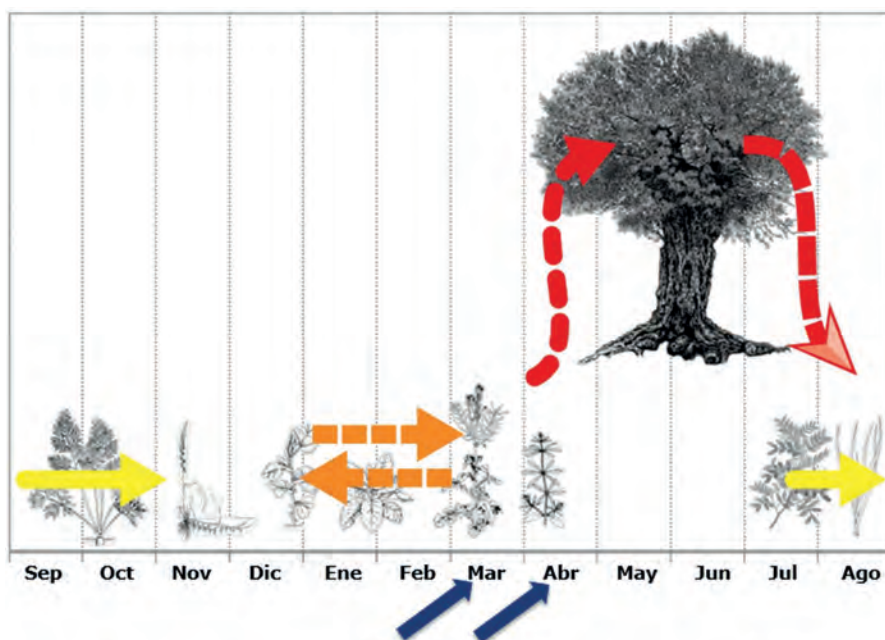
Como se muestra en la Figura 1, las tres zonas demarcadas denominadas «área infectada», «zona de contención» y «zona tampón» se establecieron en la península de Salento, y comprenden la provincia de Lecce entera y parte de las provincias de Brindisi y Taranto. Las siguientes acciones han sido implementadas en la zona tampón (A) y la zona de contención (B): (i) evaluación de la ausencia de infección a través de la extensa y continua vigilancia de vectores, huéspedes primarios (olivo) y alternativos para determinar la presencia de *X. fastidiosa*; (ii) inmediata eliminación de plantas infectadas y vecinas en un radio de 100 metros, tal y como solicita la Unión Europea; (iii) preservación del estado sanitario de los olivos y otros huéspedes susceptibles por medio de tratamientos químicos contra vectores (adultos) y mecánicos mediante desbroce, contra estadíos juveniles del vector (ninfas) en momentos específicos, como se ilustra en el diagrama en la Figura 4. La hipótesis es que las aplicaciones químicas y el control de hierbas adventicias reduce el potencial de inóculo al reducir la población de los vectores; es decir, del principal responsable de la propagación de la enfermedad; (iv) eliminación de huéspedes alternativos de carreteras, canales, áreas verdes, etc.

Los pasos que definen el control de los vectores se detallan a continuación, como resultado de los conocimientos científicos adquiridos recientemente en relación al ciclo de vida de *P. spumarius* (Figura 4), un insecto con una sola generación al año y una alta capacidad reproductiva en ambientes favorables como los que caracterizan en gran medida el clima mediterráneo. Así, en las condiciones climáticas del sur de Italia, cuyas temperaturas durante el invierno son generalmente superiores a la temperatura de congelación, el ciclo de vida de *P. spumarius* puede resumirse como sigue:

- Enero-abril. Las formas juveniles eclosionan de los huevos que han invernado en plantas herbáceas y arbustos bajo la protección de los nidos de espuma. En este período se requiere tomar las siguientes medidas: (i) desbroce mecánico, es decir, laboreo del suelo en olivar para destruir los huéspedes herbáceos del insecto en los cuales las ninfas del vector se desarrollan; (ii) aplicación de insecticidas en los puntos donde las hierbas adventicias con ninfas del vector no son accesibles fácilmente.
- Mayo-agosto. Durante las mudas en los estadíos de ninfa, estas pierden la infectividad en el caso de que se hubiesen alimentado de plantas infectadas. En cualquier caso ha sido comprobado que el riesgo de infección es muy bajo o nulo, ya que *X. fastidiosa* se detecta raramente a

nivel del suelo (en las hierbas adventicias) en las áreas muestreadas de Salento (Potere *et al.*, 2016). Por lo tanto, los adultos no infecciosos pasan de las plantas herbáceas a otros huéspedes al sentirse atraídos por la vegetación más tierna de primavera. Esta migración es generalmente masiva. Si el árbol en que aterrizan los vectores está infectado, los insectos adquieren la bacteria, convirtiéndose así en una fuente de inóculo para los árboles vecinos. En el período descrito, el control con insecticidas debe orientarse hacia los individuos adultos del vector, utilizando los productos adecuados tanto en los olivares como en las superficies no cultivadas; es decir, aplicando tratamientos en zonas verdes con vegetación de malas hierbas que pueden potencialmente ser huéspedes de *X. fastidiosa*. Con esta estrategia se espera, por tanto, que esta «guerra de dos frentes», contra los juveniles y los adultos, permita reducir progresivamente la población de los vectores y, así, el potencial de inóculo y la progresión del contagio a olivares vecinos.

Figura 4. Ciclo biológico de *Philaenus spumarius*



* Las flecha azules indican el momento sugerido para el desbroce de la cubierta para el control de los juveniles (estados ninfales) del vector.

Fuente: cortesía de F. Porcelli (University of Bari).

Figura 5. Fila de árboles de olivo cultivar 'Leccino' (dch.), junto a otra fila de árboles severamente afectados por *X. fastidiosa* del cultivar 'Ogliarola salentina' (izd.)



No importa cómo de acertado y exitosa sea la estrategia anterior, ya que es conocido que el inóculo no se puede erradicar de un área determinada si el brote no se identifica en una etapa temprana, tal y como ha sucedido en Apulia. Por lo tanto, la supervivencia del inóculo puede ocasionar nuevos brotes de la enfermedad tarde o temprano en plantaciones recién establecidas, a no ser que estas se establezcan con cultivares resistentes o tolerantes. Teniendo esto en cuenta, la búsqueda de tolerancia o de resistencia se ha iniciado en Italia en el área fuertemente infectada, con la identificación exitosa del cultivar Leccino creciendo en buenas condiciones y con síntomas escasos de OQDS en comparación con el cultivar local ampliamente cultivado Ogliarola salentina (Figura 5). Las razones de este comportamiento diferencial se han estudiado y se han encontrado los siguientes aspectos asociados a esta tolerancia: (i) la concentración bacteriana es mucho menor en el cultivar 'Leccino' (extracto de tejido con 133.267 células viables de *X. fastidiosa*/ml) que en el cultivar 'Ogliarola salentina' (2.094.000 células viables de *X. fastidiosa*/ml); (ii) un análisis comparativo del transcriptoma reveló que en el cultivar 'Leccino' hay una sobreexpresión de genes que codifican para receptores del tipo quinasas (RLK); es decir, de proteínas implicadas en respuestas de defensa de la planta (Giampetruzzi *et al.*, 2016). Por este motivo, la búsqueda adicional de cultivares con tolerancia o resistencia a la enfermedad (casi 90 por el momento) se

está llevando a cabo mediante dos aproximaciones diferentes: (i) la exposición de estas variedades a alta presión de inóculo mediante su plantación en un área fuertemente infectada de forma natural; (ii) el injerto en 'parche' de distintos cultivares en el tronco de árboles de avanzada edad infectados (Figura 6). Para esta aproximación se han injertado unos 1.000 olivos con 270 cultivares diferentes.

Figura 6. Injerto en 'parche' sobre el tronco de un árbol infectado de olivo cultivar 'Ogliarola salentina'



Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. B. Landa (CSIC) la traducción al español de este capítulo, y a los proyectos POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y XF-ACTORS (*Xylella fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy), del programa Horizonte 2020 de la UE, su apoyo y financiación.

Referencias bibliográficas

- BEN MOUSSA, I. E.; MAZZONI, V.; VALENTINI, F.; TAHER, Y.; LORUSI, D.; SPERANZA, S.; DIGIARO, M.; VARVARO, V.; KRUGNER, R. y D'ONGHIA, A. M. (2016): «Season fluctuation of sap-feeding insect species infected by *Xylella fastidiosa* in Apulian olive groves of southern Italy»; *Journal of Economic Entomology* (109); pp. 1512-1518.
- CARIDDI, M.; SAPONARI, D.; BOSCIA, A.; DE STRADIS, G.; LOCONSOLE, F.; NIGRO, F.; PORCELLI, O.; POTERE y MARTELLI, G. P. (2014): «Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy»; *Journal of Plant Pathology* (96); pp. 425-429.
- CORNARA, D. y PORCELLI F. (2014): «Observations on the biology and ethology of Aphrophoridae: *Philaenus spumarius* in the Salento peninsula. *International Symposium on the European Outbreak of Xylella fastidiosa in Olive*»; *Journal of Plant Pathology* (96); pp. S4.98.
- CORNARA, D.; SAPONARI, M.; ZEILINGER, A. R.; DE STRADIS, A.; BOSCIA, D.; LOCONSOLE, G.; BOSCO, D.; MARTELLI, G. P.; ALMEIDA, R. P. P. y PORCELLI, F. (2016a): «Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy»; *Journal of Pest Science* 90(2); pp. 521-530.
- CORNARA, D.; DONGIOVANNI, C.; ALTAMURA, G.; PLAMISANO, F.; BOSCO, D.; PORCELLI, F.; ALMEIDA, R. P. P. y SAPONARI, M. (2017): «Transmission of *Xylella fastidiosa* by naturally infected *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Aphrophoridae) to different host plants»; *Journal of Applied Entomology* (141); pp. 80-87.
- DONGIOVANNI, C.; DI CAROLO, M.; FUMAROLA, G.; CINIERO, A.; TAURO, D.; PALMISANO, F.; SILLETTI, M. R.; POLLASTRO, P.; ALTAMURA, G.; CAVALIERI, V.; MORELLI, M.; SILDARELLI, P.; BOSCIA, D.; SAPONARI, M. y FARETRA, F. (2017): «Recenti sperimentazioni per il controllo di *Xylella*»; *Olivo e Olio 2017* (4); pp. 25-29.

- EFSA (2013): «Statement of EFSA on host plants, entry and spread pathways and risk reduction options for *Xylella fastidiosa* Wells *et al.*»; *EFSA Journal* (11); pp. 3468.
- EFSA PLH PANEL (EFSA PANEL ON PLANT HEALTH). (2016): «Statement on treatment solutions to cure *Xylella fastidiosa* diseased plants»; *EFSA Journal* (14) 4456; pp. 12. doi:10.2903/j.efsa.2016.4456.
- ELBEAINO, T.; VALENTINI, F.; ABOU KUBAA, R.; MOUBARAK, P.; YASEEN, T. y DIGIARO, M. (2014): «Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by «olive quick decline syndrome» in Italy»; *Phytopathologia Mediterranea [S.l.]* 53(3); pp. 533-542.
- FRISULLO, S.; CAMELE, I.; AGOSTEO, G. E.; BOSCIA, D. y MARTELLI, G. P. (2014): «Brief historical account of olive leaf scorch («brusca») in the Salento peninsula of Italy and state-of-the-art of the olive quick decline syndrome»; *Journal of Plant Pathology* (96); pp. 441-449.
- GIAMPETRUZZI, A.; MORELI, M.; SAPONARI, M.; LOCONSOLE, G.; CHIUMENTI, M.; BOSCIA, D.; SAVINO, V. N.; MARTELLI, G. P. y SILDARELLI, P. (2016): «Transcriptome profiling of two olive cultivars in response to infection by the CoDiRO strain of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*»; *BMC Genomics* (17); pp. 475-494.
- GIAMPETRUZZI, A.; SAPONARI, M.; ALMEIDA, R. P. P.; ESSAKHI, S.; BOSCIA, D.; LOCONSOLE, G. y SILDARELLI, P. (2017): «Complete genome sequence of the olive-infecting strain *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* De Donno»; *Genome Announcements* (5); pp. e00569-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00569-17>.
- GOURAN, H.; GILLESPIE, H.; NASCIMENTO, R.; CHAKRABORTY, S.; ZAINI, P. A.; JACOBSON, A.; PHINNEY, B. S.; DOLAN, D.; DURBIN-JOHNSON, B. P.; ANTONOVA, E. S.; LINDOW, S. E.; MELLEMA, M. S.; GOULART, L. R. y DANDEKAR, A. M. (2016): «A secreted protease PrtA controls cell growth, biofilm formation and pathogenicity in *Xylella fastidiosa*»; *Scientific Reports* 6:31098; doi: 10.1038/srep31098.
- LOCONSOLE, G.; POTERE, O.; BOSCIA, D.; ALTAMURA, G.; PALMISANO, F.; POLLASTRO, P.; SILLETTI, M. R.; TRISCIUZZI, N.; DJELOUAH, K.; ELBEAINO, T.; FRASHERI, D.; LORUSSO, D.; VALENTINI, F.; SAVINO, V. y SAPONARI, M. (2014): «Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods»; *Journal of Plant Pathology* (96); pp. 7-14.

- NASCIMENTO, R.; GOURAN, H.; CHAKRABORTY, S.; GILLESPIE, H. W.; ALMEIDA-SOUZA, H. O.; TU, A.; RAI, B. J.; FELDSTEIN, P. A.; BRUENING, G.; GOULART, L. R. y DANDEKAR A. M. (2016): «The Type II secreted lipase/esterase *lesA* is a key virulence factor required for *Xylella fastidiosa* pathogenesis in grapevines»; *Scientific Reports*. 2016 (6); pp. 18598. doi:10.1038/srep18598.
- NIGRO, F.; BOSCIA, D.; ANTELM, I. y IPPOLITO A. (2013): «Fungal species associated with a severe decline of olive in southern Italy»; *Journal of Plant Pathology* (95); pp. 668.
- NIGRO, F.; ANTELM, I. y IPPOLITO, A. (2014): «Identification and characterization of fungal species associated with the quick decline of olive»; *Journal of Plant Pathology* (96); pp. S4.101.
- POTERE, O.; SUSCA, L.; LOCONSOLE, G.; SAPONARI, M.; BOSCIA, D.; SAVINO V. y MARTELLI G. P. (2015): «Survey for the presence of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauc* (strain CoDiRO) in some forestry and ornamental species in the Salento peninsula»; *Journal of Plant Pathology* (97); pp. 373-376.
- SANZANI, S. M.; SCHENA, L.; NIGRO, F.; SERGEEVA, V.; IPPOLITO, A. y SALERNO, M. G. (2012): «Abiotic diseases of olive»; *Journal of Plant Pathology* (94); pp. 469-491.
- SAPONARI, M.; BOSCIA, D.; NIGRO F. y MARTELLI G. P. (2013): «Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy)»; *Journal of Plant Pathology* (95); pp. 668.
- SAPONARI, M.; LOCONSOLE, G.; CORNARA, D.; YOKOMI, R. K.; DE STRADIS, A.; BOSCIA, D.; BOSCO, D.; MARTELLI, G. P.; KRUGNER, R. y PORCELLI F. (2014b): «Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* Salento strain by *Philaenus spumarius* L. (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy»; *Journal of Economic Entomology* (107); pp. 1316-1319.

Xylella fastidiosa en Francia en ornamentales y otras especies

Juliette Auricoste^a, Pierre Claquin^a, Nicolas Denancé^b,
Marie-Agnés Jacques^b, Pauline de Jerphanion^d, Saoussen Joudar^a,
Bruno Legendre^c, Valérie Olivier^c y Françoise Poliakoff^f

^aMinisterio de Agricultura y Alimentación, Dirección General de Alimentación (Francia, París),

^bInstituto de Investigación en Horticultura y Semillas-INRA (Francia, Beaucouzé),

^cLaboratorio de Sanidad Vegetal-ANSES (Francia, Angers)

y ^dUnidad de Coordinación y soporte de la Vigilancia-ANSES (Francia, Lyon)

1. Situación fitosanitaria con respecto a *Xylella fastidiosa* en Francia

La bacteria *Xylella fastidiosa* es un organismo nocivo (plaga) de cuarentena, regulado a nivel de todo el territorio europeo. En Francia está clasificada entre los microorganismos que constituyen un riesgo para la salud de la categoría 1; por lo tanto, es de interés general, de acuerdo a una orden del 15 de diciembre de 2014. Las medidas de lucha contra *X. fastidiosa* se indican en la Orden Ministerial del 23 de diciembre de 2015: las medidas de aplicación son las de la Decisión Europea 2015/789/UE, y les corresponde a los prefectos de la región delimitar las zonas demarcadas, en caso de foco.

X. fastidiosa subsp. *multiplex* se detectó por primera vez en Francia en el medio natural en 2015, en las regiones de Córcega y Provenza Alpes Costa Azul (PACA). Y en septiembre de 2016 se identificó por primera vez *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, en un foco situado también en PACA. En mayo de 2017 se habían identificado 360 focos en Francia, 340 de ellos en Córcega y 20 en PACA (Figura 1).

Hasta la fecha, se ha detectado la bacteria (subespecie *multiplex*) en 36 especies vegetales, que en su mayoría son plantas ornamentales del paisaje mediterráneo: *Polygala myrtifolia*, *Spartium junceum*, *Calicotome villosa*, *Helichrysum italicum*, *Lavandula angustifolia*, *Cistus monspeliensis*, etc. No se ha encontrado ningún positivo en olivo, vid o cítricos.

Figura 1. Mapa de la situación fitosanitaria en Francia con respecto a *Xylella fastidiosa* (a 23 de mayo de 2017)



En cuanto a los insectos vectores, todavía no se han identificado. No obstante, se ha estimado en 51 el número de especies de vectores potenciales en Francia (48 en Francia continental y 12 en Córcega) (Germain J-F, 2016).

Antes de estas detecciones en medio natural, se había aislado *X. fastidiosa* ya en 2012 a partir de plantas de cafeto interceptadas (*Coffea arabica* y *C. canephora*), procedentes de importaciones de Latinoamérica (Jacques *et al.*, 2016).

2. Organización y evaluación de la vigilancia en Francia

2.1. Estructuración de la Organización Nacional de Protección Fitosanitaria francesa relativa a *Xylella fastidiosa*

La Organización Nacional de Protección Fitosanitaria reúne a distintos miembros. La vigilancia oficial corre a cargo de los servicios regionales de la alimentación (SRAL), las direcciones regionales de agricultura, alimentación y bosques (DRAAF) o de sus organismos delegados, esto es, las federaciones regionales de defensa contra los organismos nocivos (FREDON), que aplican las instrucciones que proceden a nivel central de la Dirección General de Alimentación (DGAL) del Ministerio de Agricultura y Alimentación (MAA), autoridad competente a nivel nacional. La autoridad competente a nivel regional en Francia continental es la DRAAF, que actúa bajo la autoridad del prefecto de la región. La autoridad competente a nivel de regiones y departamentos de ultramar es la DAAF (Dirección de Alimentación, Agricultura y Bosques).

En Córcega, la organización tiene una particularidad: los servicios del Estado a nivel departamental (Dirección Departamental de Cohesión Social y Protección de las Poblaciones-DDCSPP) son los que planifican y organizan los controles en ambos departamentos. Los SRAL son los que se encargan de la coordinación regional de estos controles.

En 2016, ascendía aproximadamente a 205 el número total de funcionarios del Estado que participaban a jornada completa o parcial en las actividades relacionadas con *X. fastidiosa*.

2.2. Plan de vigilancia de *X. fastidiosa*

La vigilancia del territorio con respecto a *X. fastidiosa* se estructura en torno a un plan de vigilancia nacional¹. Su objetivo es verificar que el territorio está libre del organismo nocivo, especialmente con respecto a los aislados europeos, detectando con la máxima precocidad, en su caso, la presencia de la bacteria. La vigilancia del territorio también permite garantizar la calidad de los productos vegetales exportados. Esta vigilancia se basa en tres aproximaciones complementarias que se describen a continuación: vigilancia programada oficial, vigilancia programada no oficial y vigilancia de eventos.

¹ Instrucción Técnica DGAL/SDQPV/2016-413 de 18 de mayo de 2016 relativa al plan de vigilancia de *Xylella fastidiosa* para la campaña 2016-2017.

2.2.1. Vigilancia programada oficial

La vigilancia programada oficial se concreta en inspecciones específicas en los establecimientos de minoristas y productores, y en el campo, en los sectores considerados de riesgo (arboricultura, vid, ornamentales y plantas para perfumería aromáticas, medicinales y de condimento –PPAMC–). Esta vigilancia se divide en 4 esquemas de inspección:

- Inspecciones fitosanitarias específicas de *X. fastidiosa* en el marco de una Supervisión Oficial de los Organismos Regulados o Emergentes (SORE).

Se ha instaurado un programa de inspecciones anuales (número de parcelas o centros a visitar) para cada uno de los sectores considerados y de acuerdo a un análisis de riesgo. Se vigilan en particular las regiones del Mediterráneo, de la costa atlántica, así como los mercados nacionales de interés.

- Inspecciones en el marco de una Supervisión Oficial de los Organismos Regulados o Emergentes (SORE) no específicas de *X. fastidiosa* (i.e., ya realizadas para otras plagas reguladas).

También se combina la vigilancia de *X. fastidiosa* con la de otros organismos nocivos o enfermedades como el escarabajo asiático de cuernos largos, la flavescencia dorada, la necrosis bacteriana, el virus de la sharka, el chancro colorado del plátano, etc.

- Inspecciones en el marco de la expedición del pasaporte fitosanitario europeo (PPE).

De conformidad con la Decisión Europea 2015/789/UE modificada, se instauraron pasaportes fitosanitarios europeos para todas las especies hospedadoras. Así pues, se someten a controles fitosanitarios para detectar la presencia de *X. fastidiosa* todos los establecimientos que producen y comercializan vegetales que deben ir acompañados de un PPE. Estos controles se traducen en inspecciones documentales y fitosanitarias (inspecciones visuales y, si se observan síntomas sospechosos, muestreos). Se someten a una vigilancia reforzada (muestreos asintomáticos) los viveros que cultivan plantas madre de plantas hospedadoras, los viveros vitícolas y los viveros que importan plantas originarias de terceros países, en los que está presente o se sospecha la presencia de la enfermedad.

- Inspección en los Puntos de Entrada en la Comunidad (PEC).

De conformidad con la Decisión Europea 2015/789/UE sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión Europea de *X. fastidiosa*, se llevan a cabo controles en los puntos de entrada en la Comunidad: se realizan muestreos de todos los envíos de plantas sensibles a *X. fastidiosa* originarios de terceros países en los que está presente la bacteriosis, y estos envíos se consignan en un depósito a la espera de los resultados de los análisis. En caso de resultados positivos, los lotes son destruidos. En algunos casos, podrán mantenerse en cuarentena con fines de investigación.

2.2.2. Vigilancia programada no oficial

Se integra la vigilancia de *X. fastidiosa* en las observaciones realizadas en el marco de las redes existentes de vigilancia epidemiológica relacionadas con plagas reguladas o no: red de Sanidad Forestal (DSF - Departamento de Sanidad Forestal) y Supervisión Biológica del Territorio (SBT) en el marco del plan Ecophyto (que cumple con la Directiva 2009/128/CE).

La red de observadores del DSF vigila los bosques, diagnostica los problemas de sanidad forestal, ayuda y aconseja a los administradores y propietarios. Por medio de 230 corresponsales observadores y 10.000 observaciones al año, la red sigue la evolución y el impacto de las plagas en los bosques e identifica los posibles problemas emergentes.

La SBT se basa en una red de vigilancia epidemiológica instaurada desde 2009 en el marco del plan Ecophyto. Cerca de 4.000 observadores abarcan todo el territorio francés (en zonas agrícolas y no agrícolas) y 13.000 parcelas fijas son objeto de un seguimiento. Se armonizan los protocolos de observación a escala nacional. Se reúnen los datos de las observaciones en una base de datos nacional (Epiphyt), a partir de la cual se redactan boletines semanales (Boletín de Sanidad Vegetal-BSV). En caso de sospecha, se alerta a los servicios habilitados para realizar inspecciones oficiales.

2.2.3. Vigilancia de eventos

Esta vigilancia se basa en las advertencias espontáneas de sospecha de infección de plantas por *X. fastidiosa* por parte de particulares, profesionales

u observadores, fuera de las actividades de vigilancia programada. Les corresponde a los servicios del Estado valorar el riesgo y decidir que se realice una inspección fitosanitaria oficial.

Se refuerza la vigilancia por parte de todos los sectores implicados, mientras se sigue llevando a cabo una campaña de sensibilización y comunicación en todo el territorio. Se ha creado una página web dedicada a *X. fastidiosa* que se actualiza periódicamente². Se difunden de forma periódica comunicaciones e información con destino a los profesionales y el público.

2.3. Optimización de la vigilancia y el análisis de datos en el marco de la plataforma de vigilancia epidemiológica

El objetivo de la plataforma de vigilancia epidemiológica en sanidad vegetal, que está ahora en fase de construcción, es brindar un apoyo metodológico a los gestores de sistemas de vigilancia. En este marco, se considera prioritario actuar en lo relacionado con *X. fastidiosa*.

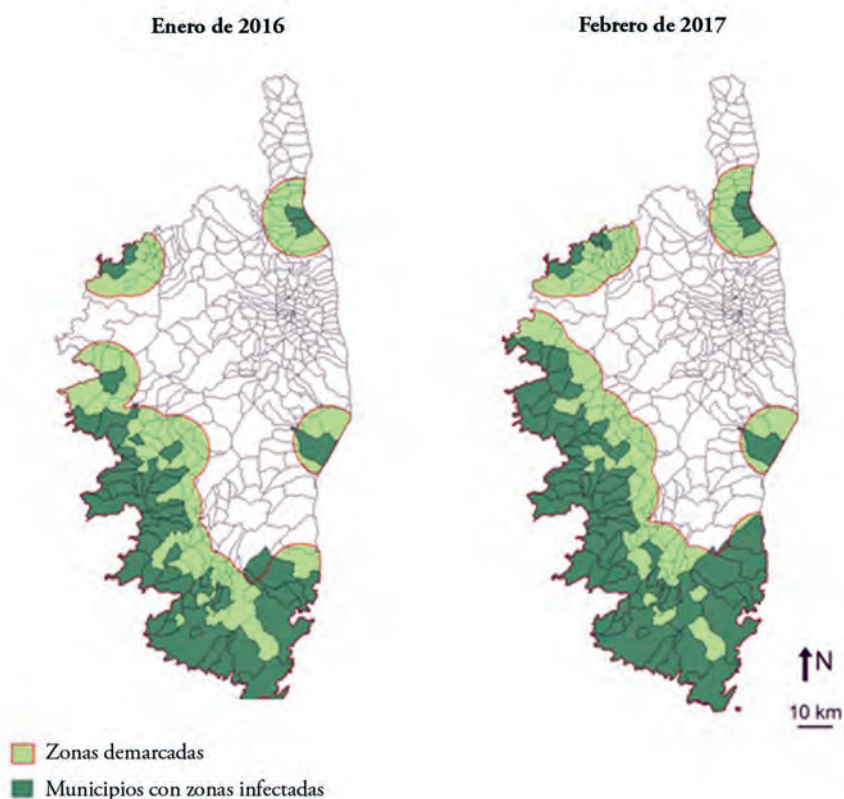
Se ha creado un grupo de trabajo técnico integrado por todos los sectores implicados en la vigilancia de *X. fastidiosa* (profesionales, científicos y administración), para prestar apoyo al gestor del riesgo (Ministerio de Agricultura/DGAL), con el fin de mejorar la vigilancia. Este grupo se encarga específicamente de evaluar el funcionamiento de la vigilancia y la situación sanitaria frente a *X. fastidiosa*, facilitando información a los sectores locales implicados e identificando las perspectivas de optimización de la vigilancia, especialmente mediante la búsqueda de sinergias entre los sistemas de vigilancia ya existentes.

La Unidad de Coordinación y Apoyo a la Supervisión (UCAS) de la ANSES (Agencia Nacional francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos, del Medio Ambiente y del Trabajo) ha instaurado un sistema de información para centralizar todos los datos de vigilancia analizados con respecto a *X. fastidiosa*. Gracias a un identificador único relacionado con cada muestreo se han podido recopilar datos botánicos, de localización así como las fechas de las muestras y los resultados de los análisis. Se verifica de forma automática la calidad de los datos en términos de formato, coherencia y exhaustividad.

² La página dedicada a *Xylella fastidiosa* dentro del sitio web del Ministerio de Agricultura está disponible en la siguiente dirección: <http://agriculture.gouv.fr/xylella-fastidiosa-une-bacterie-nuisible-pour-les-vegetaux>

ANSES desarrolló una aplicación interactiva en Internet con la herramienta Shiny (RStudio). Permite poner a disposición de las autoridades competentes en materia de gestión del riesgo y la vigilancia (DGAI, DRAAF/SRAI-Servicios Regionales de la Alimentación) el conjunto de los datos recabados (Figura 2). Estos datos recopilan, en particular, el balance de las muestras y los análisis, la lista de los municipios en zonas demarcadas, una cartografía de zonas infectadas y sus principales características, los mapas de incidencia de la bacteria, así como un módulo de evaluación de la calidad de los datos. Analizando estos datos en continuo es posible seguir la evolución de la presión de vigilancia y enriquecer el análisis de riesgo para dirigir de forma más efectiva las acciones de vigilancia.

Figura 2. Evolución en la isla de Córcega de la zona demarcada y de los municipios en los que se han declarado focos (zonas infectadas) entre enero de 2016 y febrero de 2017



2.4. Puesta en práctica de las medidas de lucha en los focos

Al descubrir los primeros focos, las DRAAF/SRAI tanto de Córcega como de PACA, lanzaron un plan de emergencia regional. En diciembre de 2016, se elaboró un plan nacional de intervención sanitaria de emergencia (o plan de emergencia) que se publicó el 11 de enero de 2017. Su objetivo era preparar los servicios del Estado para implementar medidas de lucha en caso de sospecha o confirmación de foco, de conformidad con las disposiciones previstas en la decisión de ejecución 2015/789/UE. Este plan de emergencia nacional se activó desde que se descubrió el primer foco de *X. fastidiosa*.

Las medidas de lucha implementadas en los focos son las siguientes:

- Creación de una zona infectada, en la que se arrancan y se destruyen todos los vegetales descubiertos infectados y los vegetales sospechosos (plantas con síntomas sospechosos y vegetales conocidos como sensibles a la bacteriosis³) previa aplicación de un tratamiento insecticida para evitar la dispersión de los insectos vectores (Tabla 3);
- Instauración de una vigilancia reforzada en la zona infectada, mediante muestreos y análisis, con el fin de garantizar la erradicación de la bacteria;
- Instauración de una vigilancia reforzada en la zona tampón, mediante inspecciones y muestreos, con el fin de garantizar el estatus de no presencia del organismo especificado en la zona;
- Realización de una encuesta de trazabilidad para identificar el origen y el alcance de la infección, así como los factores que han favorecido el brote de la enfermedad y aquellos que puedan favorecer su propagación.

2.5. Balance de la vigilancia en Francia

Desde la primera detección de la bacteria en Francia, se han realizado más de 18.000 tomas de muestras. En 2016, la aplicación del plan de vigilancia y del plan de emergencia ha dado lugar a la realización de casi 10.000 inspecciones en todo el territorio. Se ejerce una fuerte presión de muestreo tanto en

³ Denominadas «plantas hospedadoras». La lista de plantas hospedadoras, que reúne a todas las especies descubiertas infectadas por alguno de los aislados europeos, está disponible en la página web de la Comisión Europea.

las especies hospedadoras de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* como en todas las especies incluidas en el plan de vigilancia.

Desde 2015, se encontraron en Francia 36 especies vegetales infectadas por *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex*. Tres especies vegetales representan aproximadamente el 70 % de las muestras infectadas: *P. myrtifolia* (aproximadamente el 52 %), *Calicotome villosa* (10 %), y *Helichrysum italicum* (9 %). *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* se ha detectado hasta el momento únicamente en tres plantas de *P. myrtifolia*.

La situación epidemiológica de la bacteria en ambas regiones francesas infectadas, a raíz de la vigilancia instaurada, es muy dispar.

2.5.1. Córcega: una importante cobertura del territorio, inclusive en el medio natural

La bacteria se detectó por primera vez en Francia el 22 de julio de 2015, en plantas de *P. myrtifolia* (lechera del Cabo) en una zona comercial del municipio de Propriano, en Córcega del Sur. Desde la identificación del primer brote de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, con la fuerte presión de vigilancia, así como con la adquisición de conocimientos, se ha podido observar que la bacteria está muy extendida en la isla. En mayo de 2017 se contabilizaron 340 focos desde el comienzo de la crisis, y, entre estos, 323 están ubicados en Córcega del Sur y 17 en Alta Córcega. La zona demarcada en Córcega cubre casi el 50 % de su superficie. La bacteria se ha detectado principalmente en *P. myrtifolia* así como en especies vegetales endémicas y típicas del matorral corso (*H. italicum*, *S. junceum*, *C. monspeliensis*, *Genista corsica*, *Lavandula stoechas*, *Myrtus communis*, etc.).

Cerca del 62 % de los focos de *X. fastidiosa* en Córcega se sitúan a altitudes inferiores a 100 m. En 2016 y principios de 2017 se declararon focos en zonas más elevadas, en particular 7 focos entre 700 y 950 m. Un número importante de focos se encuentran en medio natural (matorral y bosque).

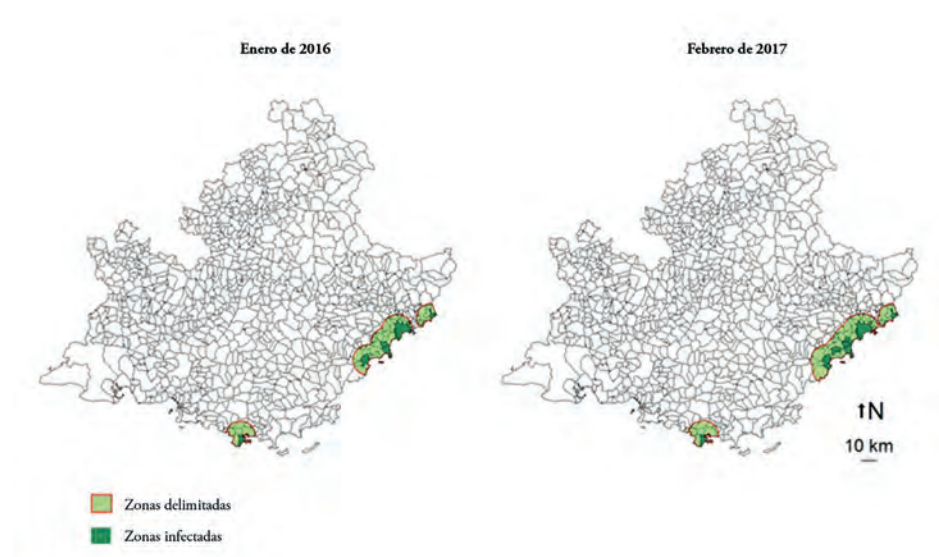
En 2016, el hecho de descubrir nuevos focos fuera de las zonas infectadas, especialmente en Córcega del Sur, ha generado un aumento del número de municipios que tienen una parte de su superficie en una zona infectada (pasaron de 40 a 60 municipios en un año) (Figura 2). No obstante, en Córcega en general no progresaron mucho los límites de las zonas demarcadas. Por otra parte, habida cuenta del estado actual de los conocimientos, no es posible predecir la dinámica de propagación de la bacteria. Se están llevando a cabo

labores de modelización y adquiriendo nuevos conocimientos sobre los vectores potenciales de la bacteria en el territorio francés que aportarán elementos para obtener respuestas.

2.5.2. PACA: una presencia esporádica en medio urbano

El 12 de octubre de 2015 se detectó *X. fastidiosa* en plantas de *P. myrtifolia* alineadas en un terraplén central de la ciudad de Niza. El 27 de septiembre de 2016 se identificó la subespecie *pauca* en la región de Provenza Alpes Costa Azul (PACA), en un foco en Menton, en tres plantas de *P. myrtifolia*. Todos los análisis realizados en el foco de Menton desde entonces no evidenciaron más infecciones. En mayo de 2017 se identificaron 20 focos en la región. Los focos descubiertos se encuentran principalmente en zonas urbanas o semiurbanas. Se encontraron cinco especies vegetales infectadas por la bacteria (*P. myrtifolia*, *Lavandula officinalis*, *Lavandula x intermedia*, *Cercis siliquastrum*, y *S. junceum*). La zona demarcada creció muy poco en 2016 (en un año pasó de 60 a 64 el número de municipios con plantas infectadas) (Figura 3).

Figura 3. Evolución en la región PACA de la zona demarcada y de los municipios en los que se han declarado focos (zonas infectadas) entre enero de 2016 y febrero de 2017



Se puede concluir que hasta el momento las situaciones fitosanitarias que se han observado en las regiones PACA y Córcega son muy diferentes. Mientras que en Provenza Alpes Costa Azul parecen limitadas las manifestaciones de la bacteria con presencia en los medios principalmente urbano y periurbano (jardines privados, zonas verdes urbanas), en Córcega, se ha detectado la bacteria en distintos ambientes del medio natural (bosque, matorral). Considerando la dispersión de estos focos en la isla, resulta muy complicada su erradicación y hasta podría ser perjudicial para los ecosistemas. Francia ha solicitado oficialmente a la Comisión Europea el paso a una estrategia de contención en marzo de 2017, que dará lugar a una discusión entre los Estados miembros y, en su caso, a una modificación de la decisión europea.

Por otra parte, se han observado infecciones tanto en especies vegetales ornamentales (*P. myrtifolia*) como en otras que son características del paisaje mediterráneo (*H. italicum*, *C. villosa*, *C. monspeliensis*, *S. junceum*, etc.). A diferencia de la situación en la región de Apulia, en Italia, en la que se lleva observando desde hace años un decaimiento muy importante de olivos que causa la muerte de estos árboles, no se ha observado ningún deterioro significativo en Francia en plantas de este cultivo, manteniéndose ilesos hasta la fecha los vegetales de interés económico (olivo, vid, cítricos y *Prunus* spp.).

3. Detección de *X. fastidiosa*

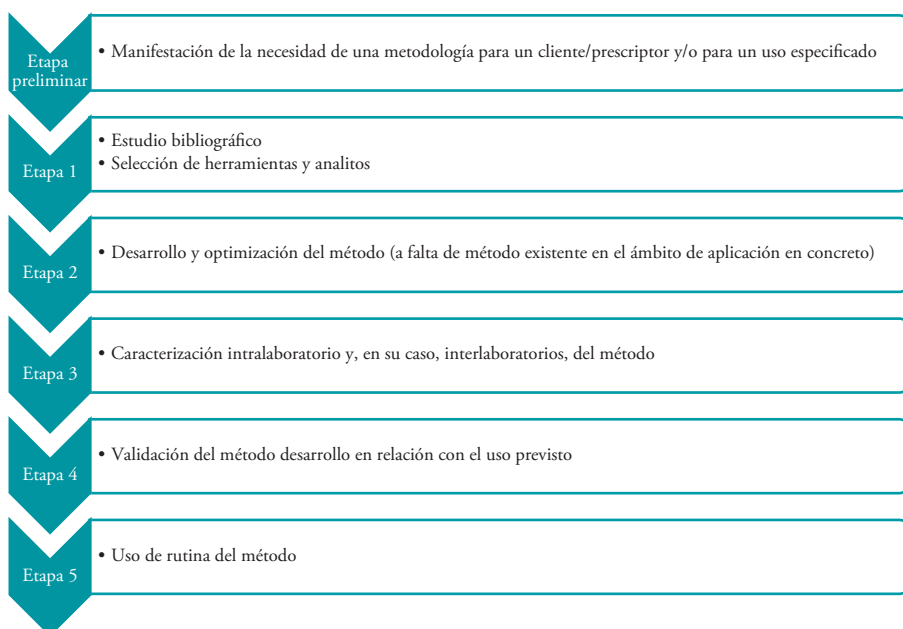
3.1. Métodos de análisis utilizados en el marco de la vigilancia oficial

3.1.1. Organización de los laboratorios franceses en el marco de la vigilancia de *Xylella fastidiosa*

Los laboratorios autorizados por el Ministerio de Agricultura (Laboratorios Departamentales de Análisis-LDA) son los que se encargan de realizar los análisis oficiales en lo que se refiere al análisis de primera línea (detección de la bacteria en matriz vegetal). El Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), que es el Laboratorio de Sanidad Vegetal (LSV) de ANSES, supervisa esta red de laboratorios y realiza los análisis de confirmación e identificación de las subespecies.

Debido a su mandato de LNR asignado por el Ministerio de Agricultura, la misión del LSV consiste en caracterizar, evaluar y validar métodos de detección e identificación con el fin de proponer protocolos de análisis fiables y validados para el uso previsto y, en particular, para la implementación de planes de vigilancia y controles oficiales. El proceso de validación de un método de detección por la ANSES se ilustra en la Figura 4.

Figura 4. Proceso de validación de un método de detección por ANSES



La caracterización o valoración de los criterios de eficacia de un método, es un requisito previo para su validación (cotejando los valores de los criterios de eficacia obtenidos con los valores-objetivo preestablecidos). Este procedimiento, implementado en el contexto de las misiones de referencia del LSV, se acoge a las normas ISO/IEC 17025, ISO 16140 para la microbiología y a las de la OEPP PM7/98, PM7/76, PM7/84 en el ámbito de la protección vegetal. La etapa de caracterización a nivel intralaboratorio consiste en evaluar los parámetros de eficacia del método: sensibilidad (relativa o absoluta), especificidad (relativa o absoluta), exactitud (relativa o absoluta), límite de detección, fiabilidad (repetibilidad, reproducibilidad intralaboratorio o fiabilidad intermedia). La etapa complementaria de la organización de una prueba inter-

laboratorios tiene como objetivo comprobar los parámetros de eficacia obtenidos en intra-laboratorio, así como probar la reproducibilidad y, según las necesidades, otras características como la robustez del método, determinados aspectos de su «delegabilidad» o «transferibilidad» (p. ej. la facilidad de uso).

3.1.2. Método oficial de detección de *Xylella fastidiosa*

La detección de agentes fitopatógenos directamente a partir del material vegetal utilizando métodos moleculares es una práctica habitual y antigua (Henson y French, 1993). La primera prueba de detección de *X. fastidiosa* basada en la PCR (*polymerase chain reaction*) y aplicada directamente al material vegetal es la que propuso Minsavage y colaboradores en 1994. Desde entonces, se han propuesto varias pruebas de detección de *X. fastidiosa* en material vegetal (Pooler y Hartung, 1995; Schaad *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2003; Francis *et al.*, 2006; Huang, 2009; Harper *et al.*, 2010; Hernandez-Martinez *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Ouyang *et al.*, 2013). La mayoría de estas pruebas son específicas para algunas subespecies, mientras que otras son genéricas (Minsavage *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 2010).

El método de detección (*screening*) de *X. fastidiosa* en material vegetal MA039v1 (2015), validado y publicado como método oficial en Francia, se basa en una detección por PCR en tiempo real (Harper *et al.*, 2010 - fe de erratas 2013) sobre extractos de ADN total obtenido con el kit comercial QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile), utilizado con los autómatas KingFisher™ mL o Flex (Thermo Fisher Scientific). Este método también está descrito en la norma OEPP PM7/24 (2016) relativa al diagnóstico de *X. fastidiosa*, y se aplica a cualquier planta hospedadora de *X. fastidiosa*, sintomática o no. Para algunas plantas hospedadoras, como el romero (*Rosmarinus officinalis*), por ejemplo, son prácticamente inexistentes los pecíolos y las hojas son de tamaño muy pequeño, por lo tanto se recogen hojas enteras para el análisis. Este método de detección no permite identificar la subespecie de *X. fastidiosa* presente en la muestra.

La evaluación de los criterios de eficacia del método de detección oficial MA039v1 está disponible en la página web de la ANSES⁴ y en las Tablas 1 y 2.

⁴ https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_MA039_Xylellafastidiosa_final.pdf.

Tabla 1. Resultados de la evaluación de la PCR en tiempo real sobre cultivos puros (cepas objetivo y no objetivo)

Característica de especificidad relativa	Resultado obtenido al realizar la caracterización	Información sobre las modalidades de realización de la caracterización
Inclusividad	100 %	19 cepas pertenecientes a las subespecies <i>X.f. subsp. fastidiosa</i> , <i>X.f. subsp. pauca</i> , <i>X.f. subsp. sandyi</i> , <i>X.f. subsp. multiplex</i> .
Exclusividad	100 %	29 cepas: 16 <i>Xanthomonas</i> sp., 1 <i>Xylophilus ampelinus</i> , 1 <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> , 1 <i>Ca. L. africanus</i> , 6 bacterias saprofitas de <i>Coffea</i> spp. y 4 bacterias saprofitas de <i>Citrus sinensis</i> .

Fuente: Harper *et al.*, 2010 fe de erratas 2013.**Tabla 2. Resultados de la evaluación de la PCR en tiempo real sobre macerados contaminados artificialmente (validación intralaboratorio)**

Característica de eficacia	Valor obtenido como resultado de la caracterización	
Sensibilidad	Vid	94 %
	Naranja	100 %
	Olivo	67 %
Especificidad	Vid	100 %
	Naranja	100 %
	Olivo	100 %
Exactitud	Vid	96 %
	Naranja	100 %
	Olivo	75 %
Repetibilidad	Vid	96 %
	Naranja	100 %
	Olivo	100 %
Reproducibilidad	Para todas las matrices	98 %
Umbral de detección (con probabilidad de detección del 100 % para seis repeticiones)	Vid	≈ 103 bact./mL
	Naranja	≈ 102 bact./mL
	Olivo	≈ 105 bact./mL

Fuente: Harper *et al.*, 2010 fe de erratas 2013.

Por otra parte, el LSV propone una adaptación de este método para detectar *X. fastidiosa* en un insecto vector (*Philaenus spumarius*) asociando en dúplex la PCR en tiempo real de Harper *et al.* (2010 - fe de erratas 2013) y

los cebadores de ADN codificante para el ARN ribosómico 18S de los eucariotas como control interno (Loos *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3 y los datos de validación están disponibles en la página web de la OEPP. La aplicación de este método en algunos lotes de insectos recogidos en los focos cursos permitió observar que la tasa de contaminación de los mismos oscilaba entre el 0 % y el 25 %, con una media de 8,5 %.

Tabla 3. Resultados obtenidos con la metodología adecuada para la detección de *X. fastidiosa* sobre insectos contaminados artificialmente (validación intralaboratorio)

Criterios de eficacia	Resultados	Comentarios
Especificidad analítica	100 %	Inclusividad probada con 19 cepas objetivo. Exclusividad probada con 29 cepas no objetivo.
Sensibilidad diagnóstica	50 % (100 % para muestras positivas > Ldd = 0,10 ³ , 10 ⁴ bacterias/cabeza)	Cabezas de insectos contaminados artificialmente con 0,1 ¹ , 10 ² , 10 ³ , 10 ⁴ bacterias/cabeza
Especificidad diagnóstica	100 %	
Repetibilidad	100 %	
Reproducibilidad	100 %	
Límite de detección (probabilidad de detección del 100 % para 6 repeticiones)	1·10 ³ bacterias/cabeza	Ct ≤ 35 = Resultado positivo Ct > 35 y ≤ 38 = resultado indeterminado Ct > 38 = resultado negativo

Fuente: Harper *et al.*, 2010 fe de erratas 2013.

3.1.2.2. Método de identificación de la subespecie en matriz vegetal

A partir de 2005, Scally y colaboradores propusieron un esquema MLST adaptado a *X. fastidiosa*, basado en el análisis de siete genes de mantenimiento, y se publicó una versión mejorada en 2010 (Yuan *et al.*, 2010) que actualmente es utilizado ampliamente en Francia. A fecha de 3 de febrero de 2017, eran 79 los tipos de secuencia (ST) en la base pubMLST dedicada a *X. fastidiosa* (<https://pubmlst.org/xfastidiosa/>). Otra ventaja de este método es su posible aplicación directamente a las muestras sin tener que aislar el patógeno y se viene aplicando desde 2015 a las muestras vegetales declaradas infectadas por *X. fastidiosa* para identificar las cepas presentes en el material vegetal (Denancé *et al.*, 2017).

3.2. Labores de investigación adicionales acerca de los métodos de análisis y perspectivas de optimización

En 2016, y antes de la publicación de la norma internacional OEPP, el INRA Emersys de Angers procedió a analizar remanentes de las muestras positivas de *X. fastidiosa* analizadas en 2015, utilizando el método de análisis MLSA/MLST, y modificando el protocolo descrito por Yuan y colaboradores (2010). Este estudio ha permitido caracterizar de forma precisa 324 muestras sobre un lote de 449 (el 72 %). Dos ST, ST6 y ST7, resultaron ampliamente mayoritarios y permitieron clasificar las cepas introducidas en Francia en la subespecie *multiplex*. Asimismo, se tipificaron 205 muestras como ST6 y 102 muestras como ST7. El resto de ellas, esto es, aproximadamente una cuarta parte de las muestras, no pudo caracterizarse de forma correcta y la tipificación quedó indeterminada (el 2 % de las muestras analizadas) o incompleta (el 26 %). Una indeterminación corresponde a la incapacidad de poder asignar de forma precisa un nucleótido a determinadas posiciones, lo que genera, por lo tanto, la existencia de ambigüedades en la secuencia de ADN. Una cuarta parte de las muestras se tipificó de forma incompleta dado que la secuencia de uno o varios alelos era incompleta o de mala calidad. Los fracasos en la amplificación se refieren, por orden decreciente, a *malF* (64 %), *holC* (57 %), *gltT* (56 %), *nuoL* (38 %), *cysG* (27 %), *petC* (22 %) y *leuA* (16 %). Estas tipificaciones incompletas pueden estar relacionadas con una carga bacteriana baja en estas muestras o con la eficacia variable de la amplificación de los genes debido, en parte, al diseño de los cebadores.

En aras de la mejora continua de los métodos de análisis oficiales, los equipos Emerys del IRHS (Instituto de investigación en horticultura y semillas) de Angers y de la ANSES-LSV de Angers ya han empezado a trabajar para mejorar la eficacia de la amplificación del ADN de los genes de mantenimiento.

Por otra parte, el análisis MLST no permite inferir hipótesis precisas en cuanto al origen de la introducción y las vías de propagación en Francia de ambos ST mayoritarios, ST6 y ST7. Es necesario disponer de herramientas de análisis más resolutivas para detectar eventuales signos de evolución dentro de estos dos ST y poder rastrear la historia de esta invasión biológica. El análisis de loci con número variable de repeticiones en tándem (MLVA) aportaría, sin duda, datos interesantes. De hecho, ya se ha aplicado con éxito a la subespecie *pauca* en Brasil (Montes-Borrego *et al.*, 2015).

4. Perspectivas

La detección de la bacteria en el territorio europeo es muy reciente. Su comportamiento (más o menos agresivo), sus plantas hospedadoras (especies europeas), sus vectores (identificación y comportamiento de los mismos) y sus cepas parecen diferentes de lo que se ha observado en América. Así pues, y a pesar de la amplitud y riqueza de los conocimientos científicos existentes sobre *X. fastidiosa*, existe un verdadero reto para avanzar en el conocimiento, tanto en lo que se refiere a la bacteria y sus vectores como en términos de comprensión de su comportamiento en el medio ambiente francés y europeo.

Agradecimientos

ANSES-LSV y INRA (grupo de investigación de Dr. Jacques) reconocen la financiación del Proyecto 635646, POnTE (Pest Organisms Threatening Europa) de programa H2020 de la Unión Europea. Este trabajo refleja el punto de vista de los autores y la agencia financiadora de la EU no se hace responsable del uso que se pueda hacer de esta información.

Referencias bibliográficas

- DENANCÉ, N.; LEGENDRE, B.; BRIAND, M.; OLIVIER, V.; DE BOISSESON, C.; POLIAKOFF, F. y JACQUES, M-A. (2017): «Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France»; *Plant Pathol.* (66); pp. 1054-1064.
- FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA ROSA, J.; DODDAPANENI, H. y CIVEROLO, E. L. (2006): «Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. Europ.»; *J. Plant Pathol.* (115); pp. 203-213.
- GERMAIN, J. F. (2016): «Les insectes vecteurs potentiels de *Xylella fastidiosa* en France métropolitaine [Los insectos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* en Francia metropolitana]»; *4ème conférence sur l'entretien des jardins, espaces végétalisés et infrastructures*. Toulouse. [IV Conferencia sobre el mantenimiento de jardines, zonas vegetalizadas y infraestructuras. Toulouse.

- GUAN, W.; SHAO, J.; SINGH, R.; DAVIS, R.; ZHAO, T. y HUANG, Q. (2013): «A TaqMan-based real time PCR assay for specific detection and quantification of *Xylella fastidiosa* strains causing bacterial leaf scorch in oleander»; *J. Microbiol. Meth.* (92); pp. 108-112
- HARPER, S. J.; WARD, L. I. y 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»; *Phytopathol.* (100); pp. 1282-1288.
- HENSON, J. M. y FRENCH, R. (1993): «The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis»; *Annu. Rev. phytopathol.* (31); pp. 81-109.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; COSTA, H. S.; DUMENYO, C. K. y COOKSEY, D. A. (2006): «Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay»; *Plant Dis.* (90); pp. 1382-1388.
- HUANG, Q. (2009): «Specific detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing oleander leaf scorch using polymerase chain reaction»; *Curr. Microbiol.* (58); pp. 393-398.
- LI, W.; TEIXEIRA, D. C.; HARTUNG, J. S.; HUANG, Q.; DUAN, Y.; ZHOU, L. *et al.* (2013): «Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis»; *J. Microbiol. Meth.* (92); pp. 79-89.
- MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEATHERS, I. M.; ACHTMAN, M. y SPRATT, B. G. (1998): «Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms»; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95); pp. 3140-3145.
- MINSAVAGE, G. V.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS, D. L.; LEITE, R. M. V. B. C. y STALL, R. E. (1994): «Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue»; *Phytopathol.* (84); pp. 456- 461.
- MONTES-BORREGO, M.; LOPES, J. R. S.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. y LANDA, B. B. (2015): «Combined use of a new SNP-based assay and multilocus SSR markers to assess genetic diversity of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* infecting citrus and coffee plants»; *Int. Microbiol.* (18); pp. 13-24.

- OLIVEIRA, A. C.; VALLIM, M. A.; SEMIGHINI, C. P.; ARAÚJO, W. L.; GOLDMAN, G. H. y MACHADO, M. A. (2002): «Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay»; *Phytopathol.* (92); pp. 1048-1054.
- OUYANG, P.; ARIF, M.; FLETCHER, J.; MELCHER, U. y CORONA, F. M. O. (2013): «Enhanced reliability and accuracy for field deployable bioforensic detection and discrimination of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, causal agent of citrus variegated chlorosis using Razor Ex technology and Taq-Man quantitative PCR»; *Plos One* (8); p. e81647.
- POOLER M. R. y HARTUNG, J. S. (1995): «Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis»; *Current Microbiology* (31); pp. 377-381.
- RODRIGUES, J. L. M.; SILVA-STENICO, M. E.; GOMES, J. E.; LOPES, J. R. S. y TSAI, S. M. (2003): «Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* Sequences»; *Appl. Environ. Microbiol.* (69); pp. 4249-4255.
- SCALLY, M.; SCHUENZEL, E. L.; STOUTHAMER, R. y NUNNEY, L. (2005): «Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity»; *Appl. Environ. Microbiol.* (71); pp. 8491-8499.
- SCHAAD, N. W.; OPGENORTH, D. y GAUSH, P. (2002): «Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines»; *Phytopathol.* (92); pp. 721-728.
- YUAN, X.; MORANO, L.; BROMLEY, R.; SPRING-PEARSON, S.; STOUTHAMER, R. y NUNNEY, L. (2010): «Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States»; *Phytopathol.* (100); pp. 601-611.

X. fastidiosa en las Islas Baleares

Diego Olmo^a, Alicia Nieto^a, David Borràs^a, Marina Montesinos^a,
Francesc Adrover^a, Alejandro Urbano^b, Aura Pascual^b, Eduardo Moralejo^d,
Juan de Dios García^a, Omar Beidas^c y Andreu Juan^c

^aLaboratorio Oficial de Sanidad Vegetal de las Islas Baleares.
Serveis de Millora Agrària i Pesquera. Govern Balear,
Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca,

^bTRAGSA. Empresa de Transformación Agraria. Delegación de Baleares,

^cServicio de Agricultura. Govern Balear, Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca,

^dInvestigador colaborador con el Servicio de Agricultura. Govern Balear,
Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca

1. Situación de *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares

La primera detección de *X. fastidiosa* en España se produjo en la comunidad autónoma de las Islas Baleares en octubre de 2016, concretamente en la localidad de Porto Cristo del municipio de Manacor, al este de la isla de Mallorca. Posteriormente hubo nuevas detecciones tanto en la propia isla de Mallorca como en las islas de Ibiza y Menorca.

1.1. Antecedentes

Como consecuencia de la implementación del protocolo nacional de prospecciones de *X. fastidiosa* y la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789 de 18 de mayo de 2015 sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*), las autoridades en materia de sanidad vegetal de las Islas Baleares iniciaron las prospecciones de este organismo nocivo para los vegetales en 2015. De esta manera, en el Laboratorio Oficial de Sanidad Vegetal de las Islas Baleares (LOSVIB) se analizaron durante 2015 un total de 110 muestras de 9 especies vegetales (naranja [*Citrus sinensis*], limonero [*Citrus limon*], olivo [*Olea europaea*], adelfa [*Nerium oleander*], lechera del cabo [*Polygala myrtifolia*], albaricoquero [*Prunus armeniaca*], cerezo [*Prunus avium*], almendro [*Prunus dulcis*] y melocotonero [*Prunus persica*]) procedentes de 22 puntos de inspección. Los análisis se realizaron mediante serología (ELISA kit LOEWE®) y PCR convencional (Minsavage

et al., 1994), descritos en el protocolo de diagnóstico de la EPPO (PM 7/24 [2]). Todas las muestras resultaron negativas.

En 2016, en el LOSVIB, desde enero hasta mayo se analizaron por ELISA y PCR convencional 147 muestras de 19 especies vegetales (lima mejicana [*Citrus aurantifolia*], clementino [*Citrus clementina*], mandarino Ponkan [*Citrus reticulata*], mandarino común [*Citrus deliciosa*], limonero, naranjo dulce [*Citrus sinensis*], kumquat [*Fortunella* sp.], laurel [*Laurus nobilis*], *Metrosideros* sp., mirto [*Myrtus* sp.], adelfa, olivo, lechera del cabo, cerezo, almendro, encina [*Quercus ilex*], romero [*Rosmarinus officinalis*], *Westringia fruticosa* y *Westringia longifolia*) procedentes de 24 puntos de inspección. Todos los resultados fueron negativos.

A partir de junio de 2016, con el objetivo de mejorar la sensibilidad de las técnicas de detección, en el LOSVIB se implantaron como métodos de análisis los protocolos de PCR en tiempo real de Harper *et al.* (2010, 2013) y Francis *et al.* (2006) también descritos en el protocolo de la EPPO. De esta manera, entre junio y septiembre, se analizaron un total de 68 muestras de 15 especies vegetales (mandarino Ponkan, mandarino común, limonero, naranjo dulce, kumquat, laurel, *Metrosideros* sp., adelfa, olivo, lechera del cabo, cerezo, almendro, romero y *Westringia* sp.). Las muestras procedían de 15 puntos de inspección distintos y todas ellas resultaron negativas.

1.2. Primer brote de *X. fastidiosa*

El 6 de octubre de 2016 se detectó un positivo en el LOSVIB mediante las dos reacciones de PCR en tiempo real anteriormente citadas, en una muestra de *Prunus avium* (cerezo), procedente de una inspección en un ‘Garden Center’ situado en Porto Cristo (Manacor). Se envió una parte de la muestra, compuesta por varios brotes con hojas, al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de Bacterias Fitopatógenas (IVIA, Valencia). Tras inspeccionar de nuevo el lugar se comprobó que había otros 3 cerezos del mismo lote de origen que el ejemplar positivo; estos fueron muestreados y se enviaron al LNR 24 muestras de brotes con hojas tomadas en distintos puntos de la copa de los cuatro cerezos. El 28 de octubre de 2016 el LNR confirmó la detección por PCR en tiempo real (tanto con el protocolo de Harper *et al.*, 2010, 2013, como con el de Francis *et al.*, 2006) en tres de los cuatro cerezos y el 4 de

noviembre se caracterizó en el laboratorio de «Biología y Ecología de la microbiota del suelo» del Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC, Córdoba) que la subespecie detectada en los cerezos era *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (Olmo *et al.*, 2017).

Figura 1. Localización del primer positivo de *X. fastidiosa* en las Islas Baleares, y zona tampón de 10 km alrededor de mismo (círculo rojo)



1.3. Situación actual de las detecciones de Xylella fastidiosa

Paralelamente a las inspecciones, los muestreos y los análisis de la zona demarcada (zona infestada + zona tampón) establecida al implementar las medidas de la Decisión 2015/789, también se muestreó en parcelas de cultivo, jardines y terrenos forestales de otras zonas de Mallorca, así como de las otras islas del archipiélago balear.

Inesperadamente, los resultados de los análisis de las muestras de dichas prospecciones mostraron numerosos nuevos casos de muestras positivas en diversas especies vegetales cultivadas, silvestres y ornamentales, incluyendo

acebuche, almendro, ciruelo, olivo, vid y *Polygala myrtifolia*, entre otros. Estos nuevos positivos obtenidos en los análisis del LOSVIB se confirmaron en el LNR, a partir de muestras vegetales o muestras de ADN.

Además, los resultados de los análisis para la determinación de la subespecie han mostrado, hasta ahora, la presencia de tres subespecies de *X. fastidiosa*, concretamente *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* y *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* en Mallorca, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* en Menorca y *X. fastidiosa* subsp. *pauca* en Ibiza.

1.4. Vectores

Hasta la fecha, con solo una campaña de muestreos (primavera-verano 2017), el estudio de los potenciales insectos vectores implicados en la transmisión de *X. fastidiosa* en Baleares no ha mostrado resultados sobre cuál o cuáles serían las especies vectoras implicadas en las islas. El estudio se centró en la determinación de la presencia de poblaciones del único vector encontrado por el momento en Italia (*Philaenus spumarius*) y especies cercanas de la familia Aphrophoridae. Este trabajo se realizó mediante capturas tanto en la cubierta vegetal espontánea asociada a los cultivos, como en la copa de los árboles cultivados, mediante aspiración o manguero. Hasta la fecha de publicación de este libro, se habían muestreado varias parcelas de vid, olivo, almendro y cítricos, obteniendo un total de 39 adultos (27 *Neophilaenus campestris*, 1 *Neophilaenus lineatus*, 11 *Philaenus spumarius*). Las primeras capturas fueron en abril, y las últimas en junio. Sin embargo, los análisis por PCR en tiempo real para *X. fastidiosa* han resultado negativos en todos los casos.

2. Detección de *Xylella fastidiosa* en olivo, almendro, vid, frutales y ornamentales

2.1. Hospedantes, subespecies y genotipos en las Islas Baleares

Desde la detección del primer brote en octubre de 2016 hasta septiembre de 2017, se analizaron 2.882 muestras vegetales de 147 especies vegetales para la detección de la bacteria, de las cuales 458, correspondientes a 14 especies vegetales diferentes, resultaron positivas (Tabla 1).

En las Tablas 2, 3 y 4 se muestran los datos actualizados a fecha de 15 de septiembre de 2017 con los positivos de *X. fastidiosa* por especie vegetal en Mallorca, Ibiza y Menorca. Mientras que en las Figuras 2, 3 y 4 se muestran mapas de distribución de positivos en las mismas islas. Cabe mencionar que, aunque se ha muestreado y se han analizado también muestras de Formentera, hasta la fecha mencionada no se han detectado muestras positivas como se puede apreciar en la Tabla 5.

Tabla 1. Muestras analizadas, resultados positivos y porcentaje de positivos obtenidos en las Islas Baleares, entre octubre de 2016 y 15 de septiembre de 2017 respecto a la detección de *Xylella fastidiosa*

Muestras analizadas en las Islas Baleares	Núm. análisis	Núm. positivos	%
Total	2.882	458	16
Acacia de hoja azul (<i>Acacia saligna</i>)	27	3	11
Jaguarzo (<i>Cistus monspeliensis</i>)	14	1	7
Higuera (<i>Ficus carica</i>)	204	16	8
Fresno de hoja estrecha (<i>Fraxinus angustifolia</i>)	5	2	40
Lavanda (<i>Lavandula dentata</i>)	29	5	15
Adelfa (<i>Nerium oleander</i>)	190	6	3
Olivo (<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>)	388	50	13
Acebuche (<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>)	645	180	28
Lechera del cabo (<i>Polygala myrtifolia</i>)	73	19	26
Cerezo (<i>Prunus avium</i>)	13	3	23
Ciruelo (<i>Prunus domestica</i>)	9	1	11
Almendro (<i>Prunus dulcis</i>)	365	143	39
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	113	9	8
Vid (<i>Vitis vinifera</i>)	147	20	14
Otras 133 especies vegetales	660	0	0

Tabla 2. Número de muestras analizadas, resultados positivos y porcentaje de positivos obtenidos en Mallorca entre el 6 de octubre de 2016 y el 15 de septiembre de 2017, respecto a la detección de *Xylella fastidiosa*

Muestras analizadas en Mallorca (6/10/2016 a 15/09/2017)	Núm. análisis	Núm. positivos	%
Total	1.682	299	18
Acacia de hoja azul (<i>Acacia saligna</i>)	9	1	11
Jaguarzo (<i>Cistus monspeliensis</i>)	11	1	9
Higuera (<i>Ficus carica</i>)	155	15	10
Fresno de hoja estrecha (<i>Fraxinus angustifolia</i>)	5	2	40
Lavanda (<i>Lavandula dentata</i>)	6	2	33
Adelfa (<i>Nerium oleander</i>)	98	1	1
Olivo (<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>)	205	13	6
Acebuches (<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>)	273	86	32
Lechera del cabo (<i>Polygala myrtifolia</i>)	58	14	24
Cerezo (<i>Prunus avium</i>)	11	3	27
Ciruelo (<i>Prunus domestica</i>)	9	1	11
Almendro (<i>Prunus dulcis</i>)	268	133	50
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	27	7	26
Vid (<i>Vitis vinifera</i>)	124	20	16
Otras 118 especies vegetales	423	0	0

Figura 2. Distribución de muestras analizadas de Mallorca para *X. fastidiosa* (positivos en rojo y negativos en verde)



Tabla 3. Número de muestras analizadas, resultados positivos y porcentaje de positivos obtenidos en Ibiza entre el 6 de octubre de 2016 y el 15 de septiembre de 2017, respecto a la detección de *Xylella fastidiosa*

Muestras analizadas en Ibiza (6/10/2016 a 15/09/2017)	Núm. análisis	Núm. positivos	%
Total	661	90	14
Acacia de hoja azul (<i>Acacia saligna</i>)	14	2	14
Lavanda (<i>Lavandula</i> sp.)	16	3	14
Adelfa (<i>Nerium oleander</i>)	72	5	7
Olivo (<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>)	110	30	27
Acebuches (<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>)	142	44	31
Lechera del cabo (<i>Polygala myrtifolia</i>)	5	2	20
Almendro (<i>Prunus dulcis</i>)	66	3	5
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	59	1	2
Otras 46 especies vegetales	177	0	0

Figura 3. Distribución de muestras analizadas de Ibiza para *X. fastidiosa* (positivos en rojo y negativos en verde)



Tabla 4. Número de muestras analizadas, resultados positivos y porcentaje de positivos en Menorca entre octubre de 2016 y el 15 de septiembre de 2017, respecto a la detección de *Xylella fastidiosa*

Muestras analizadas en Menorca (6/10/2016 a 15/09/2017)	Núm. análisis	Núm. positivos	%
Total	415	69	17
Higuera (<i>Ficus carica</i>)	19	1	5
Olivo (<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>)	22	7	32
Acebuche (<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>)	220	50	23
Lechera del cabo (<i>Polygala myrtifolia</i>)	3	3	100
Almendro (<i>Prunus dulcis</i>)	22	7	32
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	4	1	25
Otras 28 especies vegetales	125	0	0

Figura 4. Distribución de muestras analizadas de Menorca para *X. fastidiosa* (positivos en rojo y negativos en verde)

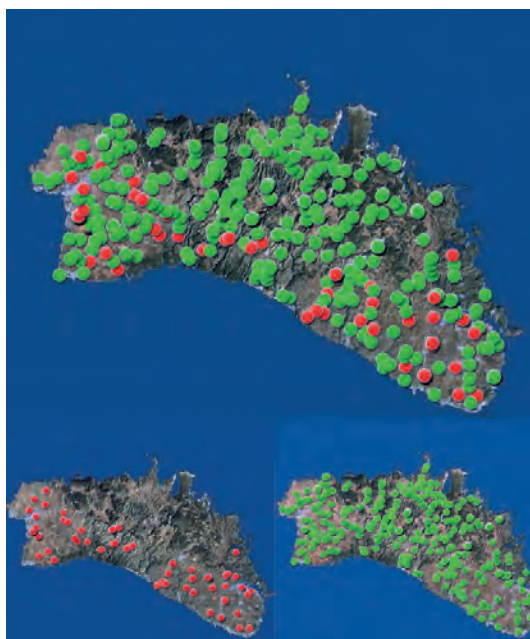


Tabla 5. Número de muestras analizadas procedentes de Formentera entre octubre de 2016 y el 15 de septiembre de 2017

Muestras analizadas en Formentera (6/10/2016 a 15/09/2017)	Núm. análisis	Núm. positivos
Total	124	0
Acacia de hoja azul (<i>Acacia saligna</i>)	4	0
<i>Citrus</i> sp.	1	0
Naranja amargo (<i>Citrus aurantium</i>)	1	0
Enebro (<i>Juniperus oxycedrus</i>)	4	0
Sabina (<i>Juniperus phoenicia</i>)	6	0
Lavanda (<i>Lavandula dentata</i>)	6	0
Adelfa (<i>Nerium oleander</i>)	6	0
Olivo (<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>)	51	0
Acebuches (<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>)	10	0
Lechera del cabo (<i>Polygala myrtifolia</i>)	3	0
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	9	0
Otras 46 especies vegetales	23	0

Figura 5. Distribución de muestras analizadas de Formentera para *X. fastidiosa* (todas negativas hasta 15/09/2017)



Como se observa en las figuras anteriores, la distribución de los brotes positivos en las islas de Mallorca, Menorca e Ibiza es amplia. Cada positivo determina una zona infectada, por lo que hasta el 15 de septiembre de 2017 en las Islas Baleares existían 458 zonas infectadas (radio de 100 m), y debido a que a principios de la anualidad 2017 se decidió demarcar la totalidad del territorio balear dada la dispersión de la bacteria el resto de superficie se considera zona tampón. Por todo ello, se entiende que la zona demarcada (ZI + ZT), establecida según la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789, ocupa ya el 100 % del territorio balear.

Respecto a las determinaciones de las subespecies y genotipos de *X. fastidiosa*, los análisis se realizaron en el laboratorio de «Biología y Ecología de la microbiota del suelo» del IAS-CSIC, partiendo de ADN extraído de las muestras positivas y enviado por el LNR o bien por el LOSVIB. Se determinó mediante amplificaciones y secuenciaciones del gen del factor sigma 70 de la RNA polimerasa y la técnica de tipificación multilocus de secuencias (MLST). Los resultados mostraron una gran diversidad genotípica, encontrándose en el archipiélago balear 3 subespecies de *X. fastidiosa* y 4 genotipos distintos, dos de ellos no descritos hasta la fecha. Concretamente, como se puede observar en la Tabla 6, hasta el 15 de septiembre de 2017 se había detectado y caracterizado la presencia en Mallorca de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* del grupo genético ST1 y de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* del grupo genético ST7 y *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* de un grupo genético cercano al ST6 pero no descrito hasta la fecha. En Menorca todos los positivos caracterizados se correspondían con este último de Mallorca. Mientras que en Ibiza todos los positivos caracterizados corresponden a *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, y se les ha asignado un nuevo grupo genético, ST80, ya que no se había descrito hasta la fecha.

Estos datos indican que ha habido múltiples introducciones de *X. fastidiosa* en las islas. Además, su amplia distribución hace suponer que estas entradas sucedieron hace varios años.

Tabla 6. Subespecies y ST de *Xylella fastidiosa* identificados en las muestras de Baleares según isla y especie vegetal hospedante

Isla	Hospedante	subsp.	ST
Mallorca	Almendro Cerezo Jaguarzo Lechera del cabo Vid	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i>	ST 1
	Lechera del cabo	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	ST 7
	Acacia Acebuche Fresno Higuera Lavanda Lechera del cabo Olivo	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	Nuevo,* cercano a ST 6
	Adelfa Ciruelo Romero	En estudio	En estudio
Ibiza	Acacia Acebuche Lavanda Lechera del cabo Olivo	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i>	ST 80 (Nuevo)*
	Adelfa Almendro Romero	En estudio	En estudio
Menorca	Acebuche Lechera del cabo Olivo Romero	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i>	Nuevo*, cercano a ST 6
	Higuera Almendro	En estudio	En estudio

* Nuevo: indica un ST no previamente descrito, con una secuencia distinta de las ya estudiadas.

2.2. Síntomas observados

Los síntomas que se han observado en las plantas infectadas son variables e inespecíficos. Dependiendo de la especie vegetal, se ha observado decaimiento, disminución del desarrollo, clorosis foliar, abarquillamiento, seca de ápices y márgenes de las hojas y defoliación. No obstante, plantas con uno o varios de estos mismos tipos de síntomas resultaron negativas, lo cual puede explicarse debido a que los síntomas que causa *X. fastidiosa*, al obstaculizar el flujo de agua y nutrientes por el xilema, se suponen muy similares a los que podrían causar otras patologías que produjeran igualmente un flujo deficiente de savia bruta, desde enfermedades fúngicas hasta sequía, o que en la muestra tomada la cantidad de bacteria fuese baja para detectarla. Por otro lado, también se ha detectado un considerable número de muestras positivas sin síntomas o asintomáticas.

En cualquier caso, en este apartado se describirán los síntomas más destacables que se observaron en algunos hospedantes, sin que con ello se quiera expresar una asociación inequívoca de dichos síntomas a la infección por *X. fastidiosa*.

Olivo y acebuche

En observaciones en campo, la seca de brotes y ramas acompañada de defoliación (Figuras 6 y 7) es lo más destacable en los casos positivos de *Olea europaea*, especialmente en los acebuches (*O. europaea* var. *sylvestris*). Aunque, si se observaban detenidamente las hojas, estas no siempre presentaban un mismo síntoma que se pudiera asociar a *X. fastidiosa*. En ocasiones se podían observar áreas secas y marrones con distribución irregular en las hojas y abarquillamiento de las hojas hacia el envés (Figura 8). En otros casos estas secas se encontraban solo en el extremo apical de la hoja (Figura 9). Algunas muestras positivas mostraban clorosis marginales y apicales en las hojas (Figura 10). Cabe destacar otro síntoma observado en algunas muestras positivas, consistente en una muy acusada clorosis del nervio central de las hojas unida a una seca o necrosis del ápice, aunque algunas muestras con el mismo síntoma fueron negativas (Figura 11). No obstante, también se detectaron muestras positivas que eran completamente asintomáticas (Figura 12).

Figura 6. Acebuches infectados por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando defoliación y seca de ramas



Figura 7. Masa forestal con acebuches infectados por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando defoliación generalizada y seca de ramas.



Figura 8. Síntomas en hojas de acebuche (A, B) y olivo (C) infectadas por *X. fastidiosa* en Mallorca

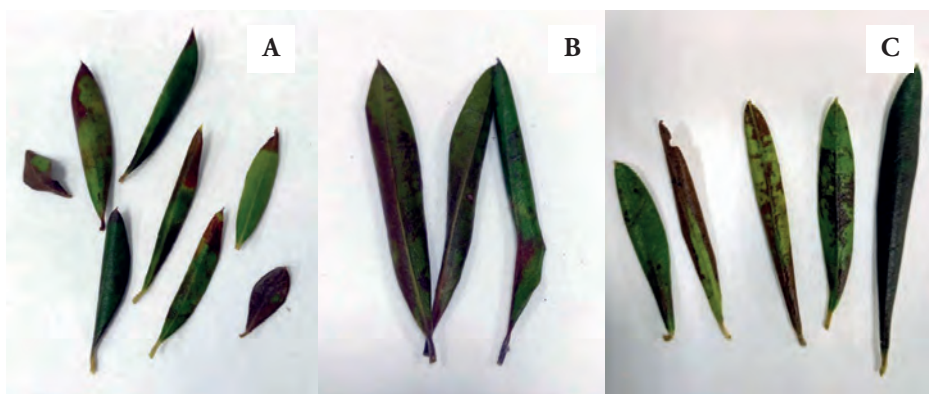


Figura 9. Hojas de olivo infectadas por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando secas apicales



Figura 10. Hojas de olivo infectadas por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando clorosis apicales y marginales



Figura 11. Hojas de olivo mostrando clorosis y secas apicales y marginales: positivo (A) y negativo (B) para *X. fastidiosa*



Figura 12. Hojas asintomáticas de acebuche, positivas para *X. fastidiosa*



Almendro

En almendros, la mayoría de las muestras positivas mostraban síntomas de clorosis y seca de los extremos apicales y los márgenes de las hojas evolucionando a una seca generalizada del follaje de la copa (Figura 13), similares a los descritos en California para la enfermedad conocida como *almond leaf scorch* (debido al aspecto quemado de las hojas) o *golden death* (debido al color amarillo del follaje en los estadios finales). No obstante, algunas muestras que no delataban estos síntomas también resultaron positivas.

Figura 13. Almendros infectados por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando necrosis marginales y apicales del limbo foliar



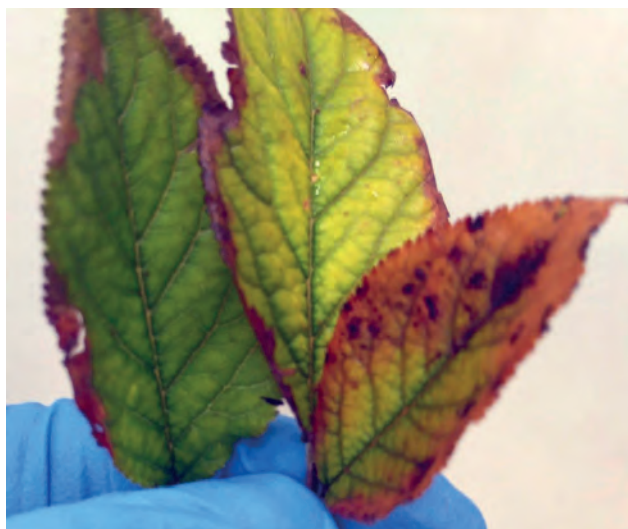
Cerezo y ciruelo

Los cerezos (Figura 14) y el ciruelo (Figura 15) positivos presentaban decaimiento generalizado y defoliación. En hoja se observaba clorosis y necrosis marginales de los limbos.

Figura 14. Hoja de cerezo infectada por *X. fastidiosa*, en Mallorca



Figura 15. Hoja de ciruelo infectada por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando necrosis marginales



Vid

Las muestras positivas mostraban decaimiento, seca de racimos, clorosis y necrosis marginales en las hojas, con halos amarillos en variedades blancas (Figura 16) y rojizos en variedades tintas (Figura 17). Las hojas que mostraron síntomas solían presentar menor tamaño, deformaciones y asimetría. En algunas ocasiones presentaron «islas verdes» o zonas no agostadas en sarmientos. En definitiva, síntomas similares a los descritos para la enfermedad de Pierce en Estados Unidos.

Figura 16. Hojas de vid variedad blanca ‘Moscatel’ infectada por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando necrosis marginales, clorosis y asimetría



Figura 17. Hojas de vid variedad blanca ‘Parellada’ infectada por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando necrosis de márgenes con halo clorótico y asimetría. Racimo desecado de la misma variedad



Figura 18. Hojas de vid variedad tinta 'Callet' infectada por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando necrosis marginales con halos de tonos rojizos



Polygala myrtifolia

En general, las polígalas (lechera del cabo) infectadas presentaban defoliación, clorosis en hoja y especialmente una seca de los extremos apicales, tanto en Mallorca (*X. fastidiosa* subsp. *multiplex* y *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*) como en Ibiza (*X. fastidiosa* subsp. *pauca*) (Figura 19).

Figura 19. Plantas de *Polygala myrtifolia* infectadas por *X. fastidiosa* en Mallorca (A, B) e Ibiza (C), mostrando secas de ápices de las hojas



Acacia

Los síntomas observados en las acacias positivas tanto en Mallorca (*X. fastidiosa* subsp. *multiplex*) como en Ibiza (*X. fastidiosa* subsp. *pauca*) fueron defoliación, seca y necrosis de brotes y de los márgenes de las hojas.

Figura 20. Muestras de *Acacia saligna* infectadas por *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* en Mallorca (A, B), mostrando seca de ápices y márgenes en las hojas (A) y seca de brotes (B), y árbol entero de la misma especie en Ibiza también infectado por *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, mostrando defoliación (C)



Romero

En algunas ocasiones las muestras de romero positivas mostraron decaimiento generalizado, defoliación, seca y una coloración marrón en las hojas (Figura 21A), pero en otras ocasiones mostraron hojas con puntas secas y una franja clorótica por debajo (Figura 21B).

Figura 21. Muestras de romero infectadas por *X. fastidiosa* en Mallorca, con seca de hojas, tonos marrones (A) y puntas secas con franja clorótica (B)



Lavandula sp.

Los síntomas observados en las muestras de *Lavandula* positivas comprendían decaimiento generalizado y seca de hojas, comenzando por los extremos apicales y mostrando en algunos casos franjas cloróticas bajo la seca (Figura 22).

Figura 22. Muestras de *Lavandula* infectadas por *X. fastidiosa* en Ibiza



Jaguarzo

Las muestras positivas de *Cistus monspeliensis* mostraban clorosis junto con seca y necrosis de los márgenes de las hojas (Figura 23).

Figura 23. Muestra de *Cistus monspeliensis* infectada por *X. fastidiosa* en Mallorca, mostrando clorosis y seca de hojas



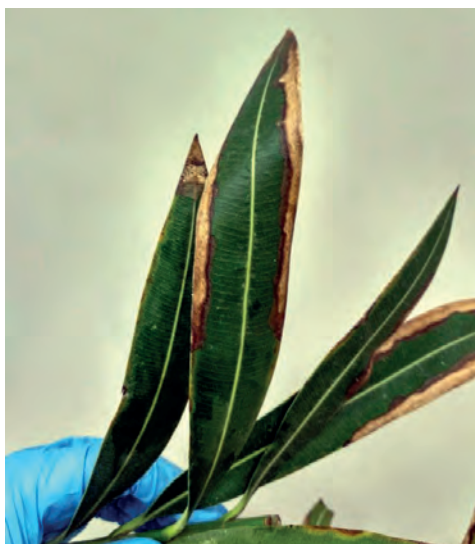
Adelfa

Las muestras positivas mostraban secas en los bordes de las hojas, si bien algunas muestras analizadas con esta misma sintomatología resultaron negativas (Figura 25). Asimismo, una muestra totalmente asintomática resultó positiva (Figura 24B).

Figura 24. Muestras de *Nerium oleander* positivas para *X. fastidiosa*, sintomática (A) y asintomática (B)



Figura 25. Muestra negativa de *Nerium oleander* mostrando necrosis de los tejidos de los márgenes de las hojas. Los análisis para *X. fastidiosa* resultaron negativos



Fraxinus angustifolia

Los fresnos positivos mostraban una acusada defoliación como se aprecia en la Figura 26.

Figura 26. *Fraxinus angustifolia* infectado por *X. fastidiosa* en Mallorca



2.3. Aislamiento de la bacteria

Aunque para las detecciones de *Xylella fastidiosa*, siguiendo el protocolo propuesto por la EPPO (EPPO, 2016), no es necesario el aislamiento en medio de cultivo para dar por positiva una muestra, este es muy importante para abordar estudios posteriores (estudios genéticos de las cepas, inoculaciones, etc.). Sin embargo, una característica de esta bacteria es la dificultad de su aislamiento en medio de cultivo y, aunque en el protocolo EPPO se describe la metodología aconsejada, se suman diversos factores que influyen mucho en la obtención de resultados positivos en los aislamientos, entre ellos la cantidad de bacterias en la muestra, o el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y la realización de los aislamientos.

A partir de muestras vegetales de Baleares se han conseguido más de una docena de aislamientos positivos hasta la fecha de publicación de este libro, provenientes de muestras de cerezo, almendro y vid.

3. Medidas de control

Como consecuencia del primer brote de *X. fastidiosa* en Mallorca, se aplicaron las medidas fitosanitarias dirigidas a la erradicación que se establecen en la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789.

Posteriormente, en vista de la aparición de nuevos brotes positivos ampliamente distribuidos tanto en Mallorca como en Menorca e Ibiza, se tomó la decisión de prohibir la salida de material vegetal para plantación de hospedantes especificados. Así mismo se prohibió el movimiento de dicho material vegetal entre la isla de Ibiza y el resto del territorio balear, dado que en Ibiza la subespecie presente es distinta a la de las otras islas (Resolución del consejero de Medio Ambiente, Agricultura y Pesca de 10 de febrero de 2017).

Desde el Servicio de Agricultura del Gobierno Balear se redactó un manual de buenas prácticas y gestión del suelo y de la flora adventicia para luchar contra los vectores potenciales, y se realizaron numerosas actividades de divulgación y comunicación (jornadas, charlas, trípticos, carteles, etc., Figura 27) dirigidas tanto a representantes del sector agrario como a la sociedad balear en general. Así mismo, se impartió un curso en Mallorca para inspectores de sanidad vegetal de otras regiones de España, durante el cual los asistentes pudieron ver algunos síntomas en campo y conocer las actuaciones que se llevan a cabo en Baleares.

Figura 27. Ejemplos de carteles y publicaciones acerca de *X. fastidiosa* elaboradas por el Gobierno Balear y el MAPAMA



3.1. Aplicación de las medidas de la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789

Debido a la aparición del primer brote, se estableció un plan de erradicación, determinando una zona infectada (ZI), es decir, un área circular con un radio de 100 metros alrededor de la ubicación de los cerezos positivos, y una zona tampón (ZT), con un radio de 10 km, denominándose la zona demarcada (ZD) a la suma de las zonas ZI y ZT.

Se eliminaron, por incineración, los ejemplares infectados, así como todas las plantas huéspedes de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* de las especies vegetales de los listados de hospedantes en Europa (artículo 1b de la Decisión (EU) 2015/2417), que en aquel momento eran *Nerium oleander* y *Prunus avium*, siendo esta última incluida en los listados oficiales de la UE a raíz del caso de Mallorca, y se prohibió su plantación en la zona infectada.

Asimismo, por el principio de precaución fitosanitaria, se eliminaron por incineración todas las plantas hospedantes de *X. fastidiosa* listadas en la base de datos de la Comisión Europea de cualquier subespecie de dicha bacteria, resultando un total de 1.921 ejemplares de 41 especies vegetales diferentes.

Se realizaron nuevos muestreos de manera exhaustiva de otras especies sensibles tanto en la zona infectada como en la zona tampón, estableciéndose para ello una cuadrícula de 100 por 100 m dentro de la zona tampón que determinaba las áreas a muestrear.

Además, como se establece en la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789 se prohibió el movimiento de vegetales especificados (hospedantes a cepas de *X. fastidiosa* europeas y no europeas), desde la zona infectada hacia la zona tampón y desde la zona demarcada hacia zonas libres de la bacteria. Para difundir esta medida, se colocaron carteles (Figura 28) en las carreteras y caminos de acceso a la zona demarcada. Además, en los puntos de venta de plantas dentro de la zona demarcada, se hace firmar una hoja de compromiso a los compradores de vegetales especificados, mediante la cual dan su conformidad acerca del conocimiento de la prohibición del movimiento de las plantas adquiridas hacia zonas libres de *X. fastidiosa*.

Figura 28. Cartel recordatorio de la prohibición de traslado de vegetales especificados que se colocaron en los caminos de acceso a la zona demarcada del primer brote de *X. fastidiosa* en Mallorca



3.2. Prohibición de salida de material vegetal especificado de las Islas Baleares y desde Ibiza al resto de islas

La prohibición se realizó mediante la Orden APM/21/2017, por la que se establecen medidas específicas de prevención en relación con la bacteria *X. fastidiosa*, y la Resolución del consejero de Medio Ambiente, Agricultura y Pesca de 26 de enero de 2017 por la cual se declara la existencia de la plaga *X. fastidiosa* (Wells *et al.*), en todo el territorio de las Islas Baleares, se adoptan medidas fitosanitarias cautelares y de contención para evitar la propagación de la bacteria y se prohíbe la salida desde el territorio de la comunidad autónoma de las Islas Baleares de todos los vegetales para la plantación, excepto las semillas, pertenecientes a los géneros o especies que estén incluidos como vegetales especificados en la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789

Asimismo, mediante Resolución del consejero de Medio Ambiente, Agricultura y Pesca de 10 de febrero de 2017, se prohíbe la salida desde el territorio de la isla de Ibiza hacia el resto de las Islas Baleares de todos los vegetales para la plantación, excepto las semillas, que estén incluidos como vegetales especificados en la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789.

Para el control del cumplimiento de estas prohibiciones se ha creado una comisión mixta entre la Guardia Civil y la Dirección General de Agricultura del Gobierno balear.

3.3. Buenas prácticas para la prevención de *Xylella fastidiosa*

El Servicio de Agricultura del Gobierno balear publicó en mayo de 2017 una guía de buenas prácticas agronómicas encaminadas a prevenir en los cultivos las infecciones por *X. fastidiosa*.

La presencia de *X. fastidiosa* en las Islas Baleares obliga, tanto a la Administración competente en materia de agricultura como al sector primario, a utilizar todas las herramientas de control de que disponen. Sin embargo, y pese a que esta bacteria es un problema común, las actuaciones de prevención pueden ser diferentes en la agricultura convencional o integrada que en la ecológica. A fin de presentar las líneas de actuación en materia de prevención fitosanitaria contra la bacteria para que cada agricultor actúe según la gestión de su explotación (convencional, integrada o ecológica), el documento recoge información básica común sobre la enfermedad, la transmisión, la sintomato-

logía, la descripción del vector y, finalmente, las buenas prácticas agronómicas para la prevención de la bacteria que prevén las diferentes estrategias.

La guía recoge los siguientes apartados: a) buenas prácticas de gestión del suelo; b) buenas prácticas de gestión de la fertilización; c) buenas prácticas de gestión del riego; d) buenas prácticas de poda y gestión de los restos de poda; e) control de los vectores; f) reducción de la atraktividad del cultivo; g) calendario de buenas prácticas agronómicas para la prevención y el control de *X. fastidiosa*. Puede consultarse en la página web del MAPAMA: <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/xylella-fastidiosa/> y en la de Sanidad Vegetal del Gobierno Balear: <http://sanitatvegetal.caib.es>.

4. Aplicación del plan de actuación para combatir *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares

Dado que el protocolo de erradicación en cultivos al aire libre es inviable, debido a que la bacteria está extendida por la mayoría del territorio de las Islas Baleares, además de tener un rango de hospedantes muy amplio y de la presencia de numerosos vectores potenciales, el Gobierno de las Islas Baleares estableció que el único escenario posible era la contención, quedando así plasmado en el artículo 3 de la Resolución del consejero de Medio Ambiente, Agricultura y Pesca de 26 de enero de 2017, por la que se declara la existencia de la plaga *X. fastidiosa* (Wells *et al.*) en todo el territorio de las Islas Baleares y se adoptan medidas fitosanitarias cautelares y de contención para evitar su propagación (BOIB 14, 2 de febrero de 2017), que establece la aplicabilidad del artículo 7 de la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789.

Se están eliminando y destruyendo todos los vegetales y partes de vegetales que han sido inspeccionados y en los que la infección se ha demostrado mediante la realización de análisis, además de muestrearse los vegetales localizados en un radio de 100 metros alrededor de los infectados, especialmente las plantas hospedantes con independencia de su estado sanitario, los vegetales donde la infección por *X. fastidiosa* esté establecida y los vegetales con síntomas de una posible infección, o sospechosos de estar infectados por la bacteria.

Esta eliminación se lleva a cabo de tal manera que no quede ningún resto del vegetal, y se toman todas las precauciones necesarias para evitar la propagación de *X. fastidiosa* durante y después de la eliminación. La destrucción se lleva a cabo in situ o en un lugar cercano designado a tal fin, mediante quema

controlada. De los 458 plantas positivas que se han detectado hasta la fecha, se han eliminado 271 (aproximadamente el 60 %).

El Gobierno de las Islas Baleares está intensificando las inspecciones oficiales para la detección de hospedantes afectados en cuadrículas de 1 km x 1 km para poder obtener una visión general de la situación de la dispersión de la enfermedad en el territorio de las Islas Baleares. Se han realizado prospecciones visuales en casi el 70 % del territorio balear, y se han tomado muestras de aproximadamente el 20 % de las cuadrículas de 1 km x 1 km establecidas.

Se está discutiendo en el seno de la Comisión Europea una modificación de la Decisión de ejecución (UE) 2015/789, donde el Gobierno Balear y el MAPAMA han solicitado la cualificación de las Islas Baleares como zona infectada a los efectos de poder aplicar el protocolo de contención regulado en el artículo 7 de la Decisión.

Referencias bibliográficas

- DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2015/789 de la comisión de 18 de mayo de 2015 sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*); DO L 125 de 21.05.2015; p. 36.
- EPPO (2016): PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*. EPPO Bull, 46: 463–500. doi:10.1111/epp.12327.
- FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA ROSA, J.; DODDAPANENI, H. y CIVEROLO, E. L. (2006): «Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*»; *European Journal of Plant Pathology* (115); pp. 203-213.
- HARPER, S. J.; WARD L. I. y CLOVER G. R. G. (2010, erratum 2013): «Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications»; *Phytopathology* (100); pp. 1282-1288.
- MINSAVAGE, G. V.; THOMPSON, C. M.; HOPKINS D. L.; LEITE, R. M. V. B. C. y STALL R. E. (1994): «Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue»; *Phytopathology* (84); pp. 456-461.

OLMO, D.; NIETO, A.; ADROVER, F.; URBANO, A.; BEIDAS, O.; JUAN., A.; MARCO-NOALES, E.; LÓPEZ, M. M.; NAVARRO, I.; MONTERDE, A.; MONTES-BORREGO, M.; NAVAS-CORTES, J. A. y LANDA, B. B. (2017): «First detection of *Xylella fastidiosa* on cherry (*Prunus avium*) and *Polygala myrtifolia* plants, in Mallorca Island, Spain»; *Plant Disease* (101); pp. 1820.

Xylella fastidiosa en la Comunidad Valenciana

Montserrat Roselló^a, Amparo Ferrer^b, Cristina Peris-Peris^a,
Joan Màxim Llopis^b, Elías Rallo^b, Bryan Pacheco^b, Eva Climent^a,
Ana M. Moreno^a, Esperanza Sansaloni^a, M. Fernanda Gómez^a,
Vicente Nebot^a, Lourdes Rius^a, M. Dolores Jorge^a, Ismael Serrablo^a,
Jose Vicente Saéz^b, Francisco Piñeiro^b, Susana Úbeda^b,
Rafael Estivalis^b, Carola Aragón^b y Vicente Dalmau^b

^aServicio de Seguridad y Control de la Producción Agraria, Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural, Generalitat Valenciana (España, Valencia)

^bServicio de Sanidad Vegetal, Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural, Generalitat Valenciana (España, Valencia)

1. Introducción

En junio de 2016, la Generalitat Valenciana aprobó el Plan de Contingencia Autonómico frente a *X. fastidiosa*, basado en el Plan de Contingencia Nacional, pero adaptado a las características y cultivos específicos de la Comunidad Valenciana. Este plan ha sido revisado en enero del 2017, incrementándose considerablemente las intensidades de prospección en los principales cultivos de nuestra comunidad autónoma (cítricos, viña, olivo, *Prunus* spp. y plantas ornamentales) así como en la gran cantidad de empresas inscritas en nuestros registros como proveedores de material vegetal de reproducción y también en parques y jardines de titularidad pública y privada, todos ellos considerados como puntos críticos de riesgo de introducción de la bacteria en nuestro territorio. Con estas directrices, se han realizado más de 2.000 prospecciones entre 2015 y junio de 2017, principalmente en zonas de mayor riesgo climático para el establecimiento de la enfermedad, como se señala en la Figura 1.

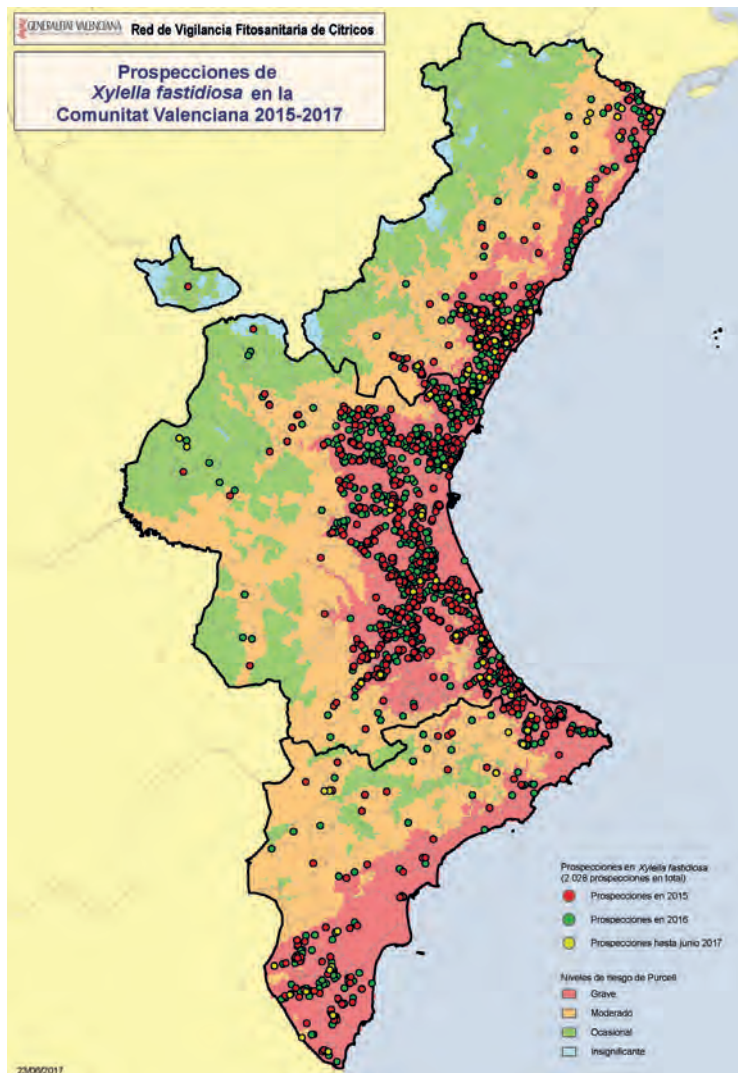
De las prospecciones de material vegetal citadas, en 2015 se analizaron 468 muestras procedentes de viveros y de plantaciones en el Laboratorio de Diagnóstico Fitopatológico (LDF), que es el laboratorio oficial de la Comunidad Valenciana en materia de sanidad vegetal, pertenecientes a especies diferentes (naranja, mandarina, pomelo, cítricos híbridos, olivo, almendro, vid, adelfa, *Choisya ternata* y *Polygala myrtifolia*). En 2016 se analizaron 423 mues-

tras, entre las que se incluyeron nuevas especies, además de las anteriormente citadas (limonero, kumquat, cafeto, ciruelo, albaricoquero, cerezo, laurel, romero, *Prunus mahaleb* y *Quercus ilex*). Todas estas muestras dieron resultados negativos para la detección de *X. fastidiosa*.

El plan de contingencia autonómico también establece una extensa red de trapeo distribuida por todo el territorio de la Comunidad Valenciana, basada en la existente dentro del Plan de Vigilancia Fitosanitaria Citrícola y ampliándola considerablemente. De los 123 puntos de instalación iniciales, se ha ampliado hasta un total de 1.161 puntos donde se colocan y revisan periódicamente trampas cromotrópicas amarillas, para la detección de varios insectos plaga incluidos los posibles vectores descritos para *X. fastidiosa*. Aunque estas trampas no son el método más efectivo para la monitorización de los vectores de *X. fastidiosa* (Capítulo 4), por su operatividad, se mantienen aunque está previsto para la próxima primavera iniciar la monitorización añadiendo otros métodos más eficaces como el manguero, el vareo de ramas, el embolsado y la utilización de sprays pegajosos en los brotes. En la Figura 2 se detallan los puntos de instalación de trampas.

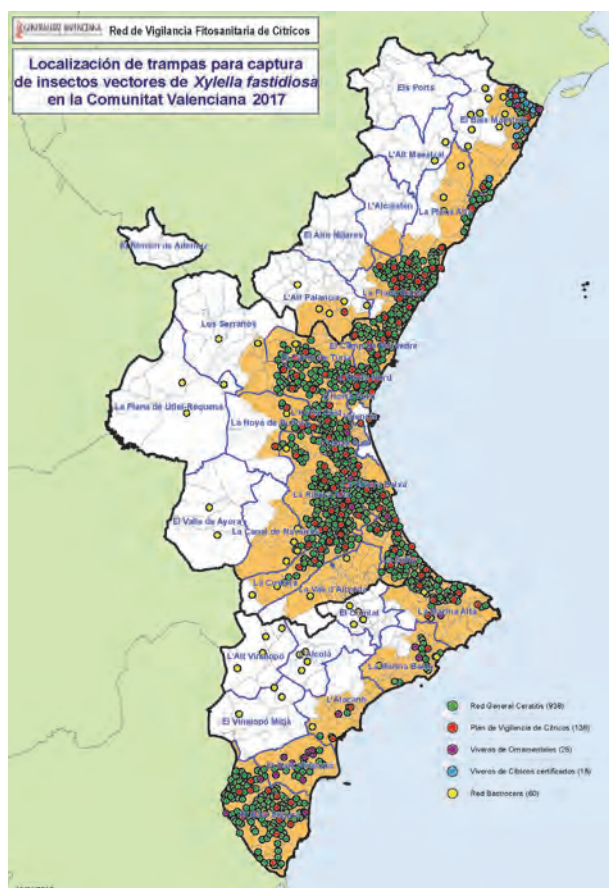
Desde 2015 hasta el 22 de septiembre de 2017, se han revisado más de 44.500 trampas para buscar posibles vectores (afrofóridos, cercópodos, cicádidos o ciudadélidos), con un total de 260 capturas. En los posibles vectores capturados y analizados hasta el momento, no se ha detectado la bacteria en ninguno de ellos mediante procedimientos moleculares (Capítulo 5).

Figura 1. Prospecciones realizadas desde 2015 hasta junio de 2017, superpuestas a las demarcaciones de riesgo climático de establecimiento de enfermedad



Fuente: A. Purcell (1997). Generalitat Valenciana.

Figura 2. Localización de trampas cromotrópicas en la Comunidad Valenciana



Fuente; Generalitat Valenciana.

2. Primer brote de *Xylella fastidiosa* detectado en la Comunidad Valenciana

La primera detección de *X. fastidiosa* en la península ibérica se produjo en la localidad alicantina de El Castell de Guadalest (Comunidad Valenciana, CV), en una parcela de almendros de 30 años y de 0,47 ha, el 23 de junio de 2017, por el Laboratorio Oficial de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural, y fue confirmada el 28 de junio de ese mismo año, como es preceptivo, por el Laboratorio Nacional de

Referencia (LNR) de Bacterias Fitopatógenas del Ministerio de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente (MAPAMA), ubicado en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Valencia).

La detección del primer caso positivo ha sido posible gracias a la colaboración de un agricultor que, tras observar pérdidas de producción en su plantación de almendros de las variedades Marcona y Guara, acudió a la oficina comarcal. Los técnicos de la oficina comarcal se pusieron en contacto con el Servicio de Sanidad Vegetal y sus inspectores se personaron en la parcela y procedieron a la toma de muestras, a pesar de que en esa fecha no se encontró sintomatología compatible con ningún organismo patógeno. Las muestras tomadas en diciembre de 2016 resultaron negativas para la detección de los patógenos *X. fastidiosa*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* y *Pseudomonas* spp. Al tratarse de una época poco favorable para la detección de cualquier patógeno, se acordó volver a muestrear a mediados del mes de mayo de 2017. En esa fecha tampoco se observaron síntomas atribuibles a ninguna patología. Los análisis para la muestra asintomática de almendro cv. Marcona dieron resultados negativos para la detección de *X. arboricola* pv. *pruni* y *Pseudomonas* spp. Sin embargo, utilizando las dos técnicas más sensibles recomendadas en el protocolo EPPO PM 7/24 (2) (EPPO, 2016), la PCR en tiempo real de Harper *et al.* (2010, 2013) y la de Francis *et al.* (2006) (Capítulo 5), se obtuvieron resultados positivos en ambas para la detección de *X. fastidiosa*. Con estos resultados, y según el protocolo mencionado, se considera detectado el patógeno en esa muestra. Al tratarse de una muestra asintomática, probablemente la población bacteriana no era muy alta, por lo que la PCR convencional (Minsavage *et al.*, 1994), que es una técnica de menor sensibilidad que la PCR en tiempo real, resultó negativa. Para la preceptiva confirmación por el Laboratorio Nacional de Referencia, se procedió a una nueva toma de muestras a finales de junio y se confirmó por éste la presencia de la bacteria en las muestras de almendro analizadas. En ese momento, y tras dos semanas de temperaturas inusualmente cálidas en esa zona, los árboles mostraban los síntomas típicos de la quemadura de la hoja del almendro (*almond leaf scorch disease*, ALSD) causada por *X. fastidiosa*. Los análisis correspondientes a la determinación de la subespecie se realizaron en el Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC (Córdoba), e indicaron que se trataba de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* ST6.

3. Sintomatología de *Xylella fastidiosa* en almendro

A finales del mes de junio, los síntomas atribuibles a la quemadura de la hoja del almendro causada por *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* y subsp. *multiplex* en California, eran visibles en las hojas de los almendros afectados. Sin embargo, hay que recordar que estos síntomas no son específicos y pueden confundirse con otros provocados por factores abióticos tales como estrés hídrico o salinidad, o por otros patógenos como hongos de madera, etc.

Un síntoma característico, que puede apreciarse fundamentalmente solo en los primeros momentos, es una tonalidad de la escaldadura ligeramente dorada y que al tacto no es seca ni quebradiza. Esta lesión suele ir precedida de una zona o banda clorótica. Con el tiempo, la escaldadura toma una tonalidad más atabacada y se vuelve más seca y quebradiza, llegando a afectar a la totalidad del árbol. Este síntoma es conocido en California como *Golden death* o muerte dorada

En las Figuras 3 a 7 se muestran diversos aspectos de los síntomas que se han observado en almendros afectados de la zona del primer brote. También se han observado diferencias en cuanto a la manifestación de síntomas de unas variedades de almendro a otras. Los árboles de cultivares tipo 'Marcona' presentan una sintomatología mucho más evidente y generalizada que los tipo Guara. Este hecho será también objeto de seguimiento a partir de la próxima brotación primaveral del almendro.

Figura 3. Hojas muestreadas de almendro afectado por *Xylella fastidiosa*, mostrando escaldaduras marginales y apicales del limbo con color dorado. Se observa la zona clorótica que precede a la escaldadura (El Castell de Guadalest, Alicante, junio de 2017)



Cabe señalar que *X. fastidiosa*, hasta la fecha de publicarse este libro, solo se ha detectado en la Comunidad Valenciana en almendro, a pesar de que en la zona afectada se encuentran plantaciones en las que se cultivan simultáneamente almendros y olivos.

Figura 4. Hojas de almendro mostrando escaldadura apical y zona clorótica
(El Castell de Guadalest, Alicante, junio de 2017)



Figura 5. Hojas de almendro afectado por *Xylella fastidiosa*, mostrando escaldaduras marginales y apicales del limbo. (El Castell de Guadalest, Alicante, septiembre de 2017)



* En este caso, al ser final de septiembre, la escaldadura es de color más atabacado, y es más seca y quebradiza. La zona clorótica, aunque visible, es menos perceptible.

Figura 6. Síntomas generalizados de quemadura en almendros afectados por *Xylella fastidiosa* (El Castell de Guadalest, Alicante, septiembre de 2017)



Figura 7. Aspecto de almendro seco prematuramente debido a la presencia de *Xylella fastidiosa*, lo que se conoce con el nombre de *golden death* o muerte dorada



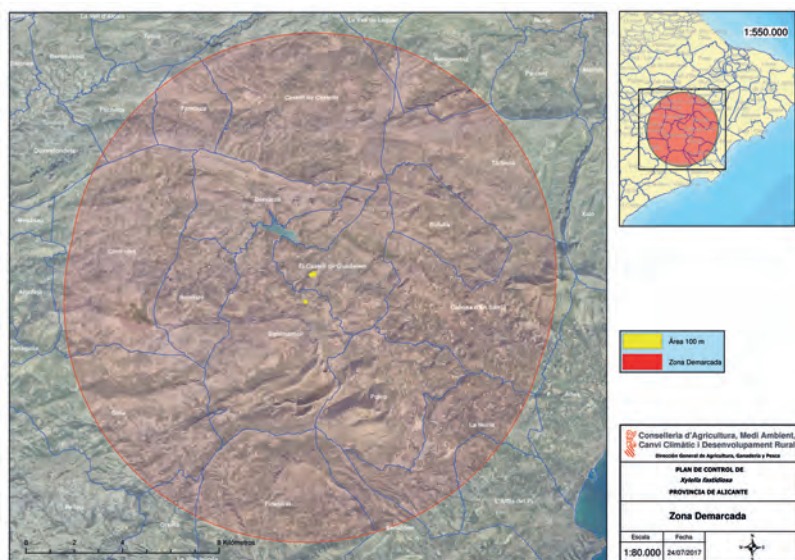
4. Situación actual de *Xylella fastidiosa* en la Comunidad Valenciana

En 2017, y hasta el momento de la primera detección, se habían analizado 232 muestras de distintas especies vegetales, con resultado negativo. Tras la primera detección en El Castell de Guadalest (Alicante), se aplicaron las medidas especificadas tanto en la Decisión de Ejecución (UE) 2015/789 como en los planes de contingencia nacional y autonómico, así como las descritas en el plan de acción de nuestra comunidad autónoma, aprobado en julio de 2017, que recoge las medidas específicas que deben adoptarse para la lucha frente a esta enfermedad (Capítulos 7 y 14).

A partir de esta detección, y tras publicar la Resolución de 6 de julio de 2017 (DOGV de 7 de julio de 2017), por la cual se declaraba la existencia oficial de la enfermedad, se calificaba de utilidad pública su lucha, se establecía la zona demarcada y se especificaban las medidas obligatorias a realizar en dicha zona, se iniciaron las prospecciones obligatorias en la zona demarcada, y, a finales de julio, se detectó de nuevo la presencia de la bacteria en otra plan-

tación de almendros adultos, cercana a la primera, en el término municipal de Benimantell, como se observa en la Figura 8.

Figura 8. Zona demarcada en Alicante (Comunidad Valenciana) a 25 de julio de 2017



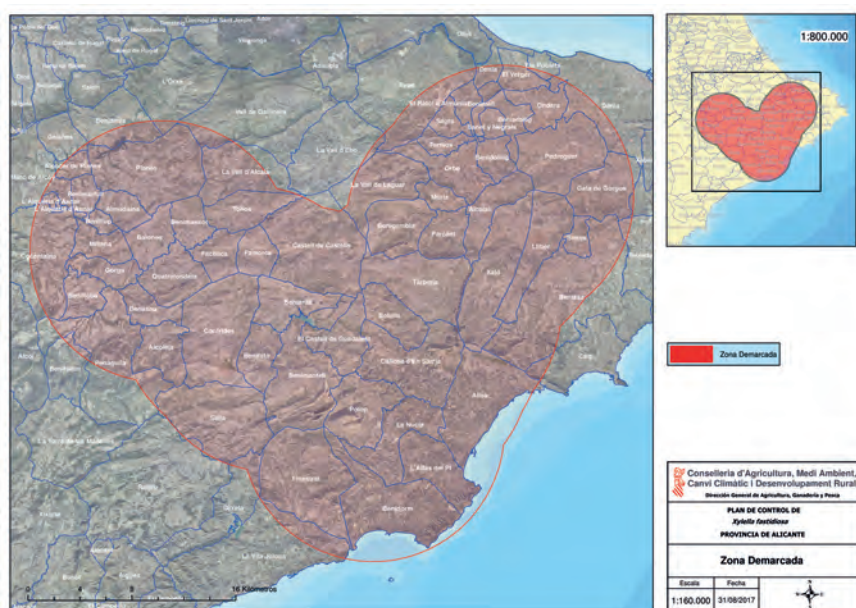
Fuente: Generalitat Valenciana, Servicio de Sanidad Vegetal.

Tras la declaración de ambos brotes y el establecimiento de la zona demarcada, han sido numerosos los avisos de agricultores y particulares que se ponen en contacto con el Servicio de Sanidad Vegetal, gracias a toda la información que se ha ido publicando. Fruto tanto de estos avisos como de las prospecciones que se están realizando, el 5 de septiembre se publicó una nueva Resolución (DOGV de 5 de septiembre de 2017) por la cual se declaran 26 nuevas parcelas con almendros infectados por esta enfermedad, 23 de las mismas situadas dentro de la zona demarcada existente hasta esa fecha, pero 3 de ellas localizadas fuera, por lo que se delimitó la nueva zona demarcada que se muestra en la Figura 9 incrementando la zona demarcada a cerca de 111.000 ha.

En la nueva zona demarcada se han tomado 1.267 muestras (hasta el 22 de septiembre), siendo positivas 45 muestras de almendro (pertenecientes a las parcelas mencionadas) y el resto negativas o pendientes de resultado en

esa fecha. Estas muestras provienen de viveros (184), plantaciones (1.030), medio natural (31) y jardines (22). Por cultivos, las muestras corresponden a olivo (485), almendro (417), vid (169), higuera (65), cítricos (23), adelfa (21), otros *Prunus* spp. (17), *Polygala* spp. (11), romero (8), artrópodos (8) y el resto pertenece a especies del medio natural, a otros cultivos y plantas ornamentales (como *Quercus* spp., laurel, y *Acer pseudoplatanus*, entre otros).

**Figura 9. Zona demarcada actual en Alicante (Comunidad Valenciana)
a 22 de septiembre de 2017**



Fuente: Generalitat Valenciana, Servicio de Sanidad Vegetal.

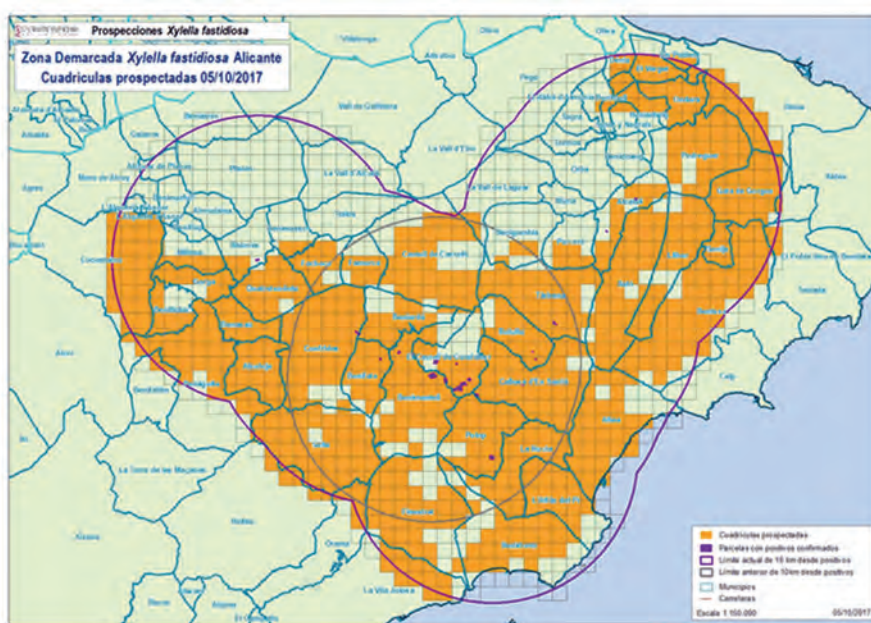
Respecto a las medidas tomadas, hasta el 22 de septiembre de 2017 se habían tratado 36 parcelas para el control de vectores con Lambda Cihalotrin (autorizado en almendro, olivo, vid, frutales de hueso y eriales), y se habían triturado 594 almendros que se hallaban en 19 parcelas (parcela infectada y radio de 100 m alrededor), así como parte de la vegetación de sotobosque en terreno forestal que entraba dentro de la zona de erradicación.

Además, se ha inspeccionado e inmovilizado el material especificado de un total de 42 viveros y centros de jardinería que se hallan dentro de la zona

demarcada actual, de los cuales 15 son únicamente comerciantes, y la gran mayoría se dedica al comercio local. Se ha prohibido trasladar fuera de las zonas demarcadas los vegetales especificados que han sido cultivados durante al menos parte de su vida en una zona demarcada. No obstante, se está autorizando el movimiento de vegetales especificados dentro de la zona tampón, acompañados de pasaporte fitosanitario, y con una declaración responsable firmada para cada transacción en la que se especifique el destino de la zona tampón de la mercancía.

En la Figura 10 se puede ver el total de cuadrículas prospectadas (actualizada a 5 de octubre de 2017). Se trata de un muestreo intensivo en la zona demarcada basado en cuadrículas de 1 km², que se realiza para determinar con mayor rapidez el alcance de la enfermedad en la actual zona demarcada.

Figura 10. Cuadrículas prospectadas en la zona demarcada de Alicante (Comunidad Valenciana) hasta el 5 de octubre de 2017



Las prospecciones y los análisis de muestras siguen activos, por lo que los nuevos positivos que se detecten a partir de ahora podrían dar lugar a cambios en la zona demarcada. Así mismo se está realizando la prospección obligatoria que establece la Decisión europea basada en cuadrículas de 10.000 m².

Por lo que respecta a la totalidad de la Comunidad Valenciana, durante 2017 (hasta el 22 de septiembre) se han tomado 3.185 muestras, 45 han resultado positivas para la detección de *X. fastidiosa* (correspondientes a muestras de las parcelas de la zona demarcada) y 2.385 negativas, y el resto están pendientes de resultado en el momento de publicar este libro. Desglosadas por provincias, 310 corresponden a la provincia de Castellón, 1.156 a la provincia de Valencia y 1.719 a la de Alicante (de las cuales 1.267 corresponden a la zona demarcada). Proceden de viveros 1.655, de plantaciones regulares 1.337, de viveros forestales y del medio natural 128 y de parques y jardines 62 muestras. Hasta octubre de 2017, *X. fastidiosa* no se ha detectado en la Comunidad Valenciana en otros lugares distintos de los mencionados en la provincia de Alicante ni en otras especies vegetales que no sea el almendro.

Referencias bibliográficas

- DOGV (2017): «Resolución de 6 de julio de 2017, del director general de Agricultura, Ganadería y Pesca, por la cual se declara la existencia de un brote de la plaga *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) en el territorio de la Comunidad Valenciana y se adoptan medidas fitosanitarias urgentes de erradicación y control para evitar su propagación. [2017/6203]»; *Diario Oficial de la Generalitat Valenciana* n.º 8.079 de 07/07/2017; pp. 24101-24104.
- DOGV (2017): «Resolución de 25 de julio de 2017, del director general de Agricultura, Ganadería y Pesca, por la cual se declara la existencia de un segundo brote de la plaga *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) en el territorio de la Comunitat Valenciana y se adoptan medidas fitosanitarias urgentes de erradicación y control para evitar su propagación. [2017/7019]»; *Diario Oficial de la Generalitat Valenciana* n.º 8.095 de 31/07/2017. pp. 27463-27466.
- DOGV (2017): «Resolución de 31 de agosto de 2017, del director general de Agricultura, Ganadería y Pesca, por la cual se declara la existencia de un tercer brote de la plaga *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) en el territorio de la Comunitat Valenciana y se adoptan medidas fitosanitarias urgentes de erradicación y control para evitar su propagación. [2017/7668]»; *Diario Oficial de la Generalitat Valenciana* n.º 8.120 de 05/09/2017; pp. 31513-31518.

- DOUE (2000): «Directiva 2000/29, del Consejo, de 8 de mayo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad»; *Diario Oficial* n.º L 169 de 10/07/2000; pp. 0001-0112
- DOUE (2015): «Decisión de Ejecución (UE) 2015/789 de la Comisión, de 18 de mayo de 2015, sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*)»; *Diario Oficial* n.º L 125 de 21/05/2015; pp. 0036-0053.
- EPPO (2016): «PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*»; *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 46(3); pp. 463-500.
- FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA ROSA, J.; DODDAPANENI, H. y CIVEROLO, E. L. (2006): «Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*»; *European Journal of Plant Pathology* (115); pp. 203-213.
- HARPER, S. J.; WARD, L. I. y CLOVER, G. R. G. (2010, erratum 2013): «Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications»; *Phytopathology* (100); 1282-1288.
- MINSAVAGE G. V.; THOMPSON C. M.; HOPKINS D. L.; LEITE R. M. V. B. C. y STALL R. E. (1994): «Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue»; *Phytopathology* (84); pp. 456-461.

Legislación en Europa relacionada con *Xylella fastidiosa*, planes de contingencia y de acción frente a la enfermedad

Ricardo Alarcón Roldán

Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (España, Junta de Andalucía)

1. Legislación en la UE, antecedentes

En primer lugar, de cara a una mejor comprensión del sistema normativo en materia de sanidad vegetal dentro de la Unión Europea, habría que explicar cómo se fundamenta y en qué normas de mayor rango se sustenta.

Hasta la publicación del Reglamento (UE) 2016/2031, relativo a las medidas de protección contra las plagas de los vegetales y que será aplicable a partir del 14 de diciembre de 2019, la norma de mayor rango que regulaba la sanidad vegetal en la UE era la Directiva 2000/29/CE del Consejo, de 8 de mayo de 2000, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. Dicha Directiva contemplaba listas de organismos nocivos y de combinaciones material vegetal/organismos nocivos no presentes en el territorio de la Unión y cuya entrada debía evitarse. Estos organismos nocivos son los que podemos catalogar como de «cuarentena» u organismos nocivos regulados en la UE. Las medidas fitosanitarias a aplicar, en aquellos casos en que se produzca una detección de alguno de esos organismos nocivos, son adoptadas por la Comisión en forma de Decisiones de la Comisión y son de aplicación directa en todos los Estados miembros.

X. fastidiosa es un organismo nocivo de cuarentena que ha tenido un extenso desarrollo normativo a nivel comunitario desde su aparición por primera vez en octubre de 2013 en el territorio europeo. Hay que señalar, sin embargo, que la bacteria, y sus vectores, ya se encontraban regulados y comprendidos en la normativa europea de sanidad vegetal, a saber, la Directiva 2000/29/CE, dado el conocimiento que existía de que era causante de enfer-

medades de importancia en cultivos como los cítricos (clorosis variegada de los cítricos; CVC) y la vid (enfermedad de Pierce; EP).

X. fastidiosa se encontraba incluida en el Anexo I, Parte A, Sección I, de la Directiva 2000/29/CE, como organismo nocivo de cuya presencia no se tiene constancia en ningún lugar de la UE, y de la que se prohíbe su introducción y propagación. También estaban incluidos, en ese mismo apartado de la legislación, los insectos vectores de la familia *Cicadellidae* (especies no europeas), transmisores de la EP. Por otro lado, la enfermedad conocida como CVC está incluida en el Anexo II, Parte A, Sección I, de la Directiva 2000/29/CE, asociada a los vegetales de *Citrus* spp., *Fortunella* spp. y *Poncirus* spp., ya que el agente causal, *X. fastidiosa*, es un organismo cuya introducción y propagación está prohibida.

La importación a la UE de plantas de cítricos y vid, principales hospedantes de *X. fastidiosa*, está prohibida de forma libre, exigiéndose controles rigurosos y estancias en centros de cuarentena (Anexo III, Directiva 2000/29/CE). Asimismo, también está prohibida la importación de plantas de *Prunus* spp. originarias de países no europeos, con la excepción de material en reposo (sin hojas, flores ni frutos) procedente de países mediterráneos, Australia, Nueva Zelanda, Canadá y los estados continentales de EEUU. Para la importación del resto de vegetales destinados a plantación de especies hospedantes de *X. fastidiosa*, no hay requisitos específicos para esta bacteria contemplados en la Directiva 2000/29/CE, aunque están obligados a ser sometidos a, al menos, un control fitosanitario en el país de origen previo a la exportación (necesario para la emisión del certificado fitosanitario), y a un control fitosanitario en frontera previo a su introducción en la UE.

Además, la bacteria *X. fastidiosa* está recogida en la lista A1 de la EPPO (*European Plant Protection Organization*), donde están incluidos los organismos de cuarentena cuya introducción en los países miembros supone un riesgo fitosanitario evidente, y está considerada como bacteria de cuarentena en muchos países (Turquía, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Israel, etc.) y en otras organizaciones regionales de protección fitosanitaria (COSAVE, NAPPO, IAPSC). También están incluidos en la lista A1 de la EPPO algunos de los insectos vectores transmisores de la bacteria: *Carneocephala fulgida*, *Draeculacephala minerva*, *Graphocephala atropunctata* y *Homalodisca coagulata*.

Por tanto, ya existía una protección fitosanitaria frente a la entrada y llegada de esta bacteria al territorio de la Unión, que implicaba un control en las fronteras europeas de determinados materiales vegetales sensibles a la misma

y de los insectos vectores que la transmiten; otra cuestión sería analizar si la protección era suficiente o ha sido realmente eficaz.

2. Legislación en la UE y en España: evolución y situación actual

Una vez confirmada la presencia de la bacteria *X. fastidiosa* en Apulia, Italia, en octubre de 2013, se pusieron en marcha acciones encaminadas a evitar la dispersión de la enfermedad por el territorio europeo, así como a conocer su posible presencia en otras partes de la Unión Europea. La complejidad que presenta el comportamiento de la bacteria ha dado lugar a que desde este primer momento, la Comisión europea haya recabado el apoyo científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*). El primer informe de este organismo, de noviembre de 2013, aportó información inicial sobre el amplio rango de especies huéspedes potenciales, identificó las posibles vías de entrada y de propagación de la bacteria, así como las opciones de reducción del riesgo.

Posteriormente, la Comisión europea publicó una primera norma en febrero de 2014 que básicamente contemplaba:

- La prohibición de circulación fuera de la provincia de Lecce, en Italia, de material vegetal destinado a la plantación, salvo determinadas excepciones.
- La obligación de los Estados miembros de iniciar prospecciones para la búsqueda del organismo nocivo *X. fastidiosa*.

En julio de 2014, y a la luz de los trabajos y pruebas que se iban realizando en la zona afectada de Italia, se publicó una nueva decisión de la Comisión que introdujo nuevos elementos:

- Identificó una serie de especies vegetales consideradas hospedantes de la bacteria y sobre las cuales debían llevarse a cabo labores de inspección y erradicación.
- Implementó requisitos para la entrada en la UE de esas especies vegetales procedentes de países donde se sabía que la bacteria estaba presente.

- Se establecieron requisitos para el movimiento de dichos vegetales dentro de la UE cuando procedieran o hubieran transitado por zonas donde la bacteria estaba presente.
- Continuaba con la importancia de la búsqueda de la bacteria en todo el territorio de la UE, así como de la información y sensibilización a los operadores implicados.
- Contemplaba la obligación del establecimiento de zonas demarcadas, cuando se tuviera constancia de presencia de la bacteria, y la aplicación de medidas fitosanitarias obligatorias encaminadas a la erradicación y a evitar la propagación de la enfermedad.

Es curioso el hecho de que la lista de vegetales especificados, potencialmente hospedantes de la bacteria, que no alcanzaba la decena en julio de 2014, se incrementó ampliamente a raíz del siguiente informe de la EFSA. Además, en esa fecha también se consideró que la anchura de la zona tampón debía ser de solo 2.000 m, distancia que se vería igualmente aumentada en los siguientes textos legislativos sobre *X. fastidiosa*.

En enero de 2015 la EFSA ya emitió un dictamen científico que identificó un amplio rango de especies vegetales potencialmente hospedantes de la bacteria (más de 350), determinó el nivel de riesgo de entrada y propagación de la bacteria, así como las acciones necesarias a adoptar para minimizar dichos riesgos. El citado informe propició un planteamiento completamente diferente en la normativa comunitaria, dado el alto riesgo de entrada y propagación de la bacteria que había identificado la EFSA.

De esta forma, la Comisión publicó una nueva Decisión en mayo de 2015 en la que se introducía, como principal novedad, una lista de «vegetales especificados», es decir, una amplia relación de especies vegetales que se había confirmado que eran sensibles (podían llegar a estar infectadas tanto por cepas europeas como no europeas de la bacteria, y tanto por infección natural como experimental e incluso por alguna vía desconocida) y sobre las cuales se debía aplicar la normativa comunitaria. Dicha lista de «vegetales especificados» alcanzaba 214 especies de plantas en esa fecha y se encuentra en el Anexo I de la citada Decisión.

Por otra parte, se estableció otra lista de vegetales, denominados «plantas hospedadoras», donde se incluían aquellas especies que se habían confirmado como sensibles (infectadas) a las cepas europeas de *X. fastidiosa* en los distin-

tos focos europeos y sobre las cuales se aplicaban determinadas medidas de erradicación. Dicha lista de «plantas hospedadoras» se organiza en función de la subespecie de la bacteria que se ha encontrado infectándolas, se actualiza periódicamente por la Comisión en función de la confirmación de aparición de las distintas subespecies en nuevas especies vegetales, y puede consultarse en la siguiente dirección de la web de la Comisión: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures/X_fastidiosa-fastidiosa/susceptible_en.

Otra gran novedad que contempló esta Decisión fue la de permitir la contención, en lugar de la erradicación, de la bacteria en la provincia de Lecce, en Italia, dada la expansión de la misma, aunque se debía aspirar a reducir al mínimo el inóculo de la bacteria y mantener la población del vector o vectores en el nivel más bajo posible. Al mismo tiempo, obligaba a establecer una zona de vigilancia, de una anchura de 20 km, inmediatamente fuera de la zona tampón en la citada provincia italiana. Por otro lado, en las zonas demarcadas, se establecieron requisitos estrictos para la producción de material vegetal y salida de dichos vegetales fuera de las mismas. La trazabilidad, tanto en origen como en destino, de dichos vegetales, se ha considerado crucial para verificar la eficacia de las medidas de producción de estas plantas y de los controles que sobre ellas se efectúan.

Además, se reforzaron las exigencias y los controles respecto a la entrada de los vegetales especificados procedentes de países terceros, especialmente los procedentes de aquellos en los que se sabe que la bacteria está presente. Esta decisión prohibió al mismo tiempo la entrada de plantas de café desde Costa Rica y Honduras, dadas las numerosas interceptaciones de estas plantas, en las fronteras de la Unión, con presencia de la bacteria.

La mencionada Decisión ha sufrido por el momento dos modificaciones, una en diciembre de ese mismo año 2015 y otra en mayo de 2016, de manera que la situación actual, en 2017, de la normativa comunitaria y los requisitos legales para los estados miembros y la propia Unión respecto a *X. fastidiosa* son los siguientes:

- Existe una obligación de comunicación en caso de sospecha de presencia de la bacteria por parte de cualquier persona. Estas comunicaciones deben ser registradas por la autoridad competente y deben ser investigadas.

- Los Estados miembros deben llevar a cabo inspecciones para detectar la posible presencia de la bacteria. Estas prospecciones se efectuarán sobre todas las especies incluidas en la lista de «vegetales especificados» y comprenderán inspecciones visuales y toma de muestras, en caso de sospecha de infección.
- Se urgió a que, antes del 31 de diciembre de 2016, los Estados miembros establecieran un plan de contingencia que recogiera las acciones a llevar a cabo en caso de sospecha o detección de *X. fastidiosa*. Del contenido y estructura de estos planes se hablará en otro punto de este capítulo.
- La Decisión fijó los criterios para establecer zonas demarcadas en caso de confirmación de presencia de la bacteria, aspecto este que también será desarrollado en un punto posterior del presente capítulo.
- Posiblemente una de las medidas más duras que se contemplan en la lucha contra la bacteria es la de la prohibición de la plantación de «plantas hospedadoras» en las zonas que tengan la calificación de zonas infectadas. Se permiten excepciones en casos de lugares de producción protegidos físicamente contra los vectores, y para fines científicos en la zona infectada en Italia.
- La Decisión comunitaria fijó una serie de medidas de erradicación a aplicar en las zonas demarcadas que se detallarán más adelante, así como la posibilidad de aplicar la opción de la **contención** exclusivamente en el caso de la provincia de Lecce, en Italia.
- En cuanto a la posibilidad de traslado de «vegetales especificados» procedentes de zonas demarcadas hacia otras zonas de la Unión, la norma comunitaria fijó una serie de requisitos muy exigentes de producción para evitar posibles riesgos de propagación de la bacteria y que serán detallados en el punto siguiente de este capítulo. Al mismo tiempo, la modificación de diciembre de 2015 introdujo una novedad importante para el movimiento de las «plantas hospedadoras» en el territorio europeo, procedieran o no de zonas demarcadas, y es la obligación de ir acompañadas de un pasaporte fitosanitario conforme a la normativa reguladora europea. Esto ha significado un paso importante para disminuir el riesgo y aumentar la vigilancia para espe-

cies vegetales tan importantes para España como el olivo, que hasta ese momento no precisaba de un pasaporte fitosanitario para su traslado dentro de la Unión. Este nuevo requisito, aplicable tanto al material vegetal para plantación como para uso ornamental, ha supuesto una mejora considerable en la capacidad de vigilancia y supervisión del material vegetal de este cultivo y era una exigencia reclamada por algunas comunidades autónomas y el propio estado español.

- Por último, la decisión de la Comisión destacó la importancia de llevar a cabo campañas de sensibilización e información al público en general, los profesionales, viajeros y operadores de transporte internacional sobre la amenaza que supone *X. fastidiosa*.

En cuanto a la normativa de carácter nacional, el 21 de enero de 2017 se publicó en el BOE la Orden APM/21/2017, de 20 de enero, por la que se establecen medidas específicas de prevención en relación con la bacteria *X. fastidiosa*. Mediante esta Orden ministerial se establecía como medida de prevención la prohibición de salida de las Islas Baleares de material vegetal, excepto las semillas, de los vegetales especificados que se relacionaban en el anexo de la citada Orden. Las autoridades de las Islas Baleares deberán vigilar el cumplimiento de esa prohibición y las del resto del Estado lo tendrán en cuenta, a fin de comprobar si se produce algún movimiento después de la prohibición, y, en caso afirmativo, el material vegetal interceptado deberá ser destruido. Un aspecto importante reflejado en la Orden APM/21/2017 es la del deber de información por parte de las compañías de transporte de viajeros o mercancías de la citada prohibición.

Por otra parte, existe la Resolución de las Islas Baleares de enero de 2017, por la que se declaró la existencia de la bacteria en todas las islas y se adoptaron medidas fitosanitarias cautelares de contención y para evitar su propagación. En dicha resolución, se declaró oficialmente la existencia de la plaga en todo el territorio de las Islas Baleares, que automáticamente tiene la consideración de zona demarcada conforme a la Decisión comunitaria. Y en base a la Orden APM/21/2017 se prohíbe de manera cautelar la salida de vegetales especificados de las islas. Como medida de contención, se estableció la eliminación de todos los vegetales infectados por la bacteria conforme al plan de acción de esa comunidad autónoma y la propia Decisión de la Comisión.

3. Requisitos legales para la producción y entrada en la UE de material vegetal sensible

3.1. Producción y movimiento de vegetales especificados dentro de la UE

Respecto a los requisitos legales para la producción de material vegetal sensible a *X. fastidiosa* en la UE, hay que diferenciar aquel que se produce en zonas donde la bacteria no se encuentra presente de aquel que pueda producirse en zonas demarcadas.

Respecto al primer caso, los vegetales especificados, cultivados en zonas donde la bacteria no se ha detectado, deberán cumplir aquellos requisitos fitosanitarios exigidos de forma general para la producción y movimiento dentro de la UE, conforme al anexo XX de la Directiva 2000/29, y deberán ir acompañados del correspondiente pasaporte fitosanitario en su caso. Hay que señalar que, posiblemente, muchas de las especies incluidas en la lista de «vegetales especificados» de la Decisión 2015/789 no precisan ninguna exigencia fitosanitaria especial, ni precisan pasaporte fitosanitario si se producen o son originarias de zonas no demarcadas de *X. fastidiosa*.

Sí es importante señalar, tal y como se ha mencionado anteriormente, la novedad introducida en diciembre de 2015 de exigir el pasaporte fitosanitario para las especies vegetales incluidas en la lista de «plantas hospedadoras», aun cuando hayan sido producidas en zonas donde la bacteria no esté presente. Este nuevo requisito es importante, por ejemplo, para mejorar el sistema de registro de operadores dedicados a la producción o comercialización de ese material vegetal, que en otro caso no estarían obligados a dicha inscripción. Evidentemente, esta mejora en el registro permite una mejor actuación de vigilancia y supervisión, se hacen los autocontroles oportunos por dichos operadores, la autoridad fitosanitaria autoriza la expedición del pasaporte y, en definitiva, se intentan ofrecer las máximas garantías para minimizar el riesgo de que las plantas sean portadoras de *X. fastidiosa*.

Respecto al movimiento de material vegetal de especies consideradas como «vegetales especificados» de *X. fastidiosa* producido en zonas demarcadas, conforme el artículo 4 de la Decisión 2015/789 de la Comisión, dentro del territorio de la Unión, deben cumplirse unos estrictos requisitos para poder ser autorizado. Como norma general, se prohíbe el traslado de los vegetales especificados hacia fuera de las zonas demarcadas y desde la zonas

infectadas hacia la zona tampón; no obstante, sí que ese movimiento podría ser autorizado si el lugar de producción cumple las siguientes condiciones:

- Se encuentra debidamente registrado.
- Está reconocido por la autoridad competente en sanidad vegetal como sitio libre de *X. fastidiosa* y de sus vectores.
- Se encuentra protegido físicamente contra los vectores de la bacteria
- En una franja de 200 m alrededor del lugar de producción se han realizado exámenes visuales, y toma de muestras en caso de sospechas, y se ha comprobado que *X. fastidiosa* no se detecta. En esa misma franja se han efectuado tratamientos fitosanitarios contra los vectores.
- En el lugar de producción se han llevado a cabo tratamientos fitosanitarios adecuados contra los vectores.
- Anualmente, en las épocas adecuadas, se realizan como mínimo dos inspecciones oficiales.
- Durante la época de crecimiento de los vegetales no se encuentran síntomas de presencia de *X. fastidiosa* ni sus vectores y, si se han tomado muestras, los resultados de los análisis han sido negativos.

Adicionalmente, en el momento adecuado se deben haber realizado pruebas de diagnóstico en cada especie vegetal y confirmado la no detección de la bacteria. Del mismo modo, en el momento más cercano a cuando los vegetales vayan a trasladarse, se realizará un examen visual oficial, toma de muestras y análisis mediante técnicas moleculares que permitan asegurar la no detección de la bacteria en la muestra conforme a la norma internacional NIMF n.º 31. Además, antes de la circulación de los vegetales, se realizarán tratamientos fitosanitarios contra los vectores y además, el material vegetal deberá transportarse en contenedores o envases cerrados que garanticen que no pueda producirse una infección de la bacteria o de sus vectores.

Es evidente que todos los vegetales que se trasladen fuera de las zonas demarcadas cumpliendo los requisitos señalados deberán ir acompañados de su correspondiente pasaporte fitosanitario.

Desde diciembre de 2015, la normativa comunitaria permite un trato particular al material vegetal de vid en reposo destinado a la plantación y producido en zonas demarcadas. En ese caso, la circulación estará permitida

si el lugar de producción se encuentra registrado y si los vegetales, lo más cerca posible del momento del traslado y en una instalación de tratamiento autorizada, han sido sometidos a un tratamiento de termoterapia, en el que el material vegetal es sumergido durante 45 minutos en agua caliente a 50 °C. Todo ello en base a la norma correspondiente de la EPPO.

Del mismo modo, desde mayo de 2016, la Decisión de la Comisión establece un caso particular para el movimiento y circulación dentro de la Unión de vegetales especificados que se hayan cultivado *in vitro* dentro de una zona demarcada. En esos casos, deberán cumplir los mismos requisitos que los señalados anteriormente respecto a registro, hermeticidad y controles oficiales y, además, los vegetales deberán haber sido obtenidos a partir de semillas, propagados en condiciones estériles, y procedentes de plantas madre originarias de zonas de la Unión libres de *X. fastidiosa* y analizadas y encontradas libres de la bacteria.

En otro de los aspectos que incide en gran manera la norma comunitaria es en el de la trazabilidad del movimiento del material vegetal, especialmente en el procedente de zonas demarcadas. De esta forma, establece la necesidad de mantener registros detallados de suministro de plantas por parte de los operadores autorizados, al igual que los operadores que reciban esas plantas. Dichos registros deberán conservarse durante tres años. Los mismos operadores deben informar a sus autoridades oficiales de los envíos de lotes y de la recepción de los mismos, y estas a su vez lo harán a la Comisión. Se deberán poner en marcha igualmente controles específicos para vigilar el cumplimiento de los requisitos de este movimiento de plantas procedentes de zonas demarcadas. En cualquier caso, la Decisión de la Comisión establece la necesidad de elaborar un listado de operadores autorizados para la producción y comercialización de vegetales especificados procedentes de zonas demarcadas, y que se suministrará a la Comisión y esta la comunicará al resto de Estados miembros. A fecha de redacción del presente texto no existe ningún operador autorizado en ninguna zona demarcada de los países con presencia de *X. fastidiosa*.

3.2. Requisitos para la entrada de material vegetal a la UE procedente de terceros países

La aparición de *X. fastidiosa* en Europa ha supuesto una revisión importante de los requisitos y las condiciones a exigir para la entrada de vegetales especificados procedentes de países terceros, tanto de aquellos donde la bacteria

no esté presente como de los que esté establecida. Al mismo tiempo, se han reforzado los controles del material vegetal en el momento de su llegada a la UE. Además, la lista de plantas huéspedes sigue aumentando (ver sección 14.2).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la Comisión prohibió en mayo de 2015 la entrada en la UE de vegetales para plantación, excepto las semillas, de cafeto originarios de Costa Rica y Honduras. Esta medida había sido reclamada desde varios ámbitos y asociaciones de productores, por considerar que el nivel de riesgo de llegada de la bacteria con dichos vegetales era muy elevado.

Respecto a la entrada de vegetales especificados procedentes de países terceros donde la bacteria no está presente, la normativa actual exige que la autoridad competente de dicho país notifique a la UE que *X. fastidiosa* no se ha detectado en el mismo. Estas comunicaciones pueden consultarse en la web de la comisión, en el siguiente enlace: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures_en.

Además, los vegetales deberán ir acompañados de un certificado fitosanitario que indique que el organismo nocivo no está presente en el país de origen. En cualquier caso, dichas plantas serán controladas en el momento de su entrada en el territorio de la Unión.

Para la entrada de vegetales especificados procedentes de países donde *X. fastidiosa* esté presente, podemos distinguir dos casos: si provienen de una «zona declarada libre» de la bacteria o si se han cultivado en una zona en la que la bacteria se sabe que está establecida. En el primer caso, la entrada solo podrá producirse si se cumplen los siguientes requisitos:

- Las plantas van acompañadas de un certificado fitosanitario.
- La zona denominada como libre de la bacteria ha sido establecida por la autoridad fitosanitaria del país conforme a normas internacionales y ha sido notificada a la Comisión.

En el segundo caso, las plantas solo podrán introducirse en la Unión si:

- Se han producido en un lugar que cumple los mismos requisitos que los exigidos para los operadores situados en zonas demarcadas y que quieran producir y comercializar vegetales especificados fuera de las mismas.

- El servicio fitosanitario del tercer país ha comunicado a la Comisión la lista de dichos lugares autorizados.
- En el sitio de producción se aplican productos fitosanitarios contra los vectores.
- Se toman muestras y se realizan análisis y se ha confirmado la ausencia de detección de la bacteria.
- Los vegetales se transportan en contenedores o envases cerrados que impidan una infección o contacto con los vectores de la bacteria.
- Lo más cerca del momento de la exportación, los lotes han sido inspeccionados y muestreados y se ha confirmado la ausencia de síntomas de la bacteria.
- Inmediatamente antes de su exportación, las plantas han sido tratadas con productos fitosanitarios contra los vectores de *X. fastidiosa*.

En cualquier caso, la Comisión también ha establecido controles específicos para todos los vegetales especificados que lleguen a la Unión.

Si las plantas proceden de un país en el que *X. fastidiosa* no está presente o de una zona declarada «libre de», las autoridades fitosanitarias competentes en frontera realizarán siempre un examen visual de los vegetales y, en caso de sospecha de presencia de la bacteria, efectuarán toma de muestras y pruebas analíticas para confirmar la presencia de la misma.

En el caso de que las plantas sean originarias de zonas donde la bacteria está presente, se realizará un examen visual y siempre irá acompañado de un muestreo y de pruebas en el Laboratorio Nacional de Referencia de muestras de los lotes, para confirmar la ausencia de detección de la bacteria.

Todas estas tomas de muestras a las que hemos hecho referencia con anterioridad se efectuarán conforme a la norma internacional fitosanitaria NIMF n.º 31, con un tamaño que permita identificar con una fiabilidad del 99 % un nivel de presencia de la bacteria de al menos el 1 %.

4. Plan de contingencia del MAPAMA y planes de acción autonómicos

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la Decisión 2015/789 introdujo la necesidad de que, antes del 31 de diciembre de 2016, los Estados

miembros establecieran un plan de contingencia en el que se expongan las acciones que van a ponerse en marcha en sus territorios, si se confirma o se tiene sospecha de la presencia de *X. fastidiosa*.

El plan debería incluir los siguientes aspectos:

- Las funciones y responsabilidades de los organismos participantes.
- La identificación y designación de los laboratorios oficialmente autorizados para la detección de la bacteria.
- Las normas sobre la comunicación de las acciones a llevar a cabo entre los organismos implicados, los operadores profesionales afectados y el público en general.
- Los protocolos descriptivos sobre los métodos de exámenes visuales, la toma de muestras y los análisis de laboratorio.
- La formación del personal que participe en las acciones.
- Los recursos mínimos necesarios que deben ponerse a disposición y los procedimientos para aumentarlos si fuera necesario.

Pero básicamente, ¿qué es un plan de contingencia? Se trata de un documento donde deben quedar identificados los organismos responsables de los trabajos, las acciones de coordinación necesarias entre los mismos, las necesidades de comunicación, sensibilización, consulta e información a los grupos de interés, las acciones encaminadas a la detección precoz de un organismo nocivo, información y formación sobre el mismo para el personal implicado, así como las medidas a poner en marcha en caso de sospecha o confirmación de su presencia.

El Estado español ya disponía de un plan de contingencia de *X. fastidiosa* desde junio de 2015 en el que se recogía información suficiente sobre la bacteria, características, biología, síntomas de las enfermedades que produce, así como establecía las prioridades a la hora de las prospecciones para la detección del patógeno, la metodología de las inspecciones, toma de muestras, análisis, y las medidas a adoptar en caso de sospecha o confirmación de presencia de la bacteria. En esa misma fecha, muchas comunidades autónomas ya habían redactado sus propios planes de acción o de contingencia contra la bacteria, apoyados o basados en el mismo plan nacional y adaptados a sus peculiaridades y necesidades particulares.

El plan de contingencia contra *X. fastidiosa* del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, en su última versión de mayo de 2017, comprende los siguientes aspectos: identifica el marco legislativo a aplicar, así como las autoridades competentes y administrativas implicadas, tanto a nivel de la Administración central como en las comunidades autónomas, señalando sus ámbitos de competencias. Hay que señalar que en la aplicación de este plan de contingencia, por las propias características de la enfermedad, se encuentran implicadas autoridades competentes tanto en sanidad vegetal como en sanidad forestal, y en muchos casos participando distintas consejerías o departamentos de una misma comunidad autónoma.

Dentro de los organismos oficiales implicados, se identifican los laboratorios oficiales designados por las comunidades autónomas, así como el Laboratorio Nacional de Referencia, que van a participar en las pruebas de diagnóstico necesarias. El plan también señala cuáles deben ser los métodos de diagnóstico a utilizar para la detección de la bacteria. En ese sentido, se fija el criterio marcado por la EPPO en septiembre de 2016, mediante el protocolo de diagnóstico EPPO (PM 7/24 (2) que establece la necesidad de aplicar al menos dos pruebas de diagnóstico basadas en diferentes principios biológicos o dos técnicas moleculares que analicen diferentes partes del genoma (ver Capítulo 5).

Es muy importante igualmente clarificar un esquema de mando, quién es responsable de cada tarea, cómo fluye la información y la toma de decisiones. En ese contexto, el plan contempla que, en el caso de aparición de un brote o foco de la bacteria, se deberá crear un equipo de dirección de emergencia, que se encargará de los aspectos tácticos y de operaciones para llevar a cabo lo definido en dicho plan o en otros documentos de planificación. El plan proporciona información detallada y completa sobre la bacteria, su situación actual en Europa, brotes detectados, especies hospedantes y medidas aplicadas, así como sobre los síntomas.

Uno de los aspectos destacados de todo plan de contingencia es el de recoger la información y planificación relativa a un programa de prospecciones definido para la realización de las inspecciones sobre el organismo nocivo. De esta forma, el plan contempla un protocolo específico de cómo deberán llevarse a cabo las prospecciones de *X. fastidiosa* en España. El trabajo de prospecciones se basa en la Guía para las prospecciones de *X. fastidiosa* en la UE que ha elaborado la Comisión, y se han identificado los lugares o puntos de mayor riesgo de aparición de la bacteria, que son:

- Viveros de producción y comercialización de vegetales especificados, incluidos centros de jardinería o *garden centers*.
- Nuevas plantaciones de cultivos sensibles que hayan podido efectuarse con material vegetal procedente de países o regiones donde la bacteria esté presente.
- Explotaciones de control de cultivos hospedantes con gran importancia para nuestro país como vid, cítricos, olivar, almendro, frutales de hueso, o encinas y otras quercíneas.
- Puntos de riesgo como entorno de puertos, aeropuertos, vías de comunicación con zonas demarcadas.
- Dada la situación del foco existente en Baleares, la costa de la Comunidad Valenciana se identificó como un lugar a vigilar intensivamente.

Los trabajos de prospección consistirán en inspecciones visuales y toma de muestras, tanto en el caso de plantas sintomáticas como asintomáticas.

El plan de contingencia recoge las acciones a poner en marcha en caso de sospecha o presencia confirmada de presencia de *X. fastidiosa*, así como las medidas de erradicación que deberán ser aplicadas. Todos estos aspectos serán desarrollados en el siguiente epígrafe de este capítulo. Volvamos, sin embargo, a comentar con más detalle algunos aspectos del plan de prospecciones. En primer lugar, hay que señalar que, conforme a lo dispuesto en la Decisión 2015/789, los trabajos de prospección deben ser efectuados sobre la base de los vegetales especificados, es decir, sobre más de 200 especies vegetales distintas, esto da una idea de la complejidad y dificultad que presentan las inspecciones de este organismo nocivo.

Por lo tanto, la primera cuestión a resolver a la hora de planificar una prospección de la bacteria sería ¿dónde realizar las prospecciones de *X. fastidiosa*? Como ya hemos comentado, se han identificado unos lugares de riesgo donde deben centrarse esos trabajos. Dentro de los mismos, los viveros o centros de jardinería dedicados a la producción o comercialización de vegetales especificados son prioritarios, evidentemente, si además han recibido material vegetal procedente de zonas demarcadas, ahora o en el pasado, su inspección es crucial.

Con el objetivo de priorizar los viveros o *garden centers* para la detección de *X. fastidiosa*, se tendrán en cuenta los siguientes criterios de riesgo fitosanitario:

- Que hayan recibido planta procedente de países o zonas con presencia de *X. fastidiosa*. La legislación actual ha reforzado las medidas establecidas con anterioridad, tanto para la importación procedente de países con *X. fastidiosa* como para la circulación de plantas originarias de zonas demarcadas, y, además, recoge un rango de hospedantes mucho más amplio. Por lo tanto, se considera que las plantas importadas con anterioridad a mayo de 2015, de países o zonas con presencia de la plaga, tienen un riesgo fitosanitario mayor, y serán objetivo prioritario de las prospecciones realizadas a productores y/o comerciantes de vegetales especificados.
- Presencia de planta madre de vegetales especificados de *X. fastidiosa*.
- Producción al aire libre (mayor riesgo que en condiciones protegidas, debido a la posible presencia de insectos vectores).

En cuanto a las especies vegetales a inspeccionar en el vivero o *garden center*, se tendrán en cuenta los criterios recogidos en la «Guía para las prospecciones de *Xylella fastidiosa* en la UE», en la que se concluye que las plantas que tienen un mayor riesgo de introducción de la bacteria son: árboles, arbustos, plantas perennes y las plantas de *Coffea* sp. Los motivos para priorizar las prospecciones sobre estas plantas son: tienen ciclos de vida largos, lo que incrementa la probabilidad de transferencia de la bacteria por insectos vectores si se cultivan al aire libre; es habitual que no se sometan a sistemas de certificación y existe una alta probabilidad de propagación vegetativa a partir de plantas asintomáticas. Las plantas hospedadoras recogidas en la base de datos de la Comisión cumplen estos criterios, sobre todo si se cultivan al aire libre, así que se deben considerar prioritarias en las prospecciones.

Teniendo en cuenta los criterios de riesgo definidos en el apartado anterior y que las especies que se han identificado como hospedantes de *X. fastidiosa* en las Islas Baleares cumplen esos criterios, las siguientes especies serán prioritarias en las prospecciones: *Acacia saligna*, *Cistus monspeliensis*, *Lavandula dentata*, *Nerium oleander*, *Olea europea europea*, *Olea europaea sylvestris*, *Polygala myrtifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Prunus avium*, *Prunus domestica* y *Prunus dulcis*.

El procedimiento de inspección de estos lugares va a consistir en la inspección visual de la parte aérea para la detección de síntomas (decaimiento o síntomas de marchitez, quemados, clorosis, necrosis o incluso moteados en

brotos y hojas). Si se detecta la presencia de síntomas que sean compatibles con los observados para *X. fastidiosa*, se tomarán muestras y se remitirán al laboratorio de diagnóstico de la comunidad autónoma. Además, se tomarán muestras asintomáticas.

Para determinar el número de plantas que deben ser sometidas a inspección visual se aplicará la NIMF n.º 31, tal y como recomienda la norma EPPO PM 3/82 (1) de inspección de lugares de producción de vegetales destinados a plantación para *X. fastidiosa*. Para poder aplicar la NIMF n.º 31, en primer lugar se debe definir un lote de plantas. El tamaño de la muestra (número de plantas que se van a observar) para un determinado tamaño del lote se establecerá para un nivel de confianza determinado (99 % en el caso de vegetales destinados a plantación) y un nivel de infestación (1 %, es decir, que existe un 99 % de probabilidad de que si el porcentaje de infestación de la población es superior o igual al 1 %, se sea capaz de detectarlo). Para su determinación se aplicarán las tablas de las distribuciones binomiales (Tabla 3, NIMF n.º 31) o de Poisson (Tabla 4, NIMF n.º 31) para lotes grandes (>10.000 plantas), y la distribución hipergeométrica (Tabla 1, NIMF n.º 31) para lotes pequeños (<10.000 plantas). Además, se aplicará un porcentaje de eficacia de la detección, que en este caso se estima del 75 % debido a que los síntomas pueden ser inespecíficos e incluso puede que no se manifiesten. Cuando el lote es muy pequeño (<1.000 plantas) todo el lote deberá ser sometido a una inspección visual. Por ejemplo, para un lote de 10.000 plantas (lote pequeño) habría que realizar una observación visual de 448 plantas para tener una confianza del 99 % de que el nivel de infección es inferior al 1 %, considerando que la eficacia de la detección es del 100 %. En este caso se ha aplicado el cuadro n.º 1 de la NIMF n.º 31 de la distribución hipergeométrica.

Las prospecciones en plantaciones o explotaciones agrarias de cultivos sensibles son otro elemento importante de la búsqueda de la bacteria. En esos casos se tendrán en cuenta algunos criterios de riesgo para enfocar los trabajos. De esta forma, en caso de detectar una plantación o replantación con planta de alguno de los vegetales especificados procedente de países o regiones en los que está presente *X. fastidiosa*, realizadas en los últimos dos años, se llevarán a cabo prospecciones sobre los vegetales especificados. Con independencia de lo anterior, se realizarán prospecciones para la detección de *X. fastidiosa* en plantaciones comerciales, como mínimo sobre los cultivos que son hospedantes principales y con gran importancia en nuestro país: vid, cítricos, *Prunus* sp., *Quercus* sp., olivo (*Olea europea europea*). En función de la importancia de

otros vegetales especificados de *X. fastidiosa* en cada comunidad autónoma, se podrá establecer realizar prospecciones sobre plantaciones o cultivos de otros géneros y especies (por ejemplo: *Pistacia vera*, *Persea americana*, *Rubus* sp, *Vaccinium* sp.).

Con objeto de que la intensidad de la prospección sea homogénea en todas las comunidades autónomas, se fijará la siguiente intensidad de prospección:

- Olivo: 1 prospección por cada 10.000 ha.
- Cítricos: 1 prospección por cada 10.000 ha.
- Vid: 1 prospección por cada 15.000 ha.
- Almendro: 1 prospección por cada 10.000 ha.
- Ciruelo: 1 prospección por cada 10.000 ha.
- Albaricoquero: 1 prospección por cada 15.000 ha.
- Cerezo y guindo: 1 prospección por cada 10.000 ha.
- Melocotonero, nectarino: 1 prospección por cada 15.000 ha.
- *Quercus* sp.: 1 prospección por cada 50.000 ha (dada la gran superficie).

En función de la experiencia adquirida en las Islas Baleares, en las que la mayor parte de las detecciones de *X. fastidiosa* se están produciendo en plantaciones envejecidas y poco cuidadas o abandonadas (escasa o nula poda, ausencia de riego y fertilización, con presencia de otras plagas, etc.), se deberán realizar también prospecciones dirigidas sobre plantaciones que cumplan estas características y que pertenezcan a los principales cultivos hospedantes de la bacteria (vid, cítricos, olivo, frutales de hueso, almendro, etc.).

Igualmente, a partir de la experiencia adquirida en Baleares, el acebuche se ha identificado como una especie vegetal importante a vigilar. El acebuche (*Olea europaea* var. *sylvestris*) u olivo silvestre es una planta autóctona silvestre de la vegetación mediterránea que forma parte del conjunto de arbustos y árboles de bosque mediterráneo junto con encinas, quejigos y alcornoque, y una de las plantas hospedadoras más afectadas por *X. fastidiosa* en las Islas Baleares junto con el almendro. Dada su distribución aleatoria, en esta especie no se realizarán prospecciones sistemáticas, pero se recomienda realizar prospecciones sobre aquellos acebuches que estén situados en el entorno de un lugar de riesgo. En este sentido, las comunidades autónomas deben conocer la superficie y distribución de las plantas de acebuche en su territorio que, tal y como

se muestra en el Mapa Forestal de España, están principalmente localizados en el sur y este de la península, así como en las Islas Baleares. Existen igualmente otras plantas que han aparecido con mayor porcentaje de positivos en los distintos focos en Europa y sobre las que centrar la vigilancia de la enfermedad, entre otras cabría señalar *Polygala myrtifolia*, o almendro.

Además de viveros y explotaciones agrícolas, deben identificarse posibles lugares o puntos de riesgo, relacionados con el movimiento de mercancías, viajeros o cercanía a zonas demarcadas o con brotes. Por ejemplo, las vías de comunicación con zonas demarcadas (por ejemplo, puertos marítimos, deportivos o pesqueros de la Comunidad Valenciana, donde hay tránsito frecuente con las Islas Baleares a través de ferris). Los insectos vectores se transportan de forma pasiva en los coches y en la ropa, y por ello estos lugares requieren una especial vigilancia.

Se deben realizar prospecciones para la identificación de potenciales insectos vectores de *X. fastidiosa* en todo el territorio. El objetivo de estas prospecciones es conocer la relación de potenciales insectos vectores que están presentes, los hospedantes en los que se desarrollan y el ciclo biológico que tienen, para poder actuar de una forma más eficaz en caso de detectarse un brote en la zona.

Los métodos más apropiados para la recolección de insectos vectores son la captura mediante mangas de barrido, utilización de aspiradores o mediante captura directa desde las plantas. La utilización de trampas amarillas también es posible, pero no es tan efectiva como los anteriores, porque en ellas estos insectos vectores solo caen de forma accidental y la calidad de la muestra puede no ser la adecuada, si el período de revisión de la trampa es amplio. La época recomendada para la realización de estas prospecciones es desde finales de primavera hasta principios de otoño.

Una vez identificados los lugares donde realizar las prospecciones, habría que explicar en qué consisten las mismas, ¿cómo se busca *X. fastidiosa*?

Las inspecciones consistirán en la observación visual de los vegetales destinados a plantación de las especies hospedantes de *X. fastidiosa*. La observación visual se dirigirá a la parte aérea de la planta. En primer lugar se valorará el estado fitosanitario de la planta en su conjunto, para observar si existe decaimiento o síntomas de marchitez, y luego se dirigirá a los brotes y las hojas, con la intención de detectar quemados, clorosis, necrosis, o incluso moteados. Dado que los síntomas que muestra la bacteria a veces son comunes a los de

otras causas, se debe observar si existe algún agente del cultivo o medioambiental que los justifique, por ejemplo: estrés hídrico, zona de exposición al viento, salinidad en el suelo, etc.

Si alguna rama o brote se ha secado, se puede realizar un corte transversal para observar si hay oscurecimiento de los vasos del xilema, que puedan hacer sospechar de la presencia de esta bacteria.

Si se detecta la presencia de síntomas que hagan sospechar de la infección de *X. fastidiosa*, se tomarán muestras y se remitirán al laboratorio de diagnóstico de la comunidad autónoma, conforme se detalla más adelante. Asimismo, siempre que se detecte material vegetal sensible a *X. fastidiosa* procedente de zonas demarcadas o de alguno de los terceros países en los que la bacteria está presente, se deberán tomar y analizar muestras asintomáticas del citado material.

La muestra tomada debe contener material vegetal (ramas o brotes con hojas) con los síntomas observados, y que no estén en estado muy avanzado, para facilitar la detección y evitar que se deteriore la muestra durante el transporte. El peciolo y los nervios de la hoja contienen gran cantidad de vasos xilemáticos, es por lo que la muestra siempre debe contener hojas maduras, a ser posible que no procedan de brotes nuevos en crecimiento. Las hojas o el brote que componen la muestra se deben envolver en papel de aluminio, conservar refrigerados (4-8 °C), y transportar en una bolsa de plástico o recipiente cerrado, y siempre con etiqueta. Es importante revisar el material vegetal recogido para asegurarse de que no contenga ninguna especie de insecto vector en forma juvenil o adulto.

La bacteria puede producir infecciones latentes, y algunos de los síntomas que provoca son inespecíficos, lo que ocasiona que se puedan confundir con otras causas, por lo que, aunque no se detecten síntomas de presencia de *X. fastidiosa*, también se puede realizar una toma de muestras asintomáticas. En las plantas asintomáticas, el muestreo deberá ser representativo de la parte aérea de la planta. En los olivos centenarios de Italia la detección es más eficaz en las muestras recogidas de la parte más alta de la copa. En plantas individuales, se tomarán al menos 4-10 ramas, dependiendo del tamaño de la planta.

En las prospecciones sistemáticas sobre los principales cultivos: vid, cítricos, olivo, frutales de hueso, almendro y *Quercus* se deben recoger muestras asintomáticas obligatorias (al menos una muestra/especie) para comprobar la ausencia de la bacteria en el territorio peninsular. Las muestras asintomáticas

se recogerán una vez al año, preferiblemente durante el período cálido y húmedo (final verano-principio otoño), aunque, dependiendo de las zonas y de las especies, podrían recogerse durante todo el período vegetativo.

En el caso de muestras sintomáticas, se tomará una muestra representativa de los brotes o ramas que presenten síntomas de presencia de la bacteria, a ser posible que no estén en estado muy avanzado. Conviene recoger varios brotes o ramas que contengan al menos 10-25 hojas en total (dependiendo del tamaño de la hoja). Es preferible que los brotes o ramas no procedan de partes jóvenes y en crecimiento, pues en las partes más viejas es donde se detecta una mayor concentración de la bacteria, y la muestra puede proceder de una única planta, aunque es aconsejable recoger varias muestras representativas de los síntomas observados y de varias plantas que presenten dichos síntomas.

Los síntomas característicos de la presencia de *X. fastidiosa* son el quemado de hojas y brotes, marchitez y decaimiento generalizado (descritos en distintos capítulos de este libro). Este tipo de síntomas son inespecíficos, y también se pueden producir por otras causas no asociadas a ninguna plaga (agentes abióticos o medioambientales): estrés hídrico, viento, salinidad, exceso de nutrientes, etc. La diferencia entre los síntomas producidos por estas causas y los ocasionados por la presencia de *X. fastidiosa* radica en que, cuando se deben a causas abióticas o medioambientales, el quemado de hojas suele ser generalizado, afectando tanto a las partes jóvenes como a las más viejas, y suele observarse en todas las plantas del mismo lote, puesto que se han desarrollado en las mismas condiciones. Cuando el síntoma se debe a la presencia de *X. fastidiosa*, se observan más en las partes en crecimiento de la planta.

5. Medidas a adoptar en caso de sospecha o introducción de la bacteria

5.1. Actuaciones en caso de sospecha de presencia de *X. fastidiosa*

La gravedad de las enfermedades causadas en los cultivos por *X. fastidiosa* hace necesario que las autoridades responsables de la sanidad vegetal lleven a cabo actuaciones y tomen medidas cautelares, incluso cuando se trate de una sospecha de presencia de la bacteria y hasta que se confirme la misma, o el resultado final sea negativo. La sospecha de la presencia de un brote de *X. fastidiosa* puede producirse a través de los controles oficiales, de las notificaciones pertinentes por parte de otras comunidades autónomas o Estados miembros,

o de cualquier otro medio; en esos casos deben adoptarse una serie de medidas cautelares orientadas a confirmar o desmentir la presencia del organismo y a evitar su propagación mientras se define la situación. Estas medidas son las siguientes:

- Realizar inspecciones en la zona implicada en la sospecha, con el fin de recabar información y comprobar los siguientes aspectos:
 - Verificar *in situ* la presencia de los síntomas sospechosos.
 - Realizar un muestreo de vegetales hospedantes en las proximidades de las plantas sospechosas (al menos 100 m).
 - Obtener tanta información como sea posible, incluyendo el historial y la trazabilidad del origen y destino de los vegetales o productos vegetales relacionados con la sospecha, así como los detalles de cualquier movimiento del material vegetal en la zona afectada.
 - Localizar las parcelas de producción de plantas hospedantes o viveros que produzcan o comercialicen todas las plantas hospedantes, tanto sintomáticas como asintomáticas (al menos en un radio de 10 km).
- Registrar inmediatamente toda la información relativa a la presencia o sospecha de presencia de *X. fastidiosa*.
- Inmovilizar de forma cautelar los vegetales o productos vegetales de los cuales se hayan tomado las muestras, excepto que el movimiento pueda producirse bajo control oficial por parte de la comunidad autónoma y siempre que se compruebe que no existe ningún riesgo identificable de propagación del organismo.
- Las plantas que están bajo sospecha se deberán separar físicamente de las plantas de especies hospedantes que no lo están, y cubrir con una malla para evitar una posible contaminación a través de insectos vectores.
- Prohibir, en la medida de lo posible, el acceso a la zona a personas y vehículos, puesto que pueden servir de vía de transporte de insectos vectores adheridos a la ropa, o en el interior de vehículos.
- Realizar un muestreo de insectos vectores potenciales de *X. fastidiosa*, en la parcela/vivero y en las proximidades (al menos 100 m alrededor, que es la distancia de vuelo de los insectos vectores).

- Realizar un tratamiento fitosanitario para el control de insectos vectores.
- Eliminar los restos de poda o restos del material enfermo que procedan de las plantas sospechosas, mediante quemado o triturado en la propia parcela/vivero.
- Eliminar las malas hierbas de especies sensibles a *X. fastidiosa*, en la parcela o vivero.
- Informar de inmediato a cualquier persona que tenga bajo su control vegetales que puedan estar infectados por *X. fastidiosa*, sobre la sospecha de la presencia, las posibles consecuencias y riesgos, así como de las medidas que se deben adoptar para evitar su dispersión.

Se realizarán igualmente las siguientes investigaciones:

- Determinación de la fuente/s primaria/s de la sospecha de contaminación y obtención de cualquier otra información que pueda ayudar a establecer la trazabilidad del material bajo sospecha.
- Si existe riesgo de contaminación de material vegetal que proceda o se dirija a otra comunidad autónoma o Estado miembro, la comunidad autónoma en la que se produzca la sospecha de contaminación debe informar inmediatamente al Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, para que este a su vez informe a las comunidades autónomas o Estados miembros afectados. Las comunidades autónomas a las que se informe, aplicarán las medidas preventivas recogidas en su plan de contingencia.

5.2. Medidas a adoptar en caso de confirmación de presencia de *X. fastidiosa*

Una vez confirmada la presencia de la *X. fastidiosa* debe ponerse en marcha, en primer lugar, un sistema de notificación y comunicación del brote entre la comunidad autónoma, el Ministerio y el resto de Estados miembros, de manera que, cumpliendo los plazos establecidos, todas los organismos tengan conocimiento de la detección del foco y la información disponible para poder tomar las medidas y decisiones oportunas.

De manera esquemática, las acciones a desarrollar y las medidas a adoptar son las siguientes:

- Los organismos oficiales de la comunidad autónoma deberán proceder al establecimiento de una o varias zonas demarcadas, conforme a la Decisión 2015/789/UE, delimitando una zona infestada y una zona tampón.
- En estas zonas se deben adoptar las medidas de erradicación previstas en el artículo 6 de la citada Decisión y recogidas en el correspondiente plan de contingencia.

Sin embargo, la legislación establece la posibilidad de no establecer una zona demarcada, en casos de presencia aislada de *X. fastidiosa* y cuando la presencia de la bacteria se pueda eliminar con la destrucción de los vegetales en los que se haya detectado. En estos casos será preciso actuar de inmediato para determinar si se han infectado otros vegetales.

Las medidas de erradicación y/o contención que se deben adoptar contra *X. fastidiosa* se distinguen entre las que se han de aplicar en la zona infestada y las que se han de llevar a cabo en la zona tampón.

En la zona infectada las medidas irán encaminadas a la erradicación de la plaga: realización de tratamientos fitosanitarios para los insectos vectores; eliminación y destrucción de todos los vegetales infectados así como los que presenten síntomas y las plantas hospedadoras; prohibición de replantar plantas hospedadoras y muestreo asintomático obligatorio según NIMF n.º 31 sobre todos los vegetales especificados.

En la zona tampón se realizarán prospecciones sistemáticas según una cuadrícula de 100 x 100 m para detectar síntomas de presencia. Además, en toda la zona demarcada (zona infectada + zona tampón) se restringe el movimiento de vegetales especificados salvo en determinadas condiciones, se realizarán buenas prácticas agrícolas, se realizarán actividades de comunicación y divulgación, así como se llevará a cabo una señalización vial para indicar su delimitación.

5.2.1. Delimitación de zonas demarcadas e información a recabar

El artículo 4 de la Decisión 2015/789/UE obliga a delimitar una zona demarcada en caso de confirmación de la presencia de *X. fastidiosa*, que consistirá en una zona infectada y una zona tampón (10 km alrededor), en la que se adoptarán una serie de medidas con el objetivo de erradicar la bacteria.

Una zona demarcada se compondrá de las siguientes zonas:

- Una *zona infectada* que incluya:
 - Vegetales cuya infección esté confirmada.
 - Vegetales que muestren síntomas que indiquen una posible infección (decaimiento, quemado de hojas).
 - Vegetales susceptibles de estar infectados por *X. fastidiosa* debido a su proximidad con: los vegetales infectados o con una fuente de producción común, si se conoce, con vegetales infectados, o vegetales desarrollados a partir de estos (mismos lotes que las plantas infectadas, o vegetales obtenidos a partir de plantas infectadas).
- Una *zona tampón* con una anchura mínima de 10 km alrededor de la zona infectada. La delimitación exacta de las zonas se debe basar en principios científicos sólidos, la biología del organismo especificado y sus vectores, el nivel de infección (presencia de síntomas o infección latente), la presencia de vectores y la posible distribución de los hospedantes en la zona. Si se confirmara la presencia de *X. fastidiosa* fuera de la zona infectada, se revisará y modificará, en consecuencia, la delimitación de la zona infectada y la zona tampón.

La delimitación de la zona demarcada se deberá indicar mediante señalización vial. En dicha zona, es fundamental identificar las especies hospedantes afectadas en el brote (género, especie, variedad, porta-injerto, edad, fase de desarrollo, posibles replantaciones, etc.) de cara a una adecuada gestión del mismo. Además, es necesario identificar el género, la especie, la variedad y el portainjerto. La bacteria tiene más de 300 hospedantes identificados, cuyo listado se encuentra en continua actualización debido a la frecuente detección de nuevos hospedantes. Además, dentro de una misma especie se ha observado distinta sensibilidad de las variedades o porta-injerto utilizado a *X. fastidiosa*, como es el caso de la diferente sensibilidad detectada en las variedades de olivo afectadas en Italia.

Se aportará cualquier estimación de extensión e impacto del daño que se considere oportuna. La extensión del daño es una fuente de información sobre la dispersión que ha tenido lugar en la zona afectada, y el tiempo estimado de presencia de la enfermedad.

Se deben poner en marcha investigaciones para intentar identificar el posible origen de la plaga en el territorio, si es posible. El movimiento o im-

portación de plantas infectadas parece ser la principal vía de entrada de *X. fastidiosa* en España, ya que el movimiento intracomunitario procedente de zonas demarcadas o la importación de plantas procedentes de terceros países en los que está presente la bacteria, o la multiplicación vegetativa realizada con material infectado han sido responsables de brotes en Italia y Francia. Por ello se deberá investigar la trazabilidad de origen del material infectado.

5.2.2. Medidas de erradicación

En caso de detección de un brote de *X. fastidiosa* se deberán aplicar una serie de medidas obligadas por la legislación europea, con el objetivo de erradicar la plaga en la zona infectada: destrucción de vegetales infectados y los situados en los alrededores, realización de tratamientos fitosanitarios para el control de insectos vectores, buenas prácticas agrícolas para una adecuada gestión de la bacteria y el vector, etc.

Antes de la eliminación de los vegetales infectados y los situados en las proximidades (100 m) anteriormente definidos, se deberán aplicar tratamientos fitosanitarios adecuados contra los insectos vectores y contra las plantas que puedan hospedar a dichos vectores. Entre estos tratamientos podrá figurar, según proceda, la eliminación de los vegetales, lo que se puede hacer por diferentes técnicas: segado, control químico mediante la aplicación de herbicidas, laboreo del suelo o escarda manual. Además, mientras se mantenga vigente la zona demarcada, se pueden realizar tratamientos fitosanitarios contra los insectos vectores al menos en la zona infectada para evitar una posible propagación de la bacteria.

Se eliminarán y destruirán todos los vegetales y partes de vegetales que han sido inspeccionados y cuya infección se ha probado mediante la realización de análisis, así como los vegetales próximos localizados en un radio de 100 m alrededor de los infectados:

- Las plantas hospedadoras, con independencia de su estado sanitario.
- Los vegetales cuya infección por *X. fastidiosa* esté confirmada.
- Los vegetales con síntomas de una posible infección, o sospechosos de estar infectados por el patógeno.

Dicha eliminación se hará con posterioridad a la realización del tratamiento fitosanitario contra los insectos vectores, y a la realización del muestreo de conformidad con la NIMF n.º 31. La eliminación deberá llevarse a cabo de tal modo que no quede ningún resto del vegetal eliminado donde pueda sobrevivir la bacteria, y deberán tomarse todas las precauciones necesarias para evitar la propagación de *X. fastidiosa* durante y después de la eliminación. La destrucción se llevará a cabo *in situ* o en un lugar cercano designado a tal fin, dentro de la zona infectada. La eliminación consistirá en el arranque de los árboles, incluido el sistema radicular, y quemado o triturado de los mismos.

Se deberán aplicar las prácticas agrícolas adecuadas para la gestión de *X. fastidiosa* y de sus vectores. En este sentido, en Italia se están llevando a cabo una serie de medidas culturales e higiénicas de forma complementaria, y cuyo principal objetivo es mantener las plantaciones en un estado sanitario adecuado.

5.2.3. Medidas para evitar propagación

Estas medidas tienen como objetivo evitar la propagación, y están encaminadas a reducir al mínimo la cantidad de inóculo bacteriano y mantener la población de insectos vectores al nivel más bajo posible. Estas medidas se deben llevar a cabo tanto si se está aplicando una estrategia de erradicación como de contención.

Para ello, se restringe el movimiento de vegetales especificados que se hayan cultivado durante al menos parte de su vida en una zona demarcada, debido a que se considera que tienen un elevado riesgo fitosanitario, salvo cuando dichos vegetales se hayan cultivado en un sitio que cumpla determinados requisitos fitosanitarios que garanticen la máxima probabilidad de ausencia de *X. fastidiosa*.

Además, se prohíbe la plantación de plantas hospedadoras en la zona infectada, para evitar nuevas infecciones en la zona demarcada, salvo que se realice en cultivos protegidos o cuando sea con fines científicos y en condiciones controladas en las que no exista riesgo de dispersión.

La circulación de vegetales especificados que se hayan cultivado parte de su vida en una zona demarcada de *X. fastidiosa* está prohibida, salvo que se cumplan determinados requisitos que garanticen la máxima probabilidad de ausencia de la bacteria y el vector (sitio de producción autorizado, controles intensivos y requisitos durante el traslado), o los vegetales se hayan cultivado *in vitro* durante todo el ciclo de producción y se cumplan determinadas condiciones.

Referencias bibliográficas

DIRECTIVA 2000/29/CE del Consejo de 8 de mayo de 2000 relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad.

DECISIÓN DE EJECUCIÓN (UE) 2015/789 de la Comisión de 18 de mayo de 2015 sobre medidas para evitar la introducción y propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*).

DIRECTIVA 92/105/CEE de la Comisión, de 3 de diciembre de 1992, por la que se establece una determinada normalización de los pasaportes fitosanitarios destinados a la circulación de determinados vegetales, productos vegetales y otros objetos dentro de la Comunidad, y por la que se establecen los procedimientos para la expedición de tales pasaportes y las condiciones y procedimientos para su sustitución.

NORMA NIMF 31: Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias, Metodologías para muestreos de envíos.

WELL y RAJU (2017): «Plan de Contingencia de *Xylella fastidiosa*»; Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.

Consideraciones sobre la situación de *Xylella fastidiosa* en la Unión Europea y en España

Conclusiones y perspectivas

María M. López^a, Ester Marco-Noales^a y Blanca B. Landa^b

^aInstituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (España, Valencia, Moncada)

^bInstituto de Agricultura Sostenible-CSIC (España, Córdoba)

1. Situación de *Xylella fastidiosa* en Europa

La primera reflexión que surge es que, desgraciadamente, se ha cumplido la premonición que A. H. Purcell escribió hace ahora veinte años (Purcell, 1997). El mayor experto norteamericano en *X. fastidiosa* y sus vectores argumentaba que, aunque esta bacteria solo se había encontrado en países americanos y en Taiwán, el hecho de que se hubiera detectado en la década de 1990 en cítricos y en adelfa, causando nuevas enfermedades que se extendían con gran rapidez, sugería que fuera de América se debían mantener medidas de vigilancia fitosanitaria, para evitar su introducción: *Previously unrecorded plant diseases in citrus and oleander caused by Xylella fastidiosa have rapidly spread, suggesting that vigilant phytosanitary measures outside America, should be maintained against its introduction.*

Y él se hacía las preguntas clave: ¿es esta bacteria una amenaza potencial para otros continentes? ¿Es un problema regional o una amenaza global? Ahora es fácil responder, tras las detecciones europeas en Italia, Alemania, Francia y España: se trata de una amenaza global, por tratarse de una bacteria con mucha más capacidad de afectar a múltiples especies vegetales y que está causando muchas más pérdidas, al menos en Italia, de lo que se podía sospechar en 1997.

La advertencia de Purcell no tuvo suficiente eco, ya que los países de la UE parecían más interesados en aprovechar las ventajas del comercio global que en protegerse de las graves enfermedades y de las plagas que podían ser introducidas con los productos importados. Así debió introducirse *X. fastidiosa* en la UE, siendo transportada en avión o en barco con plantas ornamentales u otros tipos de material vegetal infectado, procedente de países del continente americano.

Desde entonces también hemos aprendido que *X. fastidiosa* tiene un comportamiento impredecible en nuevas zonas y que nos quedan muchos misterios sobre ella por resolver. Aunque la enfermedad era conocida en vid desde hace más de cien años, y en este cultivo se convive con ella en zonas de California y otros estados de EEUU, como ya se ha indicado (Capítulos 1 y 8), allí sigue causando grandes pérdidas. Se ha estimado que solo en EEUU anualmente causa 56,1 millones de dólares en pérdidas de producción y de reposición de material vegetal, y es importante señalar que, cada año, se dedican a investigación sobre la enfermedad y la bacteria que la causa 48,3 millones de dólares, que son proporcionados no solo por el gobierno, sino también por la industria, los viveros y otros estamentos de California (Tumber *et al.*, 2014) (Capítulo 8).

La situación en la UE se puede ilustrar con dos ejemplos descritos en este libro. La inesperada detección de *X. fastidiosa* en el sur de Italia (Saponari *et al.*, 2013), y las pérdidas económicas que actualmente han sido evaluadas por la Federación Regionale Coldiretti Puglia en 10 millones de olivos infectados y unas pérdidas superiores a 1 millón de euros (Minerva, 2017) (Capítulo 10), hace que no sea exagerado considerarla como el mayor problema fitopatológico mundial de la historia reciente. Ello justifica su repercusión mediática, que le ha llevado a cubrir varios artículos de opinión de las revistas de investigación multidisciplinares más prestigiosas del mundo como *Science* o *Nature* desde 2015 (Abbot, 2016; 2017; Almeida, 2017). Pero las pérdidas que *X. fastidiosa* ha originado en Italia, no necesariamente van a repetirse en otros países, si somos capaces de aprender de la experiencia italiana y no repetir los errores que allí se han cometido. Además, parece que allí se dieron unas condiciones muy especiales, que desgraciadamente propiciaron la tormenta perfecta: una introducción inesperada de una nueva cepa de *X. fastidiosa* muy agresiva, que se adaptó especialmente bien a los olivos de Apulia, abundancia de plantaciones de edad avanzada de variedades muy sensibles, presencia de grandes poblaciones de *Philaenus spumarius*, un vector muy eficiente que puede desarrollar perfectamente su ciclo en la cubierta vegetal que es muy común en los olivares existentes en la zona, unido a unas condiciones climáticas muy favorables, tanto para la bacteria, como para el vector.

La situación en Francia, sin embargo, no ha sido tan dramática. Tras la detección en Córcega en 2015 y en las regiones de Provenza-Alpes-Costa Azul (Capítulo 11), se ha visto que la bacteria afectaba básicamente a plantas ornamentales como *Polygala myrtifolia* y retama pero no a la vid, ni al olivo, ni

a los cítricos. Y en Alemania se ha detectado solo puntualmente en plantas ornamentales de un invernadero.

Surge la duda de si realmente son solo estos países de la UE, entre ellos España (Capítulos 12 y 13), los que ya tienen introducida *X. fastidiosa* en sus cultivos, y/o plantas ornamentales y/o masas forestales. El tiempo dará una respuesta. Hasta 2013 se consideraba que *X. fastidiosa* no estaba presente en países de la UE, pero esta hipótesis era posiblemente demasiado optimista, ya que tampoco se buscaba intensivamente la bacteria en ningún país, salvo algunas excepciones. En base a las intercepciones de material vegetal de distintas especies identificadas en los últimos años en varias fronteras de países europeos, es presumible que haya habido muchas más introducciones de las señaladas, pero que hayan pasado desapercibidas al no tener todavía serias consecuencias económicas y/o no se hayan diseminado al no haber vectores eficientes en la zona. Además, hay que tener en cuenta que ni los focos italianos, ni los franceses, ni los de Baleares parecen de reciente introducción.

Los trabajos realizados en distintos países muestran que los síntomas de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* no son específicos en la mayoría de los casos, por lo que se requieren análisis moleculares en laboratorios especializados, siguiendo protocolos oficiales como el publicado recientemente por la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO, 2016). Pero en el mismo ya se comenta la dificultad de dichos análisis, debido a la irregular distribución de la bacteria en muchas plantas huéspedes y las bajas poblaciones de la misma en los meses fríos, la presencia de inhibidores en muchas especies vegetales, etc., lo que puede dar origen a falsos negativos en los análisis (Capítulo 5).

Actualmente *X. fastidiosa* ya ha sido detectada en España, lo que, junto a las detecciones recientes en Francia y Alemania, demuestra que cuando se busca intensamente esta bacteria, en la época apropiada y con los métodos de diagnóstico más sensibles, se puede encontrar. Se trata de un patógeno anunciado, ya que en nuestro país y otros de la UE, se han importado y se siguen importando plantas procedentes de países donde está presente la enfermedad. La sanidad de esas plantas no está totalmente garantizada, a pesar de tomarse y analizarse muestras (más o menos representativas de los lotes importados), cumpliendo la legislación europea (Capítulo 5), porque las técnicas analíticas son de sensibilidad limitada y los recursos de la bacteria, como estamos comprobando día tras día, numerosos.

Dada la abundancia de especies huéspedes que recoge la lista publicada por EFSA (EFSA, 2016), y que se ha incrementado en más de cuarenta nuevas plantas hospedadoras en los últimos tres años (https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures/xylella-fastidiosa/susceptible_en), muchos países europeos, entre otros España, tienen huéspedes potenciales en todas sus provincias, siendo algunos de ellos, como el olivo y la vid, cultivos estratégicos para nuestra economía, pero otros como lavanda, romero, retama, acebuche, etc., son especies típicas del paisaje mediterráneo. Los únicos factores actualmente conocidos que pueden limitar la diseminación de *X. fastidiosa* son la ausencia de vectores eficientes (Capítulo 4) y el frío invernal, como señalan las evaluaciones de riesgo (Capítulo 6). Por eso, es posible que en España y los demás países mediterráneos los daños potenciales puedan ser importantes si no se toman medidas estrictas, ya que especialmente las zonas de clima más templado, como todas las costeras, poseen unas condiciones favorables para la supervivencia de la bacteria y sus vectores potenciales y para el desarrollo de la enfermedad, debido a la combinación de temperaturas templadas día y noche, lluvias más o menos regulares y largo período vegetativo de las plantas sensibles.

2. Situación de *Xylella fastidiosa* en España

La historia de *X. fastidiosa* en España está empezando a escribirse, pero la información disponible sugiere que comenzó hace ya bastantes años en Baleares (Capítulo 12). Su origen y extensión en la Comunidad Valenciana se están estudiando todavía (Capítulo 13). Y es posible que en los próximos meses o años se detecte en otras zonas españolas, quizás no en olivo, almendro, vid u otros huéspedes de interés económico, que es en los que prioritariamente se busca, sino en jardines o viveros en plantas ornamentales. Pero, si hay vectores en la zona, el riesgo de que, estando en las plantas ornamentales, pueda pasar a las cultivadas es alto.

En el tema de los vectores, en distintos países se han identificado diferentes insectos transmisores de esta bacteria (Capítulo 4), y la falta de evidencia clara de un vector o vectores eficaces en Francia y en Baleares podría ser debida a que los que están transmitiendo la bacteria en dichas zonas no sean los esperados, pudiendo incluso tratarse de otras especies, no previamente descritas como vectores.

Los riesgos para España, siguiendo los que describía el mismo Purcell para Europa (Purcell, 2013), se pueden concretar, entre otros ya indicados, en los siguientes:

- La dificultad de detección de *X. fastidiosa*, debida tanto a la distribución no uniforme de la bacteria en los tejidos del huésped como a su presencia en forma latente y a la insuficiente sensibilidad, en algunos casos, de las técnicas de que se dispone.
- Las posibles introducciones periódicas del patógeno en el país por importación de numerosos huéspedes (asintomáticos), no solo de fuera de la UE, sino por movimientos comerciales de plantas dentro de la misma.
- La capacidad potencial que tienen muchos Cicadellidae, incluyendo numerosas especies presentes en Europa de transmitir *X. fastidiosa*, y que *Philaenus spumarius* no sea el único vector.
- El desconocimiento que se tiene sobre la capacidad de posibles vectores de sobrevivir el invierno en estado adulto, e incluso de pasar desapercibidos en vegetación adyacente o espontánea de zonas lindantes con cultivos y que pueden actuar como reservorios del patógeno y del vector (Capítulo 3).

Por ello, es importante realizar una divulgación activa e intensiva al gran público español, sobre la necesidad de intentar la erradicación rápida de la bacteria en zonas nuevas, si los conocimientos científicos lo aconsejan, pensando en sus ventajas a largo plazo, en contraposición a la contención (Capítulo 7). Esta última estrategia, a medio plazo, permite que la bacteria se vaya extendiendo y acabe poco a poco con las plantas huéspedes en una zona y que sus vectores dispersen a zonas limítrofes el problema, como está ocurriendo actualmente en el sur de Italia, si las medidas de contención no son aplicadas adecuadamente y por todos los agricultores.

3. Diversidad genética y huéspedes potenciales

Es necesario ser muy conscientes del limitado conocimiento actual sobre la diversidad genética de *X. fastidiosa*, sus factores de virulencia y las bases de la especificidad de huésped y de vector (Capítulo 2). Se sabe que es frecuente

la recombinación homóloga entre cepas de esta especie (Almeida y Nunney, 2015) y se sigue confirmando en los nuevos brotes o intercepciones de Italia, Francia y España (Loconsole *et al.*, 2016; Denancé *et al.*, 2017; Olmo *et al.*, 2017), por lo que la gama de huéspedes o incluso la biología de nuevos genotipos resultan, a priori, desconocidos. Por otro lado, los grandes avances en investigación que se están obteniendo en Italia desde 2014, desafortunadamente no tienen por qué ser extrapolables a España, al tratarse de diferentes subespecies y genotipos de la bacteria (Capítulos 1 y 2).

En la UE, la legislación sobre la necesidad de análisis del material importado procedente de países terceros y de prospecciones en todas las posibles plantas huéspedes, o al menos en los cultivos estratégicos en cada país y en plantas trampa como *P. myrtifolia*, comenzaron en 2015, pero posiblemente los casos positivos detectados representan solo una minoría de los reales. Y solo con los resultados disponibles hasta ahora, resulta muy sorprendente la diversidad genética de las cepas de la bacteria que se han introducido y su comportamiento en cuanto a la gama de huéspedes.

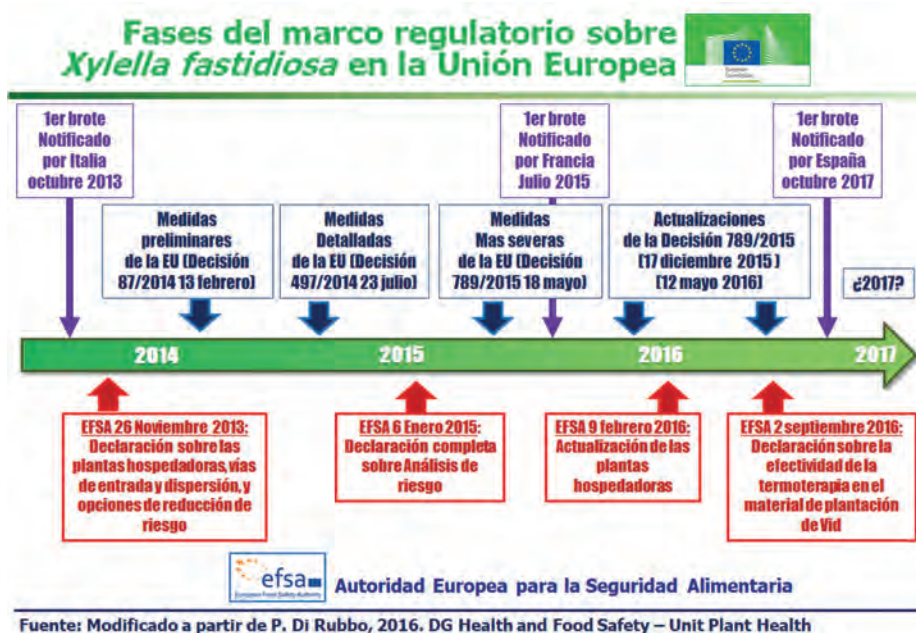
Incluso en países donde hay genotipos conocidos de la bacteria, no se pueden aventurar de forma exacta los huéspedes potencialmente afectados y los daños previsibles, basándose en la experiencia de otras zonas, ya que en cada lugar hay que considerar el papel de los vectores locales, que es crucial y determinante para la gravedad de la enfermedad, las condiciones climáticas particulares de cada región, y las especies vegetales circundantes que pueden actuar como reservorio, etc. Lo sucedido en un territorio no es extrapolable a otro. Ello justifica que la legislación europea defienda la erradicación como la medida más adecuada a tomar en los nuevos brotes, con el fin de prevenir males mayores.

La situación con *X. fastidiosa* presente en una zona se ha demostrado que nunca es estable y nuevas introducciones, tanto de la bacteria como de nuevos vectores (más eficientes en la transmisión o más polífagos), pueden conducir a desastres inesperados, afectando la bacteria a nuevos cultivos o causando mayores pérdidas en zonas en las que la enfermedad ya es endémica, tal y como ocurrió en California con la entrada del vector *H. vitripennis* procedente de México (Capítulo 4).

4. Legislación y su cumplimiento

La UE ha sido realmente muy rápida en legislar las normas necesarias para la prevención de *X. fastidiosa* en los países miembros, tras ser consciente de que la carencia de una legislación específica respecto a las importaciones de plantas de países terceros, parece haber sido responsable de la introducción de la enfermedad en Italia. Por ello, tras la inesperada notificación de la detección de la bacteria en octubre de 2013, se publicaron varias normativas (Capítulo 14). Es importante destacar que, a partir de 2014, la legislación se ha apoyado en el conocimiento científico obtenido en investigaciones específicas financiadas por EFSA o consensuadas por paneles de expertos (Figura 1). A partir de entonces, la mayoría de los países europeos, entre ellos España, han diseñado planes de contingencia, más o menos completos, que presentan en muchos casos el problema de la falta de fondos específicos para ser ejecutados con garantías.

Figura 1. Marco regulatorio puesto en marcha en la Unión Europea tras la primera detección en 2013 de *Xylella fastidiosa* en Apulia



Respecto a las opciones de reducción del riesgo, la EFSA recomienda la prevención de la introducción de material vegetal contaminado y de insectos vectores. En este sentido, ya se ha indicado (Capítulo 5) que se deberían definir claramente las zonas libres de *X. fastidiosa* en la UE y en países terceros (tras intensivas prospecciones y análisis), y limitar al mínimo imprescindible las importaciones de países en los que está presente la bacteria, aunque tengan la documentación en regla.

Una vez confirmada la presencia de *X. fastidiosa* en un territorio por vez primera, se debe proceder a la destrucción inmediata del material vegetal infectado, según indica la normativa europea (Decisión de ejecución 2015/789). No obstante, es necesario tener en cuenta que las acciones mencionadas de erradicación solo son efectivas en el control de la bacteria a medio plazo, si son aplicadas en los primeros momentos tras su detección y cuando sean pocas las plantas afectadas, y el número de focos escaso, y si se actúa con rapidez, o si se intercepta en frontera (Capítulo 7). Por el contrario, dichas acciones dejan de ser efectivas una vez que la enfermedad se ha establecido en una zona. Así, en California, EEUU, donde la bacteria es endémica y llevan más de cien años conviviendo con el problema, todas las medidas de control que se llevan a cabo están basadas en el escape, la terapia y la resistencia, y no existen esfuerzos de erradicación activos ni planeados centrados en el material vegetal pero sí planes de acción sobre diferentes especies de insectos vectores.

En el caso particular de Italia, la UE cita, en un informe de la auditoría DG(SANTE) 2016-8794–MR llevada a cabo en 2016 y publicada el 31 de mayo (http://ec.europa.eu/food/audits-analysis/audit_reports/details.cfm?rep_id=3819), una serie de hechos fundamentales, o errores cometidos que han podido llevar a la expansión de la epidemia y a la situación catastrófica que se tiene allí en la actualidad: i) el monitoreo sistemático de la infección comenzó demasiado tarde, ii) han existido ‘retrasos excesivos’ en arrancar los árboles infectados; iii) las autoridades nacionales y regionales han desembolsado poco más de la mitad de los 10 millones de euros presupuestados para las medidas de contención (Abbot, 2017). Además, existen datos que evidencian la respuesta lenta de la Administración. Por ejemplo, en 2016, los laboratorios italianos implicados en la monitorización casi no procesaron ninguna muestra para *X. fastidiosa*, lo que indica que la monitorización cesó casi por completo. En este caso, la erradicación se vio frenada por movimientos ecologistas y ambientalistas extremistas, y el apoyo de la fiscalía a estos prohibiendo las medidas de erradicación y el control de los vectores (Abbot, 2017).

Es importante señalar que conocer con precisión el rango de plantas huésped para cada subespecie y genotipo (ST) de la bacteria presente en un área determinada, es clave para optimizar las medidas de erradicación, ya que permitiría eliminar solo aquellas especies vegetales que representen un riesgo real de ser reservorio de esa cepa/s del patógeno. Desafortunadamente la normativa actual solo se basa en las especies huésped a nivel de cada subespecie de *X. fastidiosa*. Por otra parte, los radios de erradicación y demarcación establecidos 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). Todo ello ayudaría a reducir los costes económicos y medioambientales de los programas de erradicación, favoreciendo su aceptación por parte de los diversos actores implicados. Además, los investigadores especialistas en sociología reconocen que la erradicación puede ser lograda solo si todas las partes interesadas, incluyendo la opinión pública, cooperan y contribuyen a través de interacciones positivas (Marzano *et al.*, 2015), que pasan necesariamente por una divulgación y educación correcta y eficaz. De hecho, algunos programas de erradicación de plagas han dedicado hasta un tercio de su presupuesto a la comunicación (Vicent y Blasco, 2017). Pero lo más necesario, al menos en España, basándonos en experiencias previas de erradicación eficaz como la del fuego bacteriano en los años iniciales, es una compensación económica rápida y adecuada por los arranques de los viveros o plantaciones, que también resulta imprescindible para la aceptación de la erradicación por la opinión pública y los medios.

5. Necesidad de incrementar las prospecciones y los análisis de *Xylella fastidiosa* en España

El Plan Nacional de Contingencia de *X. fastidiosa* establece los lugares a prospectar (plantaciones, viveros, centros de jardinería) y las intensidades de prospección (MAPAMA, 2017). En todas las comunidades autónomas se debería realizar una estricta vigilancia de importaciones ilegales, viveros y plantaciones, parques y jardines con plantas huéspedes, introducir en los esquemas de certificación de plantas a este patógeno, tanto en vid como en otros cultivos y plantas ornamentales huéspedes de la bacteria, favorecer la producción del material vegetal en viveros bajo malla para evitar insectos vectores, realizar análisis y control de vectores potenciales, análisis de plantas asintomáticas, etc.

No se tienen noticias de que se hayan realizado en ninguna comunidad autónoma prospecciones rutinarias en vid, cítricos, almendro, olivo u otras plantas huéspedes de esta bacteria, anteriores a la detección de *X. fastidiosa* en Italia en 2013. Hay que señalar que el Laboratorio de Bacteriología del IVIA de Valencia, que es también el Laboratorio Nacional de Referencia del MAPAMA, ha venido realizando análisis para detectar la bacteria desde finales de la década de 1990 en muestras de plantaciones o viveros españoles, pero solo de manera esporádica.

Además, desde 2013, la reducción casi generalizada del personal y presupuesto de los Servicios de Sanidad Vegetal en muchas comunidades autónomas ha hecho que las prospecciones y análisis de *X. fastidiosa* sean más limitadas de lo que se debiera y en muchos casos la mayoría de las inspecciones vayan dirigidas a la búsqueda de olivos con síntomas sospechosos, olvidando que los huéspedes de *X. fastidiosa* son más numerosos y abundantes en nuestro país.

Desde la Asociación Española de Sanidad Vegetal (AESaVE) se insiste en que es esencial que se realicen prospecciones en todas las comunidades autónomas, que se disponga de laboratorios especializados en las mismas y que se sea consciente de que este es un caso claro en el que prevenir es mejor que curar, y que *X. fastidiosa* podría causar en algunas zonas de España, si no se toman las medidas adecuadas de prevención, imprevisibles desastres económicos y medioambientales.

6. Necesidad de incrementar la investigación sobre *X. fastidiosa*

La investigación sobre *X. fastidiosa* en España hasta 2015 ha sido muy reducida, ya que se había limitado prácticamente a aspectos relacionados con la diversidad de las cepas de esta especie, los vectores potenciales y los métodos de diagnóstico y detección de la misma, realizados básicamente en el IAS-CSIC de Córdoba, el ICA-CSIC de Madrid, el IRTA de Barcelona y el IVIA de Valencia, con fondos no específicos para *X. fastidiosa*, sino de diversos programas internacionales, programas generales de investigación o fondos propios de remanentes de proyectos de los investigadores.

Desde 2014 el IAS-CSIC, el ICA-CSIC y el IVIA participan en el proyecto POnTE y desde 2016 en el XF-ACTORS, ambos financiados por el programa H2020 de la UE. Sin embargo, es necesario también que organismos españoles públicos o privados se impliquen en la financiación de investigaciones sobre esta bacteria que supone una amenaza real para nuestra agricultura.

El caso de EEUU, en que la Administración, los investigadores y el sector van al unísono para tratar de encontrar soluciones a los problemas planteados por *X. fastidiosa*, puede servir de ejemplo. En 2017 se ha presentado un proyecto de investigación, con participación de diversas instituciones españolas, a la convocatoria de Proyectos de investigación sobre patógenos emergentes (Proyectos de I+D Emergentes. E-RTA 2017) dentro de la convocatoria de Proyectos de Investigación Fundamental Orientada en el Marco del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad (reto de seguridad y calidad alimentaria, actividad agraria productiva y sostenible, sostenibilidad de los recursos naturales e investigación marina y marítima), y de concederse sería el primero para esta bacteria que contase con financiación pública española en una convocatoria competitiva, así como con una masa investigadora y centros de investigación participantes sin precedentes (13 centros nacionales, 3 centros extranjeros y 42 investigadores). Pero todavía está pendiente de aprobación y mientras tanto la bacteria va haciendo camino.

A pesar de los enormes avances sobre el conocimiento de *X. fastidiosa* y de su comportamiento en olivo, gracias al excelente trabajo y los esfuerzos de los investigadores italianos y muy especialmente del grupo liderado por D. Boscia y Maria Saponari en Bari, queda todavía mucho por aprender de esta bacteria polífaga. La EFSA, ya en 2014 y de nuevo en 2015, ha recomendado la intensificación de la investigación sobre *X. fastidiosa* en Europa, especialmente en los aspectos relacionados con su gama de huéspedes, epidemiología y control, particularmente en Italia (Figura 1). Sin embargo, la inesperada reciente detección de otras subespecies de la bacteria en Francia, Alemania y España, con situaciones muy distintas en cada uno de estos países, hace que en toda la UE se deban dedicar recursos específicos a investigar sobre los riesgos y problemas concretos que plantea *X. fastidiosa* en cada país y cultivo y sobre los mejores métodos para abordarlos.

La experiencia de los problemas ocurridos en Italia, con la oposición de ciertos sectores a las medidas de control de la enfermedad basadas en erradicación y contención, hace que esta investigación sea especialmente necesaria en el caso de esta bacteria tan mediática y en la que todos se sienten con derecho a opinar. Las instituciones educativas, las sociedades científicas y los organismos públicos de investigación tienen todavía un largo trecho por recorrer para propiciar que la ciencia permee en la sociedad, y para que las decisiones políticas para afrontar los problemas graves como el de *X. fastidiosa*, que amenazan

nuestro bienestar, se basen en el conocimiento y no solo en las opiniones (Landa *et al.*, 2016).

7. Perspectivas

Son varias las líneas a seguir después de esta nueva situación de la detección de *X. fastidiosa* en Europa desde 2013, puesto que la amenaza que supone para la agricultura debe abordarse desde distintos ángulos, sin perder de vista ningún enfoque. El marco legislativo del que actualmente se dispone debe cumplirse, pero, al mismo tiempo, se hace necesario, como ya se ha comentado anteriormente, avanzar en el conocimiento de los múltiples factores relacionados con esta situación, ya que de ese modo se podrán llegar a diseñar estrategias de manejo de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* basadas en el conocimiento científico.

En el marco de los dos proyectos europeos anteriormente mencionados se está intentando abordar esta problemática de modo integral, considerando todos los elementos clave relacionados con la misma. Y en este sentido, las líneas de investigación a medio plazo, en las que ya se está trabajando son las siguientes:

- Optimización de las técnicas de detección y diagnóstico, incrementando la capacidad de detectar la bacteria en fase completamente asintomática, con métodos económicos y de elevada sensibilidad. Puesta a punto de métodos serológicos basados en anticuerpos monoclonales específicos y de amplificación molecular que utilicen sistemas directos de preparación de muestras sin purificación de ADN. La finalidad última es utilizar, además de los métodos clásicos, sistemas amigables que permitan analizar miles de muestras, cubriendo más plantas de distintos cultivos, parques, jardines y masas forestales.
- Avance en el conocimiento de la biología de la bacteria: diferencias fenotípicas entre subespecies y ST, condiciones óptimas y subóptimas de crecimiento, límites de temperatura, capacidad de adaptación, requerimientos nutricionales, etc.
- Epidemiología de la enfermedad: descubrimiento de los factores relacionados con la capacidad de la bacteria para producir enfermedad en unos huéspedes y no en otros, en unas determinadas condiciones ambientales, presencia latente en plantas reservorio, etc.

- Diversidad genética de la especie, las subespecies, las cepas y papel de la recombinación homóloga en la capacidad de adaptación del patógeno.
- Patogenicidad de las cepas europeas para diferentes huéspedes.
- Resistencia/tolerancia varietal de diferentes huéspedes y papel real de esta en el manejo de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*.
- Nuevos métodos de control, amistosos con el medio ambiente, como la utilización de virus bacteriófagos específicos de *X. fastidiosa* y de péptidos antimicrobianos, y del microbioma endófito de los huéspedes.
- Secuenciación del genoma completo de las diferentes cepas europeas y obtención de información para entender la patogenicidad de estas a partir del mismo.
- Información de la expresión génica diferencial de *X. fastidiosa* en función de huésped, de planta *vs.* insecto vector, etc.

Xylella fastidiosa es una amenaza real y emergente para los países de Europa y más especialmente para los del Mediterráneo, por sus favorables condiciones climáticas y no solo para el olivo, la vid o los cítricos, sino también para los frutales de hueso y el almendro, plantas ornamentales y masas forestales. Las enfermedades que causa podrían tener a medio y largo plazo graves consecuencias, como ya se ha demostrado en Italia, ya que las pérdidas económicas potenciales serían elevadas y requerirían métodos de control de coste e impacto muy altos, tanto desde el punto de vista medioambiental (con la necesidad de numerosos tratamientos insecticidas) como económico.

Por ello es necesario actuar intensiva y coordinadamente para proteger la agricultura europea, y en particular la española, de la amenaza de *X. fastidiosa*. Conforme se van conociendo más a fondo las características de esta polífaga bacteria, de las enfermedades que causa y de los vectores que la transmiten, se va siendo muy consciente de todo lo que todavía nos queda por aprender sobre ella, dadas las enormes diferencias entre la situación creada en Italia y en otros países europeos, o las diferencias entre las enfermedades que causa en América, en EEUU y Brasil. Ello justifica la acuciante necesidad de fomentar la investigación interdisciplinar mediante colaboraciones entre distintos países y también en España entre distintos organismos y comunidades autónomas.

Por otra parte, una legislación adecuada y el cumplimiento riguroso de la misma, planes de contingencia y de prevención realistas, dinámicos y adecuados a las circunstancias locales, programas de inspección, prospección y

análisis, colaboración entre países y solidaridad entre comunidades autónomas, rapidez y transparencia en la información y comunicación, así como cooperación entre todos los sectores implicados son los pilares sobre los que se debe asentar una buena planificación en España para abordar el riesgo real que supone *X. fastidiosa*, ya que esta bacteria es un problema que nos afecta a todos.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a los proyectos POnTE (Pest Organisms Threatening Europe) y XF-ACTORS (*Xylella fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy), del programa Horizonte 2020 de la UE, su apoyo y financiación.

Referencias bibliográficas

- ABBOTT, A. (2016): «Gridlock over Italy's olive tree deaths starts to ease»; *Nature* (533); pp. 299-300.
- ABBOTT, A. (2017): «Italy rebuked for failure to prevent olive-tree tragedy»; *Nature* (546); pp. 193-194.
- ALMEIDA, R. P. P. (2016): «Can Apulia's olive trees be saved?»; *Science* 353(6297); pp. 346-348.
- ALMEIDA, R. P. P. y NUNNEY, L. (2015): «How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge?»; *Plant Disease* (99); pp. 1457-1467.
- DENANCÉ, N.; LEGENDRE, B.; BRIAND, M.; OLIVIER, V.; DE BOISSESON, C.; POLIAKOFF, F. y JACQUES, M. A. (2017): «Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France»; *Plant Pathology* (66); pp. 1054-1064.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA PANEL ON PLANT HEALTH), (2016): «Update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*: 23 November 2015»; *EFSA Journal* 4(2): 4378; pp. 40; doi:10.2903/j.efsa.2016.4378.
- EPPO (2016c): «PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*»; *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 46(3); pp. 463-500.

- JANSE, J. D. y OBRADOVIC, A. (2010): *Journal of Plant Pathology* (92); pp. 35-48.
- LANDA, B. B.; NAVAS, J. A.; LÓPEZ, M. M. y JIMÉNEZ-DÍAZ, R. (2016): «Una llamada a la sensatez y a la necesidad de apreciar y valorar la evidencia científica sobre *Xylella fastidiosa*»; *Phytoma* (276); pp. 12-13.
- LOCONSOLE, G.; SAPONARI, M.; BOSCIA, D.; D'ATTOMA, G.; MORELLI, M.; MARTELLI, G. P. y ALMEIDA, R. P. P. (2016): «Intercepted isolates of *Xylella fastidiosa* in Europe reveal novel genetic diversity»; *J. Plant Pathol.* (146); pp. 85-94.
- MAPAMA (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE). (2017): «Programa para la aplicación de la normativa fitosanitaria»; *Plan de contingencia de Xylella fastidiosa* (Well y Raju), 137 pp.
- MINERVA, M. C. (2017): «Xylella, 10 milioni di piante infette e un miliardo di danni»; *Quotidiano di Puglia Sabato 1 Aprile 2017 - Ultimo aggiornamento 02-04-2017* (13); pp. 10.
- OLMO, D.; NIETO, A.; ADROVER, F.; URBANO, A.; BEIDAS, O.; JUAN, A.; MARCO-NOALES, E.; LÓPEZ, M. M.; NAVARRO, I.; MONTERDE, A.; MONTES-BORREGO, M.; NAVAS-CORTÉS J. A. y LANDA, B. B. (2017): «First detection of *Xylella fastidiosa* infecting cherry (*Prunus avium*) and *Polygala myrtifolia* plants, in Mallorca Island, Spain»; *Plant Dis.* (101); pp. 1820.
- PURCELL, A. H. (1997): «*Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat?»; *Journal of Plant Pathology* (79); pp. 99-105.
- PURCELL, A. H. (2013): «Paradigms: examples from the bacterium *Xylella fastidiosa*»; *Annual Review of Phytopathology* (51); pp. 339-356.
- SAPONARI, M.; BOSCIA, D.; NIGRO, F. y MARTELLI, G. P. (2013): «Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy)»; *Journal of Plant Pathology* (95); pp. 668.
- TUMBER, K. P.; ALSTON, J. M. y FULLER, K. B. (2014): «Pierce's disease costs California \$104 million per year»; *California Agriculture* 68(1-2).
- VICENT, A. y BLASCO, J. (2017): «When prevention fails. Towards more efficient strategies for plant disease eradication»; *New Phytol.* (214); pp. 905-908; doi:10.1111/nph.14555.

