



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL DE FI DE MÀSTER

ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT VARIETAL DE VINYA I AMETLLER A *Xylella fastidiosa* A MALLORCA

Marina Montesinos Martorell

Màster Universitari en Biotecnologia Aplicada

(Especialitat/Itinerari de Medi Ambient)

Centre d'Estudis de Postgrau

Any Acadèmic 2019-20

ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT VARIETAL DE VINYA I AMETLLER A *Xylella fastidiosa* A MALLORCA

Marina Montesinos Martorell

Treball de Fi de Màster

Centre d'Estudis de Postgrau

Universitat de les Illes Balears

Any Acadèmic 2019-20

Paraules clau del treball:

Xylella fastidiosa, Pierce's Disease, Almond Leaf Scorch Disease, vinya, ametller.

Nom Tutor/Tutora del Treball **Dr. Diego Olmo García**

Resum

Durant el mes d'octubre de 2016 es va detectar per primera vegada a Espanya el bacteri fitopatogen *Xylella fastidiosa*. Aquesta detecció va ser Mallorca, concretament a Porto Cristo (Manacor) i posteriorment es van realitzar nombroses deteccions tant a l'illa de Mallorca com a les illes de Menorca i Eivissa (Olmo *et al.*, 2017). Entre els cultius més afectats es troben els ametllers de Mallorca, on s'ha detectat tant la subespècie *multiplex* com la *fastidiosa*; i la vinya, també a Mallorca, afectada per la subespècie *fastidiosa*. Ambdós cultius són els de major importància agronòmica de les illes, per aquesta raó en aquest treball s'han estudiat diverses combinacions de varietats i portaempelts tant de vinya com d'ametller per tal de poder establir un grau de tolerància/susceptibilitat de les varietats més importants. D'aquesta manera, s'han estudiat 19 varietats de vinya en condicions d'hivernacle inoculades artificialment amb el bacteri: 'Argamussa', 'Chardonnay', 'Giró ros', 'Prensal', 'Sauvignon Blanc', 'Vinater Blanc', 'Viognier', 'Viura', 'Cabernet', 'Callet', 'Esperó de Gall', 'Giró Negre', 'Gorgollassa', 'Mancés', 'Mandó', 'Manto Negro', 'Merlot', 'Syrah' i 'Tempranillo'; amb combinació amb 6 portaempelts: 'P1103', 'R110', 'R140', '41B', '161/49' i 'SO4'. Així com també s'han observat els símptomes de 19 varietats infectades de manera natural a camp: 'Viura', 'Syrah', 'Merlot', 'Callet', 'Gorgollassa', 'Sauvignon Blanc', 'Parellada', 'Viognier', 'Moscatell', 'Rielsing', 'Muscat', 'Tempranillo', 'Cabernet Sauvignon', 'Malvasia', 'Chardonnay', 'Manto Negro', 'Prensal', 'Giró Ros' i 'Giró Negre'. Pel que fa a ametller, s'han estudiat 10 varietats inoculades en condicions d'hivernacle: 'Marinada', 'Penta', 'Avijor', 'Marta', 'Vairo', 'Soleta', 'Belona', 'Isabelona', 'Guara' i 'Vialfas'; amb combinació amb 5 peus diferents: 'GxN', 'GF677', 'RP20', 'RP40' i 'RR'. A més, també s'ha estudiat la transmissió del bacteri mitjançant empelt a ametller, confirmant que és un mètode de transmissió, encara que en aquest assaig, de baixa efectivitat (15,4%). Les varietats més susceptibles de vinya tant en condicions d'hivernacle com en condicions de camp han estat 'Gorgollassa' i 'Viura'. Entre les varietats que han presentat menys símptomes es troba 'Giró Ros', la única que ho ha fet tant en camp com a hivernacle. En el cas de l'ametller, la varietat que major susceptibilitat mostra és 'Penta' encara que els resultats són insuficients per a arribar a unes conclusions fermes en quant a susceptibilitat varietal i es considera necessari continuar estudiant-la.

Paraules clau: *Xylella fastidiosa*, Pierce's Disease, Almond Leaf Scorch Disease, vinya, ametller.

Acrònims

PCR: Polymerase Chain Reaction (reacció en cadena de la polimerasa)

PWG: Periwinkle Wilt

BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract agar (agar tamponat de carbó vegetal i extracte de llevat)

EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization

LOSVIB: Laboratori Oficial de Sanitat Vegetal de les Illes Balears

LNR: Laboratori Nacional de Referència

IVIA: Institut Valencià d'Investigacions Agràries

MLST: Multilocus sequence typing (Tipificació multilocus de seqüències)

IAS-CSIC: Institut d'Agricultura Sostenible – Consell Superior d'Investigacions Científiques

ALSD: Almond Leaf Scorch Disease (cremada de la fulla de l'ametller)

Índex

1.	Introducció	8
1.1.	Antecedents	8
1.2.	Característiques generals	9
1.3.	Vectors	11
1.4.	Transmissió de <i>Xylella fastidiosa</i>	13
1.5.	<i>Xylella fastidiosa</i> a les Illes Balears	14
1.5.1.	Afecció del bacteri al cultiu de l'ametller (<i>Prunus dulcis</i>) a Mallorca	18
1.5.2.	Afecció del bacteri a vinya (<i>Vitis vinifera</i>) a Mallorca	20
1.6.	Mètodes de detecció del bacteri.....	21
2.	Objectius	24
3.	MAterial i mètodes.....	25
3.1.	Aïllaments.....	25
3.2.	Inoculacions.....	26
3.3.	Transmissió per empelts en ametller.....	30
4.	Resultats.....	32
4.1.	Aïllaments.....	32
4.2.	Inoculacions.....	34
4.2.1.	Inoculacions en vinya	34
4.2.2.	Vinya en condicions de camp	42
4.2.3.	Inoculacions en ametllers.....	47
4.3.	Transmissió per empelts	50
5.	Dlscussió.....	51
5.1.	Inoculacions en vinya	51
5.2.	Inoculacions en ametller	52
5.3.	Empelts en ametller	53
6.	Conclusions	54
7.	Publicacions i altres comunicacions derivades	55
8.	Bibliografia	57

Índex de figures

Figura 1. Micrografies electròniques de <i>Xylella fastidiosa</i> en vasos xilemàtics de vinya	9
Figura 2. <i>Philaenus spumarius</i> en diferents estadis a Itàlia	12
Figura 3. Distribució de les mostres positives a <i>Xylella fastidiosa</i> i la seva densitat en radis de 10 Km a les Illes Balears	16
Figura 4. Síntomes de <i>Xylella fastidiosa</i> en les fulles d'ametller	20
Figura 5. Síntomes en vinyes amb Pierce's Disease a Mallorca	21
Figura 6. Hivernacle de bioseguretat utilitzat en l'assaig, a les instal·lacions de la Conselleria.	25
Figura 7. Preparació de la mostra vegetal per a aïllar el bacteri.....	26
Figura 8. Preparació de l'extracte i de les plaques de BCYE per a aïllar <i>Xylella fastidiosa</i>	26
Figura 9. Procés d'inoculació. Esquerra: col·locació de la gota en ametller	29
Figura 10. Material vegetal utilitzat per a la realització dels empelts.	30
Figura 11. Procés de realització dels empelts	31
Figura 12. Distribució dels aïllats de <i>Xylella fastidiosa</i> obtinguts a les Illes Balears	32
Figura 13. Aïllament de <i>Xylella fastidiosa</i> a PWG vist en lupa.	32
Figura 14. Evolució de la malaltia de Pierce en vinya, varietat 'Gorgollassa (R110)', a partir de la setmana 5-6 fins la setmana 16.	34
Figura 15. Nombre de fulles afectades (severitat) segons la combinació de varietat-peu durant la setmana 14 després de la inoculació	38
Figura 16. Distribució dels percentatges d'incidència segons el mètode de cultiu.	45
Figura 17. Distribució del percentatge d'incidència de la malaltia, segons els tipus de raïm.	46
Figura 18. Nombre de fulles amb símptomes (Afecció), segons la combinació de varietat i peu d'ametller	49
Figura 19. Evolució dels empelts. Primera fotografia	50

Índex de taules

Taula 1. Mostres analitzades, nombre de positius i percentatges dels positius a <i>Xylella fastidiosa</i> , obtinguts a les Illes Balears entre octubre de 2016 i 9 de novembre de 2018	15
Taula 2. Subespècies i tipus genètics (STs) de <i>Xylella fastidiosa</i> de les mostres de les Illes Balears segons illa i planta hoste	17
Taula 3. Classificació de les varietats foranies més utilitzades a Mallorca segons l'afecció en camp de <i>Xylella fastidiosa</i>	18
Taula 4. Classificació de les varietats autòctones de Mallorca segons l'afecció en camp de <i>Xylella fastidiosa</i>	19
Taula 5. Varietats de vinya i combinacions varietat-peu utilitzades a l'assaig	27
Taula 6. Varietats + peu d'ametller utilitzar a l'assaig	28
Taula 7. Grau de severitat de Pierce's disease segons el nombre de fulles afectades en hivernacle	29
Taula 8. Graus de severitat de Pierce's disease en camp	30
Taula 9. Aïllaments realitzats de manera satisfactoria durant l'assaig	33
Taula 10. Índex de severitat i percentatges de positius de les mostres de vinya	35
Taula 11. Classificació segons la susceptibilitat a <i>Xylella fastidiosa</i> de les combinacions de varietat-portaempelt de vinya segons el nombre de fulles amb símptomes	39
Taula 12. Classificació segons la susceptibilitat a <i>Xylella fastidiosa</i> de les varietats de vinya segons el nombre de fulles amb símptomes amb el peu R110.	39
Taula 13. Classificació de les varietats assatjades segons els tipus de raïm	40
Taula 14. Nombre de fulles afectades per damunt i per a baix del punt d'inoculació durant la setmana 12 després de la inoculació.	41
Taula 15. Percentatge d'incidència i mitjana del grau de severitat de la malaltia de Pierce en camp en diferents municipis de Mallorca	43
Taula 16. Classificació de les varietats de vinya en condicions naturals segons el seu grau de susceptibilitat	45
Taula 17. Nombre i percentatge de positius mitjançant PCR de les combinacions varietats-portaempelt d'ametller	47
Taula 18. Nombre i percentatge d'empelts brotats i de empelts positius a PCR damunt 'Vivot (GF 677)'	50

1. INTRODUCCIÓ

Xylella fastidiosa és un bacteri de quarantena en la Unió Europea des de l'any 2000, és l'agent causal de nombroses malalties dels vegetals que podrien tenir greus repercussions econòmiques, especialment per a l'economia espanyola, ja que pot afectar a espècies com l'olivera, la vinya, els cítrics, fruiters d'os, ametller i nombroses espècies ornamentals i forestals (Marco-Noales *et al.*, 2017). Concretament l'Agència Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) distribueix en 595 espècies vegetals els hostes de *Xylella fastidiosa*, xifra fins a juny de 2019 (EFSA, 2020).

1.1. Antecedents

La primera vegada que s'observaren símptomes causats per aquest microorganisme va ser l'any 1887 per Newton Barris Pierce, un agent especial del departament d'agricultura dels Estats Units, qui va descriure per primera vegada 'The California vine disease' (Pierce, 1892), per la qual cosa, l'any 1930 la malaltia en vinya associada a la simptomatologia es va denominar malaltia de Pierce (*Pierce's disease* o PD)(Gardner i Hewitt, 1974), encara que en aquell moment no es sabia quin era l'organisme causal. Posteriorment, en la dècada de 1940, es va demostrar la transmissió de la malaltia per vectors (Purcell, 2013; Janse i Obradovic, 2010). Finalment l'agent causal es va aïllar en cultiu *in vitro* l'any 1978 (Davis *et al.*, 1978), encara que no va ser fins 1987 quan es va fer una descripció, classificació i nomenament adequat del bacteri com a la única espècie d'un nou gènere amb el nom de *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). La seva caracterització va culminar amb la seqüenciació del genoma complet d'una soca de cítrics (Almeida *et al.*, 2000), sent el primer bacteri fitopatogen del que s'ha seqüenciat el genoma complet.

A Europa la primera detecció es va obtenir al sud d'Itàlia l'any 2013 on ha arribat a acabar amb hectàrees d'oliveres (Saporani *et al.*, 2013). A Espanya, l'entrada del bacteri era un fet esperat degut a la comercialització de plantes procedents de països que sofreixen la malaltia, ja que, encara que s'agafen i analitzen mostres representatives de lots importants, la sanitat de les plantes no pot estar garantida al 100% (Marco-Noales *et al.*, 2017). Concretament, la primera detecció de *Xylella fastidiosa* a Espanya es va produir a la comunitat autònoma de les Illes Balears l'octubre de 2016, a la localitat de Porto Cristo, Manacor. Posteriorment es van fer noves deteccions tant en la pròpia illa de Mallorca com a les illes d'Eivissa i Menorca (Olmo *et al.*, 2017). A principis d'estiu de 2017 es va detectar a Alacant en plantacions d'ametller. A ambdues comunitats autònomes es va posar en marxa el Pla de Contingència del MAPA i es van realitzar prospeccions i recollides de mostres de plantes hostes potencials en un radi de 100 metres al voltant de les plantes infectades, el que va donar lloc a nous focus i a l'increment de la mida de les zones demarcades en cada cas (Marco-Noales *et al.*, 2017). L'interès científic, tècnic i mediàtic que ha provocat a Espanya el bacteri *Xylella fastidiosa* no és pot comparar a qualsevol altre tema relacionat amb la sanitat vegetal en les darreres dècades (Landa *et al.* 2017).

Aquest bacteri presenta una àmplia distribució per tot el continent americà, on es trobava aïllat geogràficament. A Nord-Amèrica, *X. fastidiosa* s'ha detectat tant a Canadà com a Mèxic (Legendre *et al.*, 2014) i Estats Units. A Amèrica Central i el Carib s'ha detectat a Costa Rica (Nunney *et al.*, 2014). I a Sud-Amèrica, a Argentina, Brasil, Equador, Paraguai i Veneçuela. També s'ha detectat a Iran (Marco-Noales *et al.*, 2017). Dins Europa es troba a Itàlia (detectat l'any

2013), França (2015), Alemanya (2016), Espanya (2016) i Portugal (2019) (Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació, 2019).

1.2. Característiques generals

S'ubica al superregne Bacteri, que pertany a la classe Gamma dels protobacteris, ordre Xanthomonadales i família Xanthomonadaceae. Comparteix gènere amb l'espècie *X. taiwanensis* que es va identificar l'any 1994 a Taiwan afectant principalment a pereres i que va ser considerada inicialment *X. fastidiosa* fins a l'any 2016, quan es va comprovar que presentava característiques genètiques i fisiològiques diferents i, per tant, es va considerar com una nova espècie (Su *et al.*, 2016).

Les cèl·lules de *Xylella fastidiosa* tenen forma de bacils rectes de 0,25-0,35 x 0,9-3,5 µm, que en condicions específiques de cultiu s'uneixen en llargues cadenes filamentoses. Les colònies no presenten pigmentació i són de dos tipus principals: convexes, llises y opalescents amb marges sencers; o rugoses amb marges finament ondulats (Chen *et al.*, 2005). Les cèl·lules són Gram negatives, sense flagels. Posseeixen pili del tipus IV, que permeten el moviment ascendent dins la planta, i pili del tipus I i II, que permeten la formació de biopel·lícules i l'agregació de cèl·lules (Li *et al.*, 2007 i Retchless *et al.*, 2014). La prova de l'oxidasa és negativa i la de la catalasa, positiva. Té metabolisme aeròbic estricte, no fermentatiu, no halòfil, per tant, no suporta la presència de grans quantitats de sals. El seu creixement *in vitro* és difícil, requerint medis específics que continguin glutamina i peptona amb sero-albúmina com a font de carboni. La seva temperatura òptima de creixement *in vitro* es troba entre 26-28°C, aturant-se als 12°C (bacteri mesòfil), i el seu pH òptim està entre 6,5-6,9 (Davis *et al.*, 1978; Saddler i Bradbury, 2015; Wells *et al.*, 1987).

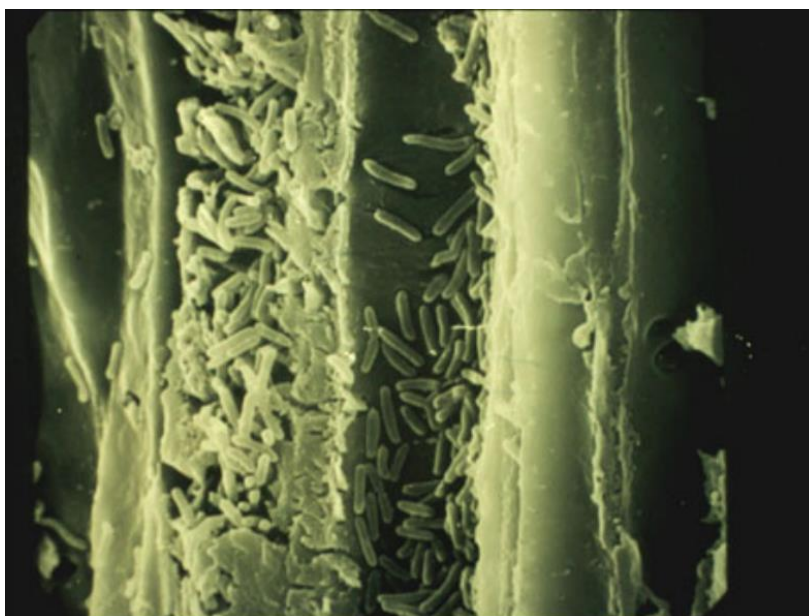


Figura 1. Micrografies electròniques de *Xylella fastidiosa* en vasos xilemàtics de vinya © Dr. Doug Cook, UC Davis

Les soques de *X. fastidiosa* s'agrupen en base als hostes als quals afecten, ja que la majoria dels casos un tipus de soca no causa malaltia a cultius susceptibles a altres tipus de soques (Landa *et al.*, 2017). En l'actualitat s'ha proposat la divisió de *X. fastidiosa* en sis subespècies (Schaad *et*

al., 2004 i Schuenzel *et al.*, 2005) que difereixen en els seus perfils genètics, encara que només les tres primeres han estat descrites seguint la normativa sistemàtica microbiològica:

- *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*: vinya (*Vitis vinifera*), ametller (*Prunus dulcis*), alfals (*Medicago sativa*)...
- *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*: cafè (*Coffea spp.*), taronger (*Citrus sinensis*), olivera (*Olea europaea*)...
- *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex*: *Prunus spp.*, *Quercus spp.*, *Ulmus spp.*, *Rubus spp.*, *Morus spp.*...
- *Xylella fastidiosa* subsp. *sandyi*: baladre (*Nerium oleander*)
- *Xylella fastidiosa* subsp. *tashke*: *Chitalpa tashkentensis*
- *Xylella fastidiosa* subsp. *morus*: morera (*Morus alba*) i *Nandina domestica*.

Pel que fa a la subespècie *tashke*, es va proposar per a incloure els aïllats que provoquen la malaltia a *Chitalpa tashkentensis* a Nou Mèxic (EEUU), però la seva posició genètica encara no està clara (Randall *et al.*, 2011). Més recentment s'ha proposat la subespècie *morus* per a aïllats de moreres de Estats Units (Nunney *et al.*, 2014), que seria fruit de la recombinació d'al·lels entre les subespècies *fastidiosa* i *multiplex*. La introducció del tipat per anàlisi *multilocus* (*multilocus sequence typing*, MLST) descrit per Yuan *et al.* (2010) va revolucionar la taxonomia de *X. fastidiosa*, demostrant que les poblacions naturals de *X. fastidiosa* recombinen amb freqüència (Almeida *et al.*, 2008; Nunney *et al.*, 2012 i 2014), i indicant que el flux genètic via recombinació pot ser un dels motors que ha donat lloc a les noves malalties produïdes pel bacteri (Almeida i Nunney, 2015; Kandel *et al.*, 2017).

Xylella fastidiosa és un bacteri amb un cicle de vida dual, és a dir, passa una part de la seva vida en els insectes vectors que la transmeten i una altra part en la planta que infecta, on poden causar o no la malaltia. El creixement sistèmic en els teixits del xilema de les plantes fa que la utilització de material de plantació per a empeltar, agafat de plantes infectades, sigui una de les vies per les que el bacteri pot ser introduït en una zona lliure d'ell; encara que la transmissió del bacteri d'una planta infectada a una altra sana es produeixi pels insectes xucladors capaços d'arribar al xilema en els teixits infectats i de succionar la saba bruta on es troba el bacteri per a la seva alimentació (Landa *et al.*, 2017).

Els símptomes de la malaltia apareixen algunes setmanes o inclòs mesos després de la inoculació, depenent de l'espècie afectada, i es manifesten molt més clarament durant els mesos d'estiu i tardor, que és quan existeix una major demanda hídrica en la planta (McElrone *et al.*, 2001).

La detecció i la densitat de població de *Xylella fastidiosa* presenta una variació estacional que en gran mesura depenen de la planta hoste i de la zona geogràfica (Hopkins, 1980; Chang i Walker, 1988 i Henneberger *et al.*, 2004). En vinya, a Califòrnia, el bacteri no es detecta fins maig o principis de juny, trobant el màxim nivell en el xilema durant els mesos d'estiu i decreixent de manera gradual fins a principi d'hivern (Hopkins i Thomson, 1984). Factors diferents als climàtics, com la senescència de la fulla, l'hivernació de l'hoste, les variacions en les poblacions dels vectors i la seva eficiència de transmissió, podrien contribuir a aquesta dinàmica estacional (Henneberger *et al.*, 2004). Hopkins *et al.* (1991) suggereixen que en àrees amb el clima moderat,

les temperatures mínimes hivernals no són suficientment baixes com per causar una mort significativa del bacteri.

La capacitat de supervivència de *Xylella fastidiosa* a l'hivern pot variar amb l'estirp, soca o subespècie del bacteri i la interacció amb la planta hoste (Purcell, 1977). D'aquesta manera, infeccions produïdes en ametller durant la primavera amb les soques causants de la malaltia de Pierce, escassament persisteixen a l'any següent (Davis *et al.*, 1980) i, en alguns casos, als dos anys el bacteri ja no pot ser detectat (Purcell, 1977). Els símptomes normalment apareixen abans i són més severes en regions amb els estius càlids, com són les Illes Balears, però que generalment també tenen temperatures hivernals moderades (Hewitt *et al.*, 1949).

Es troba present en una àmplia diversitat de zones climàtiques, encara que particularment predomina als països dels tròpics i subtropicals. Es troba també en àrees de clima Mediterrani, encara que es poden trobar registres de les malalties que provoca a zones amb climes molt més freds (EFSA, 2019).

Feil i Purcell (2001), considerant les temperatures mínimes hivernals, van establir que, a vinya, el bacteri provoca un impacte sever a quan aquestes superen els 4,5°C; danys moderats a temperatures mín. hivernals d'entre 1,7 i 4,5°C, danys ocasionals entre 1,7 i -1,1°C; i rars, quan són inferiors a -1,1°C. Per la qual cosa les regions amb clima tropical, semitropical, temperat i mediterrani moderat, són adequades per al desenvolupament del bacteri (Hoddle, 2004).

1.3. Vectors

El bacteri colonitza dos hàbitats, el xilema de la planta hoste i l'intestí anterior dels insectes xucladors de saba bruta, que són vectors del bacteri (Almeida i Nunney, 2015).

Tots els vectors de *X. fastidiosa* descrits, són hemípters pertanyents al subordre Cicadomorpha, específicament espècies de les superfamílies Cercopoidea, Cicadoidea i Cicadellidae (subfamília Ciadellinae) i de la família Aphrophoridae. Es caracteritzen per tenir una potent musculatura en el cap que els permet succionar el xilema a alts nivells de tensió negativa (Redak *et al.*, 2004), fent possible que el bacteri pugui ser transportat des dels vasos del xilema fins el seu aparell bucal, on aquest s'instal·la i es multiplica.

Cornara *et al.* (2016) varen analitzar la presència de *X. fastidiosa* en cinc possibles vectors a Itàlia: *Philaenus spumaris* (Linnaeus), *Neophilaenus campestris* (Fallén), *Cicada orni* (Linnaeus), *Cercopis sanguinolenta* (Scopoli) i *Euscelis lineolatus* (Brullè), obtenint un únic cas positiu en *N. campestris* i un 50% d'individus de *P. spumaris* infectats. A les Illes Balears, s'han trobat *Philaenus spumarius* i *Neophilaenus campestris* com a les espècies de la família Aphrophoridae més abundants (Miranda *et al.*, 2017), convertint-se en els candidats més importants de la transmissió de *X. fastidiosa* dins les illes.



Figura 2. *Philaenus spumarius* en diferents estadis a Itàlia (A) Massa d'ous, (B) Nimfa i (C) Adult. Vincenzo Cavalieri i Nicola Bodino, IPSP-CNR.

Philaenus spumarius és un hemípter pertanyent a la superfamília Cercopoidea, família Aphrophoridae. És un insecte polífaq àmpliament distribuït a nivell mundial (Drosopoulos i Remane, 2000) que es caracteritza pel seu gran polimorfisme (Steward i Lees, 1996) i per la secreció d'una escuma protectora que envolta l'estat de nimfa (Weaver i King, 1954).

La duració del cicle biològic i el nombre de generacions per any en els Cercopoidea varia amb l'espècie i les condicions climàtiques locals (Valério *et al.*, 2001). En el cas de *P. spumarius*, el cicle biològic és de metamorfosis senzilla, i està format per les fases d'ou, nimfa i adult, donant lloc a una generació per any. Passa l'hivern en forma d'ou, encara que s'ha observat que l'adult pot sobreviure quan les temperatures són suaus (Saporani *et al.*, 2014). Després de 100 dies de diapausa, els ous eclosionen a principi de primavera (West i Lees, 1988), i després les nimfes es desplacen cap als primers brots vegetals, a la recerca d'aliment i protecció, completant el seu desenvolupament en 5-8 setmanes després de passar per cinc estadis. Els primers adults apareixen durant el mes d'abril o maig fins que la vegetació s'asseca o s'elimina. A partir de mitjans del mes d'octubre es detecten els ous a l'abdomen de les femelles, realitzant l'oviposició a partir del mes de desembre fins al mes de març (Durán *et al.*, 2018), depenent de la climatologia (Morente i Fereres, 2017). Realitzen postes damunt les restes de vegetació seca i trossos de soques, normalment propers al sòl. Els ous van units per un ciment escumós en grups de diferent mida (de 1 a 20, amb una mitja de 7), són ovalats, de color groguenc o blanquinós i presenten una taca ataronjada en un dels seus extrems (Morente i Fereres, 2017; Durán *et al.*, 2018). Dins de cada localitat la posta es distribueix durant un mes, adaptant-se a la fenologia dels hostes, fent que es puguin trobar nimfes neonates amb un mes de diferència, encara que no hi ha solapament entre aquestes i els adults. La fase de nimfa neonata té poca mobilitat i no es desplacen de la planta en la que s'ha efectuat la posta, romanent en colònies agrupades baix l'escuma protectora. A partir de la tercera edat, les nimfes tenen capacitat de recórrer curtes distàncies per a dispersar-se a altres hostes pròxims, els hostes secundaris. Aquest grup de

plantes és molt nombrós, podent-se trobar fins a 200 espècies vegetals dicotiledònies. Inclou 12 famílies destacant per la seva abundància les compostes (Asteraceae). En el cas de les nimfes de quinta edat, poden trobar-se ocasionalment en gramínies (Durán *et al.*, 2018).

Els ous de Cercopoidea necessiten una humitat superior al 80% per a poder eclosionar (Weaver i King, 1954), el que limita la seva àrea de dispersió a zones temperades amb elevada humitat (Chmiel i Wilson, 1979; Halkka i Halkka, 1990), encara que la seva distribució és molt ampla, podent-se trobar a diferents latituds i altituds de la regió Holàrtica (Steward i Lees, 1996), per la qual cosa la proximitat de zones humides o fresques, com les bardisses, contribueix a la seva supervivència (Durán *et al.*, 2018).

La presència d'adults és màxima durant els mesos de maig i juny, però deixen de veure's coincidint amb l'agostejament de la vegetació herbàcia de cada localitat. Els adults passen l'estiu sense allunyar-se de les zones on s'han desenvolupat, resguardats durant el dia en la vegetació arbustiva més propera o en refugis, com per exemple, les parets. El dimorfisme sexual d'aquests s'aprecia externament per la presència de l'ovipositor de la femella. Els adults tornen a detectar-se durant el dia quan a la tardor es suavitzen les temperatures i comencen les pluges, coincidint amb la brotada de la vegetació herbàcia que servirà d'hoste de les nimfes neonates. Existeix una altíssima fidelitat per la que els focus es mantenen any rere any (Durán *et al.*, 2018).

La nimfa i l'adult de *P. spumaris* són altament polífags (Ossiannilsson, 1981). S'ha enregistrat un ampli nombre de plantes hoste (DeLong i Severin, 1950; Weaver i King, 1954), encara que majoritàriament es poden trobar sobre plantes fixadores de nitrogen i aquelles amb altes concentracions d'aminoàcids en el xilema (Thompson, 1994).

Aquests vectors presenten una alta taxa d'alimentació i una eficiència alta en l'ús de components del xilema (Andersen *et al.*, 1989), ja que el xilema és un medi pobre en nutrients que està format principalment per aigua, alguns aminoàcids (la majoria no essencials), àcids orgànics i carbohidrats, en baixes concentracions (Andersen i Brodbeck, 1989).

1.4. Transmissió de *Xylella fastidiosa*

La transmissió del bacteri a plantes no infectades es produeix de la següent manera segons Chatterjee *et al.* (2008): primer es necessari que es produeixi l'adquisició del bacteri des de la planta font; quan el vector s'alimenta de la planta font, s'ancora i es retén el bacteri a la cutícula del cibari (part anterior de la cavitat preoral) del vector; i, finalment, es desprèn el bacteri i s'inocula un nou hoste quan el vector va a alimentar-se d'una planta sana.

La infecció és persistent en adults (Severin, 1949) i no existeix transmissió transovàrica (Freitag, 1951) o entre estadis, ja que la nimfa, a l'hora de mudar, perd la cutícula i amb ella els bacteris adherits a ella (Purcell i Finlay, 1979). Presenta un curt període de latència abans de la transmissió, per tant, el vector es infectiu pràcticament en el mateix moment que adquireix el bacteri. D'aquesta manera, la transmissió és no circulativa, el bacteri la retén a la cutícula sense passar a l'hemolimfa de l'insecte abans de ser transmesa (Purcell i Finlay, 1979).

L'efectivitat en la transmissió del patogen augmenta proporcionalment amb el temps d'adquisició al que es troba exposat el vector (Purcell i Finlay, 1979). L'alta dilució dels nutrients en el xilema fa que els hemípters tinguin que succonar grans quantitats de saba per completar

els seus requeriments nutricionals (Horsfield, 1977), augmentant el temps que es troben en contacte amb el xilema de la planta (Mittler, 1967).

Des del moment de la seva adquisició, *X. fastidiosa* colonitza paulatinament la cutícula del precinari i la bomba cibarial formant biopel·lícules (Purcell *et al.*, 1979), on el bacteri és retinut i expulsat a la planta durant l'alimentació del vector (Purcell, 1989). Al llarg dels primers dies després de l'adquisició de *X. fastidiosa*, la baixa concentració bacteriana que es troba a l'aparell bucal del vector fa que el bacteri sigui indetectable, encara que el vector ja sigui infectiu (Purcell *et al.*, 1979). A majors densitats de poblacions del bacteri, major eficiència d'adquisició, ja que augmenten les possibilitats de que el vector es trobi amb el patogen (Hill i Purcell, 1997; Almeida, 2016). Aquesta eficiència també es veu influenciada per les preferències alimentàries i per la distribució heterogènica del bacteri dins els vegetals, fent que el bacteri no es trobi distribuït de manera uniforme dins la planta (Daugherty *et al.*, 2010).

De la mateixa manera que l'adquisició, la inoculació es fa més efectiva amb l'augment del temps que el vector es troba en contacte amb el xilema de la planta (Almeida i Purcell, 2003). Moltes de les cèl·lules que s'inoculen moren, per tant, un major temps d'inoculació afavorirà a un major assentament dels bacteris en la planta (Almeida *et al.*, 2005). La concentració del bacteri en el vector no està relacionada amb l'eficiència en la transmissió (Hill i Purcell, 1995), per tant, només és important el nombre d'inoculacions en una planta (Almeida, 2016); ja que les biopel·lícules que forma *X. fastidiosa* creixen lentament colonitzant la xarxa de vasos del xilema des del punt d'entrada, per tant, un major nombre d'inoculacions, facilita la colonització del xilema de la planta en diferents zones, accelerant l'aparició de símptomes (Costa *et al.*, 2000). Així mateix, també és molt important l'estat fenològic de la planta en el moment de la inoculació del bacteri (Almeida *et al.*, 2005).

1.5. *Xylella fastidiosa* a les Illes Balears

Com s'ha comentat anteriorment, Mallorca va ser l'illa on es va produir la primera detecció de *Xylella fastidiosa* subs. *fastidiosa* a Espanya, a Porto Cristo (Manacor) el 16 d'octubre de 2016, concretament a l'espècie *Prunus avium* (cirerer) (Olmo *et al.*, 2017).

A la darrera actualització de les dades del Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació del 4 de març de 2020, es varen confirmar un total de 1027 mostres positives al bacteri *Xylella fastidiosa* a les Illes Balears (Taula 1), resultants de les analítiques del Laboratori Oficial de Sanitat Vegetal de les Illes Balears (LOSVIB) i confirmats parcialment pel Laboratori Nacional de Referència (LNR) de Bacteris Fitopatògens (IVIA, València). S'han detectat un total de 24 espècies hostes afectades per aquest bacteri (Taula 1): *Acacia saligna*, *Calicotome spinosa*, *Clematis cirrhosa*, *Cistus albidus*, *Cistus monspeliensis*, *Ficus carica*, *Fraxinus angustifolia*, *Genista lucida*, *Juglans regia*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula dentata*, *Nerium oleander*, *Olea europaea* var. *europaea*, *Olea europaea* var. *sylvestris*, *Phagnalon saxatile*, *Phillyrea angustifolia*, *Polygala myrtifolia*, *Prunus avium*, *Prunus domestica*, *Prunus dulcis*, *Rhamnus alaternus*, *Rosmarinus officinalis*, *Teucrium capitatum* i *Vitis vinifera* (Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació, 2020, dades no publicades).

Taula 1. Mostres analitzades, nombre de positius i percentatges dels positius a *Xylella fastidiosa*, obtinguts a les Illes Balears entre octubre de 2016 i 9 de novembre de 2018. Font: Juan, 2018

Espècie vegetal	Nº mostres analitzades	Nº positius	% Positius
	6.749	820	12,15
<i>Acacia saligna</i>	33	3	9,09
<i>Calicotome spinosa</i>	14	1	7,14
<i>Cistus albidus</i>	50	2	4,00
<i>Cistus monspeliensis</i>	59	1	1,69
<i>Ficus carica</i>	283	21	7,42
<i>Fraxinus angustifolia</i>	16	4	25,00
<i>Genista lucida</i>	4	1	25,00
<i>Juglans regia</i>	7	1	14,29
<i>Lavandula angustifolia</i>	14	1	7,14
<i>Lavandula dentata</i>	71	6	8,45
<i>Nerium oleander</i>	298	6	2,01
<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>	1.077	145	13,46
<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	1.434	324	22,59
<i>Polygala myrtifolia</i>	155	21	13,55
<i>Prunus avium</i>	27	3	11,11
<i>Prunus domestica</i>	19	1	5,26
<i>Prunus dulcis</i>	705	194	27,52
<i>Rhamnus alaternus</i>	72	6	8,33
<i>Rosmarinus officinalis</i>	299	14	4,68
<i>Teucrium capitatum</i>	4	1	25,00
<i>Vitis vinifera</i>	510	64	12,55

La distribució d'aquestes mostres positives pràcticament ocupa la totalitat de les tres illes si incloem un radi de 10 Km a cada positiu, com es pot veure a la Figura 3, podem dir que *Xylella fastidiosa* es troba àmpliament distribuïda a les illes de Mallorca, Menorca i Eivissa, quasi en la seva totalitat.

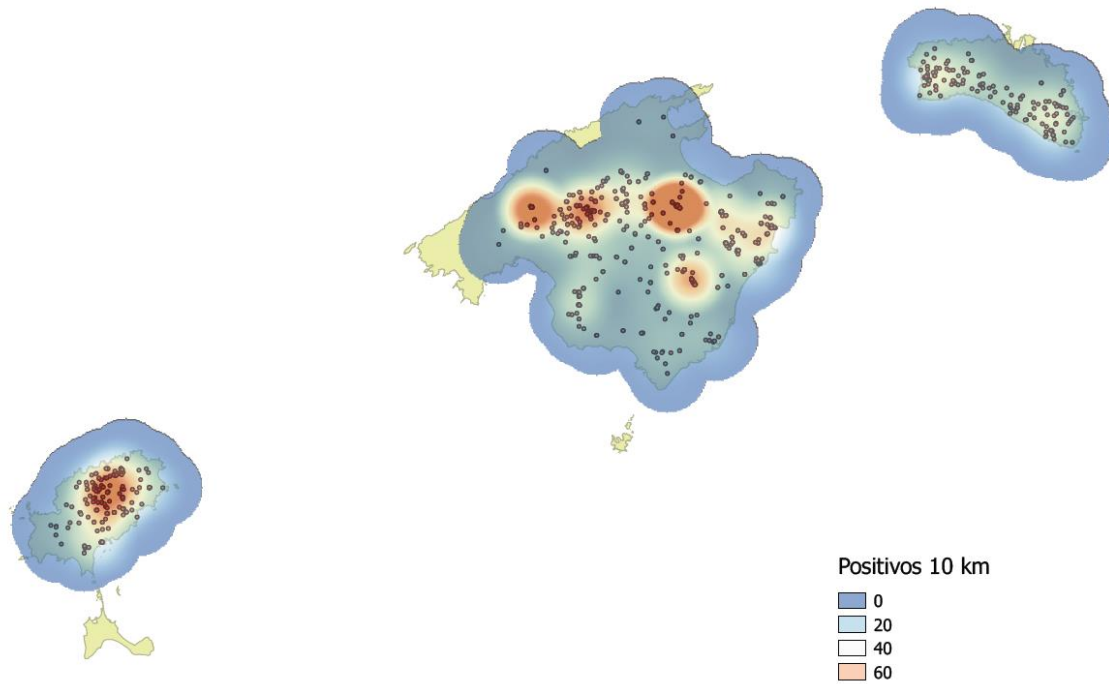


Figura 3. Distribució de les mostres positives a *Xylella fastidiosa* i la seva densitat en radis de 10 Km a les Illes Balears. Font: Juan, 2018

Les determinacions de les subespècies i els genotips de *Xylella fastidiosa* s'han realitzat en el Laboratori de Biologia i Ecologia Microbiana del Sòl del IAS-CSIC, determinant mitjançant seqüenciacions del gen del factor $\sigma 70$ de l'ARN polimerasa i la tècnica de tipificació multilocus de seqüències (MLST). Els resultats estan mostrant una gran diversitat genotípica, trobant-se a Balears 3 subespècies de *X. fastidiosa* i 4 genotips diferents (ST), dos d'ells no descrits fins ara (Juan, 2018).

Taula 2. Subespècies i tipus genètics (STs) de *Xylella fastidiosa* de les mostres de les Illes Balears segons illa i planta hoste. Font: Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació, 2020, dades no publicades)

Illas	Planta hoste	Subespècie i ST
Mallorca	<i>Acacia sp.</i> <i>Ficus carica</i> <i>Fraxinus angustifolia</i> <i>Lavandula dentata</i> <i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i> <i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> <i>Polygala myrtifolia</i> <i>Prunus domestica</i> <i>Prunus dulcis</i> <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>Cistus albidus</i>	<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i> ST81
Mallorca	<i>Polygala myrtifolia</i> <i>Prunus dulcis</i>	<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i> ST 7
Mallorca	<i>Calicotome spinosa</i> <i>Cistus mospeliensis</i> <i>Genista lucida</i> <i>Polygala myrtifolia</i> <i>Prunus avium</i> <i>Prunus dulcis</i> <i>Rhamnus alaternus</i> <i>Vitis vinifera</i> <i>Juglans regia</i> <i>Teucrium capitatum</i>	<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i> ST 1
Mallorca	<i>Nerium oleander</i> <i>Lavandula angustifolia</i>	Per determinar
Menorca	<i>Ficus carica</i> <i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i> <i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> <i>Prunus dulcis</i> <i>Polygala myrtifolia</i> <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>Rhamnus alaternus</i> <i>Clematis cirrhosa</i>	<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>multiplex</i> ST81
Eivissa	<i>Acacia sp.</i> <i>Cistus albidus</i> <i>Lavandula dentata</i> <i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i> <i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> <i>Polygala myrtifolia</i> <i>Prunus dulcis</i> <i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> ST 80
Eivissa	<i>Nerium oleander</i>	Per determinar

1.5.1. Afecció del bacteri al cultiu de l'ametller (*Prunus dulcis*) a Mallorca

L'ametller es veu afectat per tres subespècies: *fastidiosa*, *multiplex* i *pauca* (Moller *et al.*, 1974; Mircetich *et al.*, 1976; Saponari *et al.*, 2013; Elbeaino *et al.*, 2014), provocant la cremada de la fulla, el que es coneix com ALSD (*Almond Leaf Scorch Disease*). Aquesta malaltia, va adquirir importància a la dècada dels 90 a Estats Units, on actualment conviu amb el bacteri, realitzant podes, eliminant les males herbes i arrabassant els arbres en funció a la vida útil restant, arribant a ser d'uns 20-25 anys com a màxim. A Mallorca podem trobar *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ST1 i *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* ST81, que afecten a nombrosos camps d'ametller provocant grans danys.

En base als estudis realitzats en els bancs de germoplasma de Mallorca de la Conselleria de Medi Ambient, Agricultura i Pesca del Govern de les Illes Balears s'han classificat les diferents varietats d'ametller segons la susceptibilitat a la malaltia (Taula 3 i 4), establint com a no afectades aquelles amb resultat d'anàlisi negatiu al laboratori per tècnica PCR (*Polimerase Chain Reaction*); les poc afectades amb resultats de PCR positives i poca simptomatologia; i les molt afectades amb PCR positives, presentant molta simptomatologia (Juan, 2018).

Taula 3. Classificació de les varietats foranies més utilitzades a Mallorca segons l'afecció en camp de *Xylella fastidiosa*. Font: Juan, 2018

Varietats foranies		
No afectades	Poc afectades	Molt afectades
Antoñeta	Belona	Garrigues
Soleta	Blanquerna	Marcona
Constantí	Glorieta	
Cristomorto	Marta	
Moncayo	Masbovera	
Penta	Mardía	
Lauranne	Guara	
Ferragnes	Desmayo largueta	
Ferraduel		
GF-677		
Marinada		
Tarraco		
Vayro		

Taula 4. Classificació de les varietats autòctones de Mallorca segons l'afecció en camp de *Xylella fastidiosa*. Font: Juan, 2018

Varietats autòctones				
No afectades	Poc afectades		Molt afectades	
Beyrita	Binissalem	Vera	Andreu	Maxina
Bord penyat	Bolic	Vivero	Alzina	Mollar
Cabana	Canaleta		Agrina	Morro de vaca
Cantaros	Ceba		Bertina	Pere Gelabert
Capirons	Den Ribes		Bord Santa Maria	Pintadeta
Costa	Den Rotger		Bord de Selva	Pou Felanitx
Des meus	De l'engany		Bord des Raiguer	Pou
Eivissenc	De la trapa		Bord Pep Jeroni	d'Establiments
Fita	Duran		Bord den Cabet	Pou Gaspar
Horrach	Duranet		Caragola	Poteta
Mare de Deu	Feliu		Clot de sa mata	Primerenca
Pere Xina	Fita Mollar		Corona	Rutlo
Verd	Guarin		Corona de rei	Taitona
	Jordi		De la vara	Torres
	Nostro		Desmai Victòria	Totsol
	Pons		Dueta	Trinxets
	Sicilia		Fenereta	Verdereta
			Filau	Victòria
			Lluca	Vinagrillo
			Menut	Viveta
				Vivot

Aquests resultats es poden veure influenciats per una sèrie de factors que afecten a la resposta de l'ametller a la malaltia (Juan, 2018):

- Edat de la planta: major incidència en plantacions de més de 20 anys.
- Règim hídric: major afecció en plantacions en secà que en reguiu.
- Varietat: major incidència en varietats autòctones que en foranies.
- Maneig del sòl: les plantacions d'ametller associades amb el cultiu de cereal o farratge, així com les que presenten abundant vegetació adventícia, mostren una major incidència, probablement degut a que actuen de reservori del vector transmissor.
- Estat de la plantació: major incidència en plantacions abandonades, sense manteniment, sense la realització d'accions com la poda, el llaurat, la fertilització, els tractaments fitosanitaris...

Pel que fa els símptomes en ametllers, la majoria presenten símptomes de clorosi i assecament dels extrems apicals i els marges de les fulles, podent corbar-les, i evolucionant cap a una seca generalitzada del fullatge de la copa (Olmo *et al.*, 2017).



Figura 4. Síntomes de *Xylella fastidiosa* en les fulles d'ametller. Font: Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimetació, CAIB

Aquesta malaltia té un gran impacte a les nostres illes ja que Balears ocupa la segona posició en quant a superfície relativa d'ametller dins Espanya, és a dir, la superfície de plantació en relació a la superfície total del territori. Ha provocat la mort de moltes plantacions, sobretot aquelles abandonades o sense maneig del sòl, i l'eliminació de moltes altres com a conseqüència de les baixes produccions.

1.5.2. Afecció del bacteri a vinya (*Vitis vinifera*) a Mallorca

En els camps de vinya comercial de Mallorca s'ha observat que la incidència de la malaltia de Pierce, causada per *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* ST1, depèn de varis factors (Juan, 2018):

- a) Varietat: algunes varietats tenen un comportament més sensible a la malaltia que altres.
- b) Maneig del sòl: la presència de cobertes vegetals mal gestionades en primavera augmenta les possibilitats d'afecció del bacteri com a conseqüència de les altes poblacions de vectors.
- c) Presència d'inòcul en l'ambient: major incidència en les vinyes si es troben properes a plantacions d'ametllers molt afectades.
- d) Pràctica de l'empelt: les varietats autòctones i foranies de vinya, s'han propagat mitjançant empelt, sense fer una selecció sanitària dels ceps.

Els símptomes que provoca *X. fastidiosa* no són específics, ja que són conseqüència del col·lapse dels vasos conductors que, al obstruir-se, no permeten l'adequada circulació de la saba, provocant la necrosi de les fulles i l'assecament dels sarments (Salazar i López-Cortés, 2018). Els típics símptomes en vinya són les "illes verdes" (àrees d'epidermis verdes en una tija marró), necrosi de la fulla en pegats o necrosi marginal y "llumins" (*matchsticks*), que són els peciols

que romanen adherits a la tija després de que les fulles es caiguin (Purcell 1986, Goheen i Hopkins 1988, Stevenson et al. 2005). També són símptomes la seca de raïms i les clorosis i necrosis marginals de les fulles, amb halos grocs en varietats blanques i vermells en varietats negres (Olmo *et al.*, 2017) podent provocar fulles corbes cap al revés (Salazar i López-Cortés, 2018), manifestant símptomes diferents depenent de la varietat. Els raïms són més curts, perdent tant flors com baies durant el verolat. Molts dels raïms es mustien de forma parcial o completa. Augmenta l'acidesa a les baies, tinent una maduració incompleta i una polpa més endurida. En atacs precoços, els raïms es deshidraten i, en atacs més avançats, les baies s'arruguen, es deshidraten i acaben caient. Les soques es mostren més sensibles a la sequera, comencen manifestant depressió vegetativa i acaben morint en 3-4 anys, depenent de la sensibilitat del cultivar, ja que endarrereixen la brotada i fa que les reserves acumulades siguin molt baixes (Salazar i López-Cortés, 2018).

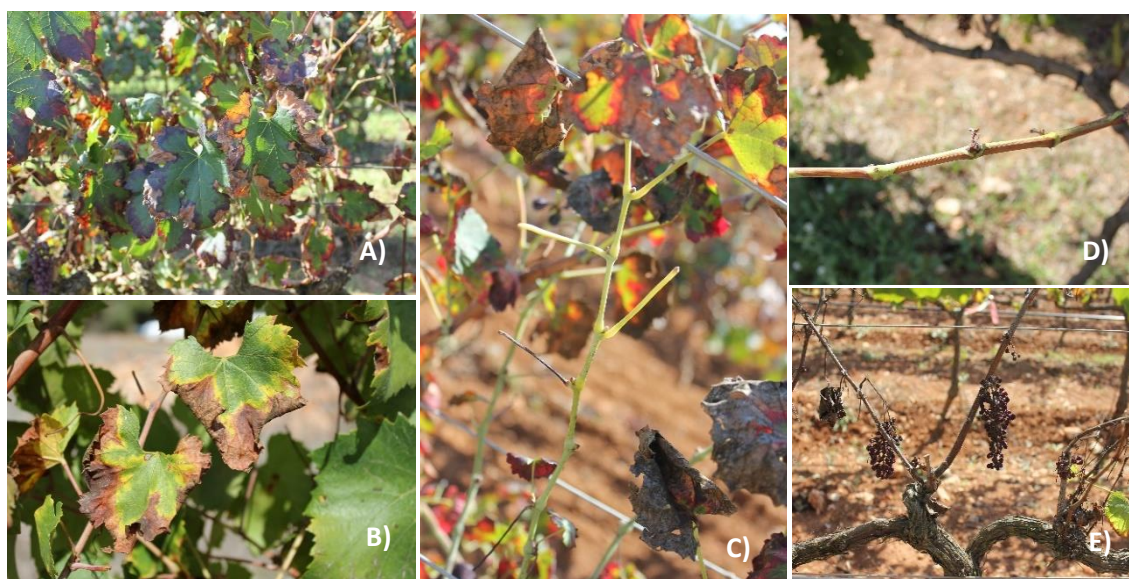


Figura 5. Símptomes en vinyes amb Pierce's Disease a Mallorca: A) símptomes en fulles, varietat negra, 'Merlot', B) símptomes en fulles, varietat blanca, 'Chardonnay', C) 'matchsticks', D) 'Green islands', E) Dessecació del raïm. Font: Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació, CAIB.

Dins Espanya, el cultiu de raïm a Balears no té importància ni a nivell de superfície ni a nivell de producció, però sí té la seva importància històrica i cultural dins el nostre territori.

1.6. Mètodes de detecció del bacteri

S'han descrit diversos protocols de PCR, a temps final i a temps real per a la detecció de *Xylella fastidiosa*. Actualment la PCR a temps real constitueix la tècnica de major sensibilitat disponible i que es pot utilitzar tant en mostres vegetals com en els vectors (López *et al.*, 2017).

Les dues PCR en temps real que s'utilitzen en els països de la UE, seguint el protocol de la EPPO (EPPO, 2019), són les descrites per Francis *et al.* (2006) i Harper *et al.* (2010; erratum 2013). La PCR de Francis *et al.* (2006) té com a seqüència diana un gen d'una proteïna hipotètica conservada, HL, i la mida de l'ampliació és de 221 parells de bases. En canvi, en la PCR de Harper *et al.* (2010; erratum 2013) la seqüència diana es troba localitzada en el gen que codifica la proteïna rimM de processament del ARN ribosòmic 16S, fent que la seva sensibilitat sigui major,

podent així detectar quantitats baixes de bacteris que no es poden detectar amb la PCR de Francis *et al.* (2006).

També s'han desenvolupat mètodes serològics per a detectar aquest bacteri. Es poden utilitzar al menys dos kits per a ELISA (Sherald i Lei, 1991), que s'han validat per a la seva utilització en olivera, baladre, ametller, cítrics, roure, vinya i altres espècies vegetals (Loconsole *et al.*, 2014). També s'ha desenvolupat una tècnica de immunofluorescència amb fixació en membrana (MEIF, *membrane entrapment immunofluorescence*)(Hartung *et al.*, 1994), que es basa en la retenció dels bacteris en membranes negres de policarbonat de 0,2 µm mitjançant la filtració seqüencial de l'extracte vegetal i la posterior tinció amb sèrums específics. La sensibilitat d'aquestes tècniques és menor que la de les tècniques moleculars, però poden ser molt útils en zones on ja es troba present la malaltia, ja que permeten processar un gran nombre de mostres amb rapidesa i a un cost inferior al de les tècniques moleculars (López *et al.*, 2017).

L'aïllament del bacteri és difícil, ja que requereix la utilització de medis de cultiu específics (EPPO, 2019) com el PD2 (Davis *et al.*, 1980), BCYE (Wells *et al.*, 1981) i PWG (modificat de Hill i Purcell, 1995), i es recomana utilitzar al menys dos dels medis per a augmentar les possibilitats d'èxit (EPPO, 2019). El creixement del bacteri és molt lent, per la qual cosa és necessari desinfectar superficialment el material vegetal utilitzat per tal d'evitar el creixement d'organismes sapròfits, de creixement més ràpid, que emmascaren el creixement de *Xylella fastidiosa* (López *et al.*, 2017).

S'han dissenyat algunes estratègies amb la finalitat d'augmentar les probabilitats d'aconseguir l'aïllament del bacteri, com per exemple, la utilització d'ultrasons que disgreguen les estructures de biopel·lícula que forma el bacteri en els vasos del xilema. En el cas de mostres de vegetals llenyosos, s'ha utilitzat la impressió directa de seccions de tronc posterior a una lleugera pressió per a facilitar la sortida del líquid xilemàtic (López *et al.*, 2017).

El mètode més utilitzat per a poder determinar la subespècie de *Xylella fastidiosa* és l'anàlisi MLST basat en l'amplificació i seqüenciació en ambdues direccions de set gens de manteniment (Yuan *et al.*, 2010). Aquests 7 gens codifiquen per a:

- 2-isopropilmalat sintetasa (*leuA*), amb una mida del producte amplificat de 708 parell de bases (pb).
- Subunitat C1 de la ubiquinol citocrom c oxidoreductasa C1 (*petC*); 533 pb.
- ABC permeasa transportadora de sucres (*malF*); 730 pb.
- Sintasa del gen sirohem (*cysG*); 600 pb (excepcions amb 594 pb).
- Subunitat chi del holoenzim DNA polimerasa III (*hoIc*); 379 pb.
- Subunitat NQO12 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (*nuoL*); 557 pb (excepcions amb 527 pb).
- Proteïna simportadora del glutamat (*gltT*); 654 pb.

Una vegada obtingudes les seqüències en ambdues direccions, aquestes han d'alinejar-se i acoblar-se eliminant les seqüències dels iniciadors, posteriorment les seqüències es comparen mitjançant l'eina d'alienació i recerca BLASTN. A cada seqüència se li assigna un nombre i la combinació d'aquests és la que indica la subespècie i el grup genètic, permetent identificar la presència de recombinacions genètiques (Coletta-Filho *et al.*, 2017). Per a concretar les relacions

filogenètiques entre soques o el seu posicionament de manera més precisa, es procedeix a la concatenació dels set gens i el seu anàlisi filogenètic (MLSA, *Multilocus Sequence Alignment*).

La determinació de les subespècies també es pot realitzar en alguns casos mitjançant marcadors molecular que són específics de cada subespècie. Com per exemple en la PCR de Pooler i Hartung (1995) l'amplificació d'un fragment de 500 pb indica la presència de la subespècie *pauca*, existint altres protocols de PCR en temps real que permeten fer-ho (Li *et al.*, 2013).

2. OBJECTIUS

Tenint en compte la problemàtica actual que provoca *Xylella fastidiosa*, en l'assaig es pretén:

- Obtenir aïllaments *in vitro* de distintes soques de *Xylella fastidiosa* de tot el territori de les Illes Balears.
- Identificar les diferents respostes de tolerància/susceptibilitat varietal a *Xylella fastidiosa* en els cultius de vinya i ametller, mitjançant tant inoculacions en hivernacle de bioseguritat com observacions en camp de les infeccions naturals de camps de vinya.
- Avaluat el possible efecte del portaempelt com a 'transmissor' de la resistència/tolerància en ametller i en vinya.
- Comprovar si la realització d'empelt amb material infectat pot transmetre el bacteri *Xylella fastidiosa* en ametller.

3. MATERIAL I MÈTODES

Els estudis que requerien inoculacions amb el bacteri es varen realitzar en un hivernacle de bioseguretat (Figura 6) instal·lat el mes de febrer de 2018 expressament per aquests treballs al recinte de la Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació del Govern Balear, a Palma.

Durant les darreres setmanes de l'hivern i les primeres de la primavera del mateix any es va procedir a la recepció i col·locació del material vegetal necessari per a desenvolupar els assajos, la instal·lació del reg i l'aplicació de productes fitosanitaris per minimitzar interferències amb altres plagues i malalties.



Figura 6. Hivernacle de bioseguretat utilitzat en l'assaig, a les instal·lacions de la Conselleria.

3.1. Aïllaments

Els aïllats del bacteri són necessaris per a tenir cultius vius en condicions de laboratori i poder inocular les plantes. A partir de l'any 2017 s'ha cultivat *in vitro* el bacteri a partir de diferents espècies vegetals prèviament analitzades amb resultat positiu per a la presència de *X. fastidiosa* per PCR. En aquest assaig, s'ha volgut obtenir una gran quantitat d'aïllaments, repartits per la superfície de les illes per a poder fer un estudi genètic posterior i per a poder utilitzar-los en futurs assajos. Per a obtenir aïllats de les mostres positives de camp, es seleccionaren fulles simptomàtiques, incloent alguna asimptomàtica, fins obtenir un total de 0,5 – 1 g de pecíol amb nervi central (EPPO, 2019). Per exemple, en ametllers, es van utilitzar unes 15 fulles, en ullastre unes 20 i, en vinya, només 2. Una vegada seleccionades les fulles, es desinfectaren superficialment amb aigua i sabó (Figura 7), eliminant els restes de sabó que poden quedar en les fulles i es van deixar assecar damunt paper de filtre. Una cop seques, es tallaren els pecíols i el nervi central fins a la meitat de la fulla (en vinya i figuera només s'utilitzaren els pecíols).

Dins la campanya de flux laminar de seguretat biològica de tipus II, es va continuar amb la desinfecció. Primer es passaren les fibres per una solució de lleixiu al 2% durant 2 minuts. Posteriorment per alcohol 70° durant 2 minuts més i, a continuació es realitzaren tres rentades

amb aigua destil·lada estèril. Un cop desinfectat el material vegetal, es va deixar assecar a sobre d'un paper de filtre estèril dins una placa de petri (EPPO, 2019).

En el cas de l'olivera o de l'ullastre, l'extracte es fa també a partir de la fusta, llevant l'escorça (collint la part del sistema vascular) de la mostra (Aldrich *et al.*, 1992).

Per a preparar l'extracte (Figura 8), un cop el material estava sec, es va introduir el material vegetal dins bosses amb malla per a la preparació de extractes (Bioreba, AG, Suïssa) amb 5 mL de PBS i es va triturar amb ajuda d'un homogeneïtzador Homex6® (Bioreba, AG, Suïssa) i un morter de ceràmica. Una vegada obtingut l'extracte, es van sembrar en plaques, preferiblement amb medi PWG (també BCYE), transferint 3 gotes (en triangle) de 10 µL per cada una de les plaques utilitzades, i estenent les gotes per tota

la placa amb una nansa de Driglasky. Una vegada sembrades, es segellaren amb Parafilm® (Bemis-Amcors, Zürich, Suïssa) i s'incubaren a 28°C dins càmera. Es sembraren les plaques amb la concentració mare del extracte i amb la dilució 1/10 d'aquesta, i es deixaren aproximadament un màxim de 28 dies dins càmera de cultiu a 28°C (EPPO, 2019). Normalment començaren a créixer als 10 dies (Chen *et al.*, 2005).

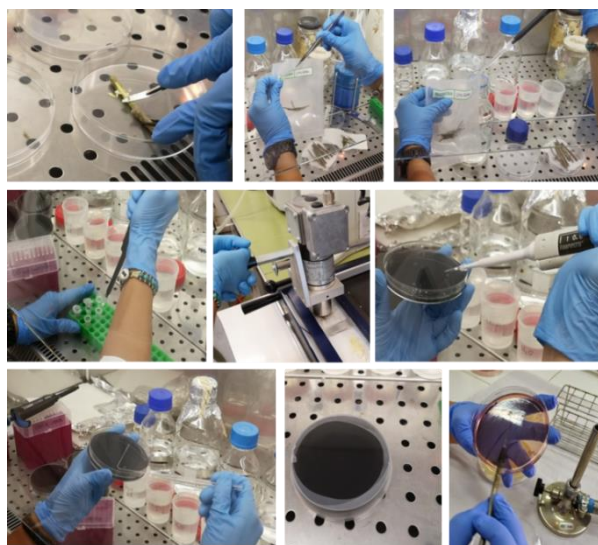


Figura 8. Preparació de l'extracte i de les plaques de BCYE per a aïllar *Xylella fastidiosa*.

total de 3 resembres abans de la seva conservació a -80°C amb medi PWG líquid i glicerol al 30%

3.2. Inoculacions

Per a realitzar les inoculacions amb *Xylella fastidiosa* subs. *fastidiosa* es va utilitzar el material vegetal d'ametller (*Prunus dulcis*) i vinya (*Vitis vinifera*) que es descriu a les taules que es troben a continuació (Taula 5 i 6). Com s'aprecia a les taules, en ambdós casos algunes de les varietats es combinaren amb diferents patrons o portaempelts. Concretament en el cas de la vinya es va

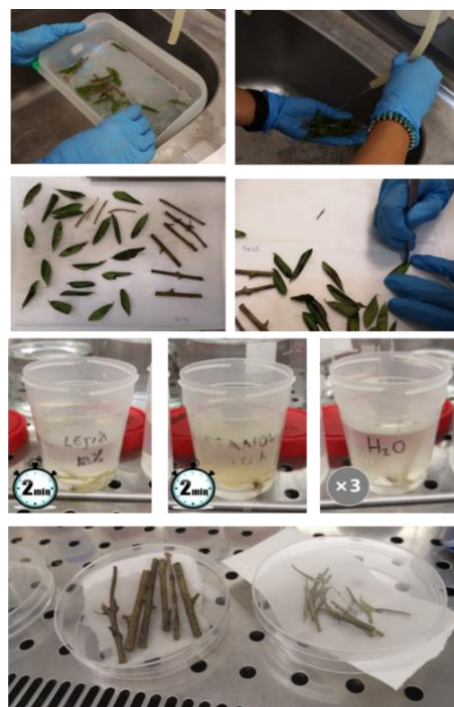


Figura 7. Preparació de la mostra vegetal per a aïllar el bacteri

disposar de 340 plantes amb 30 combinacions diferents de 19 varietats combinades amb 6 portaempelts. Per la seva part, en ametller el total de plantes va ser de 240 en 20 combinacions diferents de 10 varietats i 5 peus.

Taula 5. Varietats de vinya i combinacions varietat-peu utilitzades a l'assaig

Varietat	Portaempelt
Gorgollassa	R-110
Mandó	R-110
Prensal	161/49 R-110
Argamussa	R-110
Giró ros	161/49 R-110
Manto negro	R-110
Callet	R-110
Vinater Blanc	R-110
Mancés	R-110
Giró Negre	R-110
Esperó de Gall	R-110
Cabernet	R-110
Chardonnay	R-110
	P-1103
Viura	R-140 SO-4
Merlot	R-110
Sauvignon Blanc	R-110 SO-4
	R-110
Syrah	41-B R-140
	R-110
Tempranillo	41-B P-1103 R-140 SO-4
Viognier	R-110

Taula 6. Varietats + peu d'ametller utilitzar a l'assaig

Varietat	Portaempelt
Marta	GF 677
Vairo	GF 677
Marinada	GF 677
	G x N
Soleta	GF 677
	G x N
	RP-20
Belona	GF 677
	G x N
Avijor	GF 677
	G x N
	RP-20
	RP-40
Vialfas	RP-20
	R-R
Isabelona	RP-20
Penta	GF677
	RP-20
	G x N
Guara	RP-20

Abans de realitzar les inoculacions, de cada una de les plantes, es van collir entre 2 i 10 fulles i es van analitzar en el laboratori mitjançant PCR per a descartar possibles infeccions pel bacteri anteriors a la recepció del material vegetal. Per a realitzar les inoculacions, es va utilitzar l'aïllat XYL 2055/17 pertanyent al ST1 de la subsp. *fastidiosa* (Gomila *et al.*, 2019) obtingut a l'any 2017 a partir d'una parra de *Vitis vinifera* de la varietat 'Parellada' de Manacor.

En ambdues espècies vegetals, per cada combinació varietat+patró es van inocular 12 exemplars: 8 amb el bacteri i 4 només amb PBS (controls).

A finals del mes de maig es van realitzar les inoculacions a vinya, les d'ametller es van realitzar en dues tandes, una també a finals del mes de maig i una altra a mitjans del mes de juny (Figura 9).

L'inòcul va consistir en una suspensió de cèl·lules bacterianes a partir de colònies de *Xylella fastidiosa* crescudes durant 10 dies en medi BCYE, fins a aconseguir una solució saturada amb una concentració aproximada de 10^8 - 10^9 bacteris per mL de PBS. Es va col·locar una gota de 10 µL de la suspensió del bacteri i un cop en contacte amb la planta, amb ajuda d'una agulla es van realitzar 5 incisions, travessant la gota, assegurant-se la perforació fins el sistema vascular de la planta i afavorint així la penetració dels bacteris (Hill i Purcell, 1995; Almeida *et al.*, 2001; Francis, *et al.*, 2008; Saponari, *et al.*, 2016; Sanderlin, 2017). Totes les inoculacions es van realitzar per

duplicat amb una diferència aproximada de 15 dies (Wallis i Chen, 2012), per així assegurar la infecció de la planta, ja que, com diu Almeida (2016) i López *et al.* (2017), és més important el nombre d'inoculacions que la concentració de bacteri. La segona inoculació es va fer 2 cm per davall del primer punt d'inoculació, la majoria, directament a la tija.

Durant tot l'assaig s'han realitzat seguiments visuals de totes les plantes inoculades. Cada 2 setmanes, a partir de la setmana 8 fins a la setmana 16, es va dur a terme un seguiment de la simptomatologia la vinya, comptant el nombre de fulles amb símptomes i assignant un grau de severitat depenent del nombre de fulles afectades, sent 0 sense fulles simptomàtiques, 1 el menor grau amb 1 o 2 fulles i 5 amb més de 10 fulles amb símptomes (Taula 7). D'aquesta manera, es va poder aplicar la fórmula de Su *et al.* (2013), on n_x és el nombre de plantes amb grau X de simptomatologia i, N és el nombre total de plantes:

$$\frac{(5 \cdot n_5 + 4 \cdot n_4 + 3 \cdot n_3 + 2 \cdot n_2 + 1 \cdot n_1 + 0 \cdot n_0)}{N}$$



Figura 9. Procés d'inoculació. Esquerra: col·locació de la gota en ametller. Dreta: Incisions amb agulla en vinya.

Taula 7. Grau de severitat de Pierce's disease segons el nombre de fulles afectades en hivernacle.

Nº	Grau de Severitat
0	0
1-2	1
3-4	2
5-7	3
8-10	4
+10	5

Durant la setmana 12 després de la inoculació es va comprovar la presència de *Xylella fastidiosa*. Per tal de fer-ho es van mostrejar fulles de les plantes de vinya, tant de les inoculades com de les controls no inoculats, collint la fulla número 2 i la fulla número 5 des del punt de la inoculació, podent, d'aquesta manera, observar el moviment del bacteri dins la planta.

A més de l'experiment en condicions d'hivernacle, es van recollir dades en camp dels símptomes de altres varietats de vinya (algunes coincidint amb les estudiades dins l'hivernacle) en diferents parcel·les de Mallorca infectades de manera natural. En aquestes condicions, es va establir un distint grau de severitat de la malaltia (Taula 8) depenent del nombre de fulles amb necrosis marginals, el nombre de sarments afectats, la formació de 'matchsticks', el dessecament de pàmpols... Un petit percentatge d'aquestes plantes observades (10%) es van enviar al laboratori (LOSVIB) per tal d'assegurar-nos de que els símptomes corresponien amb la infecció per *Xylella fastidiosa*.

Taula 8. Graus de severitat de Pierce's disease en camp

Grau	Símptomes
0	Sense símptomes
1	Fulles amb símptomes
2	'Matchsticks'
3	Illes verdes
4	Dessecació del raïm

Per a fer-ho es van realitzar recomptes de 7 punts de manera atzarosa dins la parcel·la per cada una de les varietats, observant els símptomes en 20 plantes de cada un d'aquests 7 blocs, i establint una mitjana del grau d'afecció i calculant el percentatge de plantes afectades, d'una manera similar a la que van utilitzar Madden i Hughes (1995).

De la mateixa manera que es va fer el seguiment de la vinya dins hivernacle, també es va realitzar amb l'ametller, observant els símptomes en la setmana 12 (16 per als ametllers més grans) i en la 16 (20 per als demés ametllers) després de la inoculació. Per a analitzar en PCR, es van mostrejar les fulles número 2 des del punt d'inoculació de cada una de les rèpliques, a les 12 setmanes.

Seguint els postulats de Koch, a més dels resultats de les PCR, es va intentar re-aïllar el bacteri de les plantes inoculades, i comprovar que en les plantes control no existia la seva presència.

3.3. Transmissió per empelts en ametller

Per a realitzar aquest assaig, es varen utilitzar ametllers de la varietat 'Vivot' amb el portaempelt GF677. Per a fer-ho, es van seleccionar 24 exemplars i, durant el mes de juny, es van empeltar en escudet (empelt en 'T') 16 rèpliques, mantinent 8 exemplars com a controls.

Per a realitzar l'empelt, es va col·locar una gemma del material vegetal infectat per la subespècie *fastidiosa*, que es va obtenir de dos ametllers de Sa Pobla (XYL 1699/18 i XYL 1702/18) que es seleccionaren entre els analitzats al LOSVIB en dates prèvies al



Figura 10. Material vegetal utilitzat per a la realització dels empelts.

assaig. Posteriorment es va separar l'escorça de l'arbre de l'assaig, es va introduir la gemma i es van segellar els empelts per a afavorir la unió (Gómez i Felipe, 1987). Aproximadament transcorreguda una setmana, es van destapar els empelts i es va tallar el flux de saba principal per a estimular la brotada de l'empelt.



Figura 11. Procés de realització dels empelts

Les mostres de fulles per a analitzar en PCR es va recollir aproximadament als 3 mesos a partir de la realització de l'empelt, utilitzant la mostra també per aïllar el bacteri seguint els postulats de Koch.

4. RESULTATS

4.1. Aïllaments

De totes les mostres que s'han intentat aïllar (n=110), s'han obtingut 50 aïllats del bacteri (45,45%) distribuïts per tot el territori de les Illes Balears, la gran majoria de Mallorca. Només s'ha obtingut un aïllat d'Eivissa (de la subespècie *pauca*) i tres de Menorca.

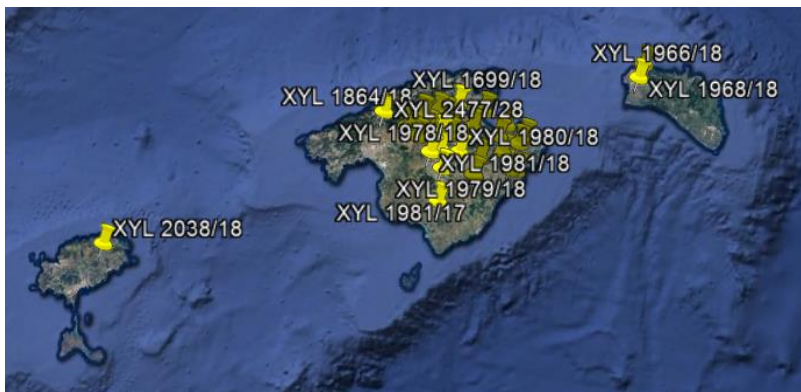


Figura 12. Distribució dels aïllats de *Xylella fastidiosa* obtinguts a les Illes Balears

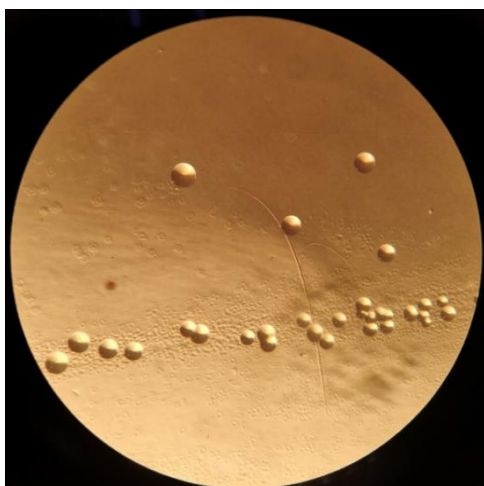


Figura 13. Aïllament de *Xylella fastidiosa* a PWG vist en lupa.

D'aquests 50 aïllats, 16 mostres van ser enviades al laboratori de IAS-CSIC, a la Doctora Blanca Landa, per tal de comprovar la subespècie. Es va fer a partir de DNA provinent de material vegetal i, en alguns casos, directament de les colònies. Com es pot veure a la taula de la pàgina següent (Taula 9), la gran majoria van resultar ser de la subespècie *fastidiosa*. De les 3 de Menorca, 2 van ser identificades com a *multiplex*. Dels aïllaments de la illa de Mallorca, 12 van ser de la subespècie *fastidiosa* i només un de *multiplex* (a Ametller).

Tot i que s'han aconseguit nombrosos aïllaments, és tracta d'un bacteri amb un creixement lent i de aïllament i manteniment difícil (Chen *et al.*, 1995). La gran majoria dels aïllaments pertanyen a la subespècie *fastidiosa* podent dir que és més nombrosa (sobretot a Mallorca) o de més fàcil aïllament, comparant-la amb les altres dues subespècies.

Taula 9. Aïllaments realitzats de manera satisfactoria durant l'assaig.

Codi	Especie Vegetal	Municipi	Isla	Subespècie
XYL 1981/18	<i>Prunus dulcis</i>	Algaida	Mallorca	-
XF 3959/18	<i>Prunus dulcis</i>	Binissalem	Mallorca	-
XYL 1752/17	<i>Prunus dulcis</i>	Ciutadella de Menorca	Menorca	<i>multiplex</i>
XF 3960/18	<i>Prunus dulcis</i>	Binissalem	Mallorca	-
XF 3961/18	<i>Prunus dulcis</i>	Binissalem	Mallorca	-
XYL 2122/18	<i>Prunus dulcis</i> (Vivot)	Binissalem	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 1981/17	<i>Ficus carica</i>	Campos	Mallorca	-
XYL 2195/18	<i>Vitis</i> (Merlot)	Consell	Mallorca	-
XYL 2177/18	<i>Vitis</i> (Manto Negro)	Consell	Mallorca	-
XYL 2178/18	<i>Vitis</i>	Consell	Mallorca	-
XYL 1732/17	<i>Vitis</i> (Parellada 110 Richter)	Felanitx	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 2017/18	<i>Prunus dulcis</i>	Inca	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 2018/18	<i>Prunus dulcis</i>	Inca	Mallorca	-
XYL 2055/17	<i>Vitis</i> (Parellada)	Manacor	Mallorca	-
XYL 2093/18	<i>Prunus dulcis</i>	Manacor	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 2144/18	<i>Vitis</i> (Sauvignon Blanc)	Manacor	Mallorca	-
XYL 2151/18	<i>Vitis</i> (Callet)	Manacor	Mallorca	-
XYL 2153/18	<i>Vitis</i> (Callet)	Manacor	Mallorca	-
XYL 1978/18	<i>Prunus dulcis</i>	Montuïri	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 1979/18	<i>Prunus dulcis</i>	Porreres	Mallorca	-
XYL 203/16 (IVIA 5387.1)	<i>Prunus avium</i>	Porto Cristo. Manacor	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 1699/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sa Pobla	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 1700/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sa Pobla	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 2014/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sa Pobla	Mallorca	-
XYL 2015/18	<i>Prunus dulcis</i>	Santa Margalida	Mallorca	-
XYL 1966/18	<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>	Ciutadella de Menorca	Menorca	<i>multiplex</i>
XYL 1968/18	<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>	Ciutadella de Menorca	Menorca	-
XYL 2016/18	<i>Prunus dulcis</i>	Santa Margalida	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 1995/18	<i>Vitis</i>	Santa Margalida	Mallorca	-
XYL 1997/18	<i>Vitis</i>	Santa Margalida	Mallorca	-
XF 3962/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sant Llorenç des Cardassar	Mallorca	-
XF 3963/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sant Llorenç des Cardassar	Mallorca	-
XF 3964/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sant Llorenç des Cardassar	Mallorca	-
XYL 2038/18	<i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>	Sant Joan de Labritja	Eivissa	<i>pauca</i>
XF 3865/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sant Llorenç des Cardassar	Mallorca	-
XF 3866/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sant Llorenç des Cardassar	Mallorca	-
XYL 1980/18	<i>Prunus dulcis</i>	Vilafranca de Bonany	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XF 1648/18	<i>Acacia</i>		Mallorca	-
XYL 2105/18	<i>Prunus dulcis</i>		Mallorca	-
XYL 2106/18	<i>Prunus dulcis</i>		Mallorca	-
XYL 2107/18	<i>Prunus dulcis</i>		Mallorca	-
XYL 2295/18	<i>Prunus dulcis</i>	Inca	Mallorca	-
XYL 2468/18	<i>Prunus dulcis</i>	Santa Maria del Camí	Mallorca	<i>multiplex</i>
XYL 2474/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sencelles	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 2475/18	<i>Prunus dulcis</i>	Sineu	Mallorca	<i>fastidiosa</i>
XYL 2477/18	<i>Prunus dulcis</i>	Costitx	Mallorca	-
XYL 2432/18	<i>Vitis</i> (Red globe)	Llubí	Mallorca	-
XYL 2398/18	<i>Vitis</i> (Prensal)	Felanitx	Mallorca	-
XYL 2400/18	<i>Vitis</i> (Callet)	Felanitx	Mallorca	-
XF 3967/18	<i>Vitis</i>	Sant Llorenç des Cardassar	Mallorca	-

4.2. Inoculacions

4.2.1. Inoculacions en vinya

A vinya, els símptomes varen aparèixer aproximadament a les 5-6 setmanes després de les inoculacions a les varietats 'Tempranillo P1103', 'Tempranillo R140' i 'Gorgollassa R110'. A la Figura 14 es pot veure l'evolució de la malaltia des de que van aparèixer els primers símptomes.

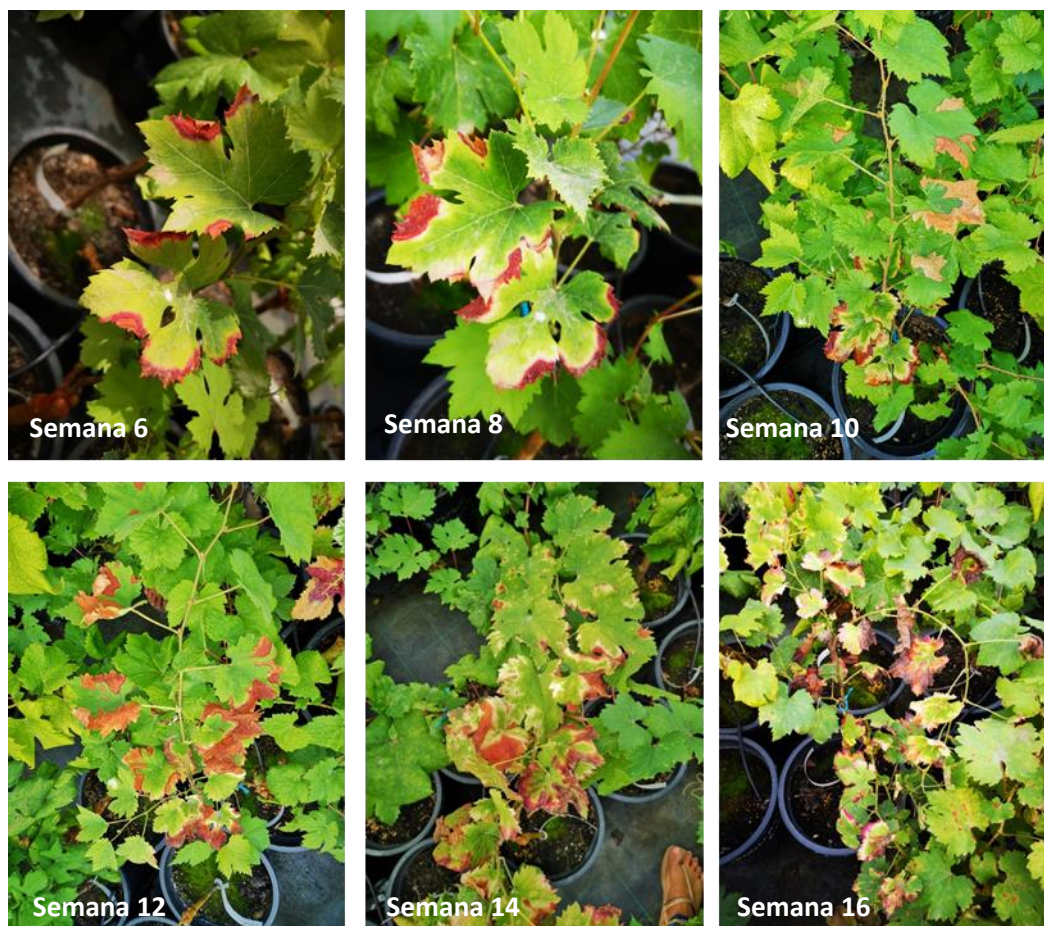


Figura 14. Evolució de la malaltia de Pierce en vinya, varietat 'Gorgollassa (R110)', a partir de la setmana 5-6 fins la setmana 16.

Com es pot veure a la taula (Taula 10), la varietat que va presentar símptomes de manera més primerenca va ser 'Tempranillo' amb el peu 'P1103' mentre que altres varietats o combinacions no es veien encara alterades pel bacteri. Encara que va ser la varietat que va mostrar majors símptomes en un principi, a mesura que van transcórrer les setmanes, altres varietats van mostrar majors susceptibilitats, com per exemple 'Gorgollassa R110' (Figura 14) o 'Viura SO4'.

Taula 10. Índex de severitat i percentatges de positius de les mostres de vinya. Els nombres en verd equivalen a varietats sense símptomes o amb menors símptomes, mentre que els nombres en vermell equivalen a les varietats amb majors.

Varietat	Patró	Índex de Severitat					PCR
		8 Setmanes	10 Setmanes	12 Setmanes	14 Setmanes	16 Setmanes	12 Setmanes
		31/07	14/08	28/08	11/09	25/09	% Positius
Mandó	R110	0,667	1,111	2,889	3,222	4,556	100
Prensal	161/49	0,500	1,375	2,750	3,625	4,750	100
	R110	0,125	0,250	1,500	1,500	2,375	50
Gorgollassa	R110	1,000	2,143	4,714	4,857	5,000	100
Giró Negre	R110	0	0,125	1,250	2,000	2,250	62,5
Cabernet	R110	0	0,125	0,375	0,625	0,875	25
Syrah	41B	0	0,125	0,625	0,750	0,875	12,5
	R110	0	0,125	1,875	2,500	3,500	100
	R140	0,444	0,778	2,111	2,667	2,889	55,56
Viognier	R110	0,125	0,125	0,625	1,125	2,250	75
Tempranillo	R110	0,250	0,375	0,875	1,250	1,750	25
	P1103	1,625	2,333	3,833	4,167	4,167	62,5
	SO4	0,125	0,625	1,875	2,250	2,375	50
	R140	1,250	1,500	2,250	2,375	2,500	50
	41B	0,250	0,375	1,125	1,125	1,250	25
Chardonnay	R110	0,125	0,500	2,125	2,750	2,625	75
Merlot	R110	1,000	2,125	3,500	3,500	3,750	75
Viura (Macabeo)	R140	0	0,100	2,600	2,800	3,200	70
	P1103	0,750	1,250	3,875	4,375	4,375	87,5
	SO4	0,500	1,500	4,125	4,625	4,750	100
Sauvignon	R110	0,875	2,000	3,750	4,750	5,000	100
Blanc	SO4	0	0	0,500	0,500	0,500	0
Vinater Blanc	R110	0,125	0,125	0,500	0,500	1,000	25
Giró Ros	R110	0	0,125	0,250	0,250	0,375	0
	161/49	0,143	0,143	0,857	1,429	2,286	42,86
Esperó de Gall	R110	0,125	0,250	0,750	0,750	0,750	12,5
Callet	R110	0	0,375	1,500	1,625	2,250	37,5
Mancés	R110	0	0	0,250	0,250	0,250	0
Manto Negro	R110	0,125	0,250	2,875	3,000	3,750	75
Argamussa	R110	0	0,125	0,625	0,625	1,625	50

El 89% de les plantes simptomàtiques van donar positiu a les PCRs durant la setmana 12, mentre que només un 0,8% (12 plantes) de les plantes asimptomàtiques van donar positiu als anàlisi, semblant que l'observació de símptomes és un bon indicatiu de la infecció pel bacteri.

Els resultats de les PCRs coincideixen amb els graus de severitat de la malaltia, sent 'Mandó (R110)', 'Prensal (161/49)', 'Gorgollassa (R110)', 'Syrah (R110)', 'Viura (SO4)' i 'Sauvignon Blanc (R110)' les varietats amb major nombre de plantes infectades (100%); i 'Sauvignon Blanc (SO4)', 'Giró Ros (R110)' i 'Mancés (R110)' les varietats que menys es van infectar (0%). Es va realitzar una comprovació del grau de correlació (Spearman) amb el programa estadístic RStudio, comprovant que existeix una correlació positiva entre la incidència de la malaltia, és a dir, els símptomes observats a les plantes, i el resultat del laboratori (0,81).

Mitjançant un anàlisi estadístic, després de comprovar que les dades no seguien una distribució normal, es va realitzar un model lineal generalitzat (GLM) demostrant que el model que millor descriu la severitat és aquell que contempla la combinació de cultivar i peu més el temps de la inoculació. Per tant, per a poder arribar a uns resultats fiables sempre es tindrà en compte la combinació cultivar-portaempelt, sense poder estudiar-los per separat. De la mateixa manera, el temps també afecta al resultat, per tant, les dades que s'utilitzaran seran de la mateixa setmana (setmana 14), sempre hi quant no s'indiqui el contrari.

Es demostra que existeixen diferències significatives en quant a les setmanes, sense trobar-ne a la setmana 8 ($p=0,104$). El temps posterior a la inoculació té un efecte significatiu, la severitat de la incidència augmenta amb el temps, des de que no mostrava diferències significatives entre les combinacions de varietats i portaempelts a la setmana 8, fins a grans diferències a la setmana 14 i 16 després de la inoculació.

S'ha de destacar que el peu utilitzat pareix influir en gran mesura en el comportament de la planta, observant-se en moltes varietats, però en major mesura en la varietat 'Sauvignon Blanc', en la qual el peu 'SO4' pareix conferir-li tolerància o resistència, mentre que el peu 'R110' li aporta gran susceptibilitat al bacteri. Si ens centrem només amb el peu, mitjançant el test estadístic Kruskal-Wallis i amb la comparació post-hoc del test de Tuckey, podem afirmar que existeixen diferències significatives entre ells dins una mateixa varietat en quant a nombre de fulles afectades (severitat), encara que no s'han realitzat el mateix nombre d'assajos amb tots ells i no en totes les varietats mostren diferències significatives. Per exemple, el peu P1103 sembla que té un comportament diferent a tots els demés peus a totes les varietats.

La varietat que que s'ha combinat amb major nombre de peus és 'Tempranillo', que dels 6 peus, es combina amb 5 (a excepció de 161/49). En el cas de les diferències entre peus només es troben a la setmana 10 ($p=0,0299$), mentre que a la setmana 12 ($p=0,085$) i 14 ($p=0,165$), no mostren diferències significatives. Es comprova que el peu que li confereix una major susceptibilitat és el peu P1103, seguida del peu R140, mentre que els que menys susceptibilitat mostren són els peus R110 i 41B, tot i que a setmanes més avançades de la malaltia no mostren diferències significatives.

En el cas de 'Viura', que es combina amb els peus P1103, R140 i SO4, mostra diferències significatives a la setmana 14 entre els peus P1103 i R140 ($p=0,012$), però no entre P1103 i R140, ni entre R140 i SO4, essent el peu P1103 aquell que major susceptibilitat aporta i el R140 el que més tolerància mostra en combinació amb aquesta varietat.

En el cas de 'Sauvignon Blanc', com ja hem comentat amb anterioritat, és veu clarament l'efecte del peu, ja que el peu R110 mostra una major susceptibilitat que el peu SO4 ($p=0,000063$).

Tot i que els peus sembla que tenen un efecte similar a les varietats no en totes es demostra, ja que per exemple les varietats 'Giró ros' i 'Prensal' es combinen amb els mateixos peus 161/49 i R110, però en el cas de 'Giró ros' no mostren diferències significatives ($p=0,37$), mentre que en la varietat 'Prensal' el peu 161/49 li confereix una major susceptibilitat ($p=0,013$) que el peu R110.

En algunes varietats, com per exemple 'Syrah' no es veu l'efecte del peu, ja que cap dels treus peus assetjats (R110, 41B i R140) mostren diferències significatives entre ells ($p=0,075$).

Encara que no es poden establir les suficients diferències entre ells, ja que tenen un comportament diferent en funció de la varietat assetjada, veiem que el peu P1103 és aquell que mostra una major susceptibilitat amb les varietats utilitzades i que el peu 41B pareix conferir major tolerància, mentre que els demés peus (R110, R140, 161/49 i SO4) varien en gran mesura segons la varietat, per la qual cosa no es poden classificar en un grup clar.

Si passem a comparar les combinacions de varietats i portaempelts, com es pot observar a la següent figura (Figura 15), no existeixen moltes diferències entre aquestes, per la qual cosa, la majoria de les varietats no mostren diferències significatives entre elles, fent que sigui difícil la seva classificació.

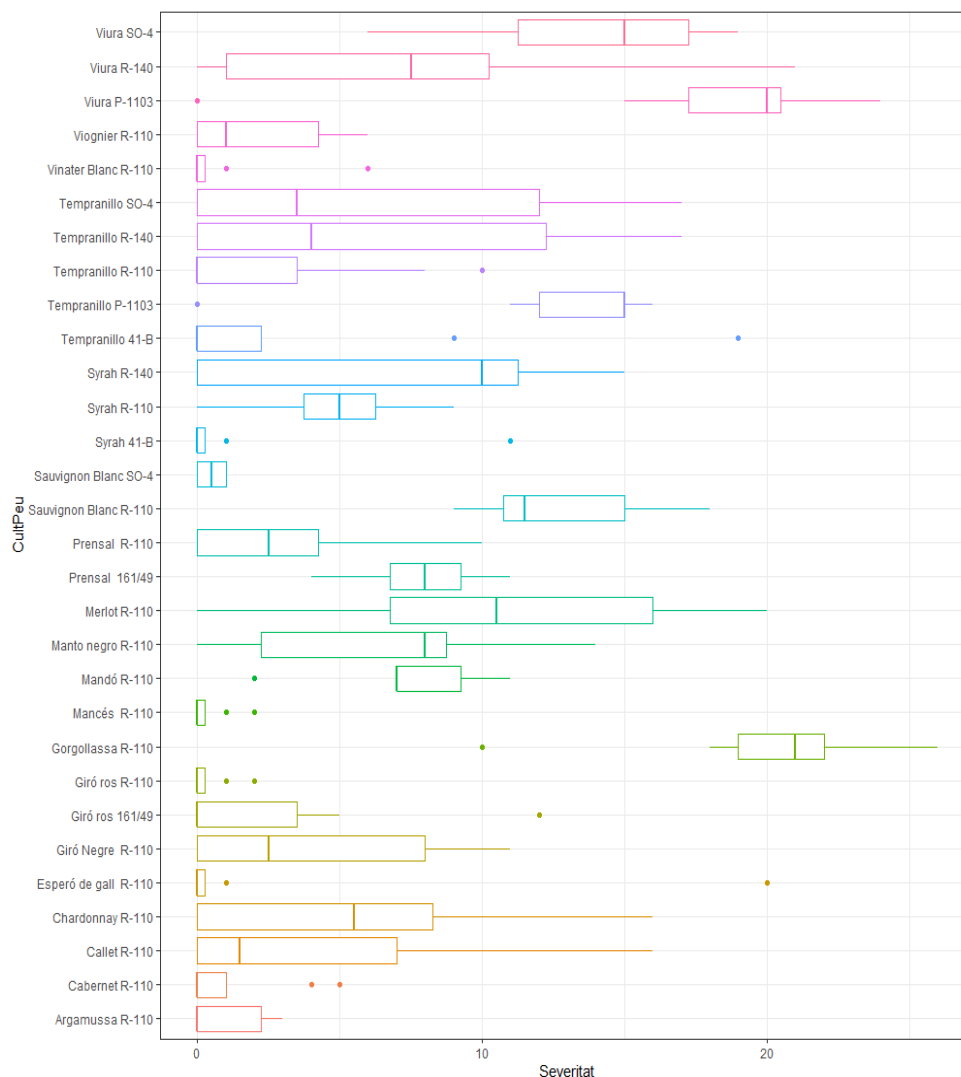


Figura 15. Nombre de fulles afectades (severitat) segons la combinació de varietat-peu durant la setmana 14 després de la inoculació. Les caixes delimiten el primer i tercer quartil (representen el 50% de les dades centrals), dins de la caixa la línia indica on es troba la mitjana (segon quartil). Les línies horitzontals representen el rangs màxim i mínim de les dades. Els punts representen els valors atípics o extrems, que no compleixen amb els requisits d’heterogeneïtat de les dades.

A partir de les dades obtingudes, es fa una classificació estimada de la susceptibilitat de les combinacions varietats-portaempelt (Taula 11), ja que es veu que les varietats ‘Gorgollassa R110’ i ‘Viura’ (en combinació amb els peus P1103 i SO4) es comporten com a més susceptibles sense mostrar diferències significatives entre elles, però si amb les varietats ‘Argamussa R110’, ‘Cabernet R110’, ‘Esperó de Gall R110’, ‘Giró Ros R110’ i ‘Mancés R110’. També es veuen diferències significatives entre ‘Gorgollassa R110’ i les varietats ‘Sauvignon Blanc SO4’ i ‘Syrah 41B’, mentre que no es veuen diferències significatives entre les demés varietats. D’aquesta manera la gran part de les combinacions es classifiquen com a mitjanament susceptibles, ja que no mostren diferències significatives amb les combinacions de varietats-portaempelts classificades com a més susceptibles ni amb les menys susceptibles.

Taula 11. Classificació segons la susceptibilitat a *Xylella fastidiosa* de les combinacions de varietat-portaempelt de vinya segons el nombre de fulles amb símptomes.

Més susceptibles	Mitjanament susceptibles	Menys susceptibles
Gorgollassa R110	Mandó R110	Argamussa R110
Viura P1103	Prensal 161/49	Cabernet R110
Viura SO4	Prensal R110	Esperó de Gall R110
	Giró Ros 161/49	Giró Ros R110
	Manto Negro R110	Mancés R110
	Callet R110	Syrah 41B
	Giró Negre R110	Sauvignon Blanc SO4
	Chardonnay R110	Vinater Blanc R110
	Viura R140	
	Merlot R110	
	Sauvignon Blanc R110	
	Sauvignon Blanc SO4	
	Syrah R110	
	Syrah R140	
	Tempranillo R110	
	Tempranillo 41B	
	Tempranillo P1103	
	Tempranillo R140	
	Tempranillo SO4	
	Viognier R110	

També podem comprovar la susceptibilitat segons la varietat totes elles amb el peu R110, ja que de les 19 varietats s'utilitza a 18 d'elles. Només es queda fora de l'anàlisi la varietat 'Viura', que s'ha combinat amb els peus P1103, R140 i SO4.

Si comparem totes les varietats amb el peu R110 podem observar que les varietats que es comporten com a més susceptibles són les varietats 'Gorgollassa' i 'Sauvignon Blanc', mostrant diferències significatives amb aquelles classificades com a menys susceptibles, i sense mostrar diferències amb les mitjanament susceptibles (Taula 12). La classificació és molt similar a la mostrada amb les combinacions de varietat-portaempelt, només varia la classificació de les varietats 'Sauvignon Blanc', que comparant-la només amb les varietats amb el peu R110 passa a ser més susceptible; i de 'Viognier' i 'Tempranillo', que passen a ser menys susceptibles.

Taula 12. Classificació segons la susceptibilitat a *Xylella fastidiosa* de les varietats de vinya segons el nombre de fulles amb símptomes amb el peu R110.

Més susceptibles	Mitjanament susceptibles	Menys susceptibles
Gorgollassa	Mandó	Argamussa
Sauvignon Blanc	Prensal	Cabernet
	Manto Negro	Esperó de Gall
	Callet	Giró Ros
	Giró Negre	Mancés
	Chardonnay	Vinater Blanc
	Merlot	Tempranillo
		Syrah
		Viognier

En el cas de les varietats menys susceptibles són aquelles que mostren diferències significatives amb les varietats més susceptibles ('Gorgollassa' i 'Sauvignon Blanc'), a excepció de les tres darreres varietats 'Tempranillo', 'Syrah' i 'Viognier', que només mostren diferències significatives amb la varietat 'Gorgollassa'.

Si comparem altres varietats combinades amb altres peus, en el cas de 41B que es combina amb 'Syrah' i 'Tempranillo' no es veu diferències significatives entre les varietats ($p=89$), de la mateixa manera que passa amb el peu R110.

Amb el peu 161/49 es combinen les varietats 'Prensal' i 'Giró ros', que, de la mateixa manera que ocorre amb el peu R110, mostra diferències significatives entre varietats ($p=0,014$), essent 'Giró ros' la varietat amb menor incidència de la malaltia.

Pel que fa al peu P1103, combinat amb les varietats 'Viura' i 'Tempranillo', podem veure que existeixen diferències significatives ($p=0,036$), essent la varietat 'Viura' més susceptible que 'Tempranillo'.

Si observem el comportament de les tres varietats combinades amb el peu SO4 ('Sauvignon Blanc', 'Tempranillo' i 'Viura'), veiem que existeixen diferències significatives entre 'Sauvignon Blanc' i 'Viura' ($p=0,0033$), però no entre 'Tempranillo' i aquestes.

Per acabar, podem veure que no es troben diferències significatives ($p=0,94$) entre les varietats 'Syrah', 'Tempranillo' i 'Viura', amb el peu R140. Cosa que no succeeix amb les varietats 'Tempranillo' i 'Syrah' amb el peu P1103.

Si dividim les varietats assetjades segons el tipus de raïm (Taula 13), és a dir, blanc o negre, segons el test de Wilcoxon (demostrant que les variàncies són iguals als dos grups – test de Fliher-Killen $p\text{-value}=0.89$) podem veure que no existeix diferència entre els resultats en quant a severitat dins les plantes de l'hivernacle ($p=0.995$), és a dir, el comportament de les varietats blanques no és diferent del de les varietats negres.

Taula 13. Classificació de les varietats assatjades segons els tipus de raïm.

Varietats Blanques	Varietats Negres
Argamussa	Cabernet
Chardonnay	Callet
Giró Ros	Esperó de Gall
Prensal	Giró Negre
Sauvignon Blanc	Gorgollassa
Vinater Blanc	Mancés
Viognier	Mandó
Viura	Manto Negro
	Merlot
	Syrah
	Tempranillo

Durant la setmana 12 es va comprovar el nombre de fulles amb símptomes tant de manera apical com de manera basal des del punt d'inoculació, comprovant el moviment del bacteri dins la planta (Taula 14).

Taula 14. Nombre de fulles afectades per damunt (blau) i per a baix (vermell) del punt d'inoculació durant la setmana 12 després de la inoculació.

Varietat	Peu	Nº de fulles afectades per rèplica																							
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		12			
		↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓		
Mandó	R110	2	0	6	0	6	1	4	1	6	1	5	0	5	3	4	1					5	0		
Prensal	161/49	2	0	3	1	4	2	4	3	5	2	4	2	5	5	5	2								
Prensal	R110	5	0	1	3	4	6	0	0	3	1	0	0	0	0	0	1								
Gorgollassa	R110	11	7	7	11	7	2	18	2	8	1	13	2				12	3							
Giró Negre	R110	0	0	4	0	0	0	0	0	8	0			0	0	9	1								
Cabernet	R110	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	0	0								
Syrah	41B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0								
Syrah	R110	4	0	0	0	3	0	4	0	3	0	2	0	5	0	5	0								
Syrah	R140	7	2	8	0	0	0	3	0	0	0	8	0	10	4	0	0	0	0						
Viognier	R110	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	1	3	0	0										
Tempranillo	R110	7	0	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Tempranillo	P1103	12	4	8	1	12	3							6	3	10	3								
Tempranillo	SO4	0	0	5	2	0	0	0	0	7	0	0	0		10	1	7	2							
Tempranillo	R140	9	6	0	0	8	5	0	0	0	0	5	2	0	0	9	2								
Tempranillo	41B	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1	7	2	0	0	0	0								
Chardonnay	R110	0	0	4	1	4	1	0	0	0	0	5	0	6	1		16	0							
Merlot	R110	9	2	12	4	0	0	14	2	7	3	0	0	14	6	8	1								
Viura	R140	0	0	14	4	3	1	5	0	7	1	0	0	6	2	7	2	0	0	9	1				
Viura	P1103	5	4	0	0	8	3	4	1	8	1	11	1	18	1	19	0								
Viura	SO4	12	1	10	0	8	0	5	5	5	1	12	1	6	0	13	0								
Sauvignon Blanc	R110	6	1	4	1	5	9	5	0	5	0	9	1	8	2	13	2								
Sauvignon Blanc	SO4	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Vinater Blanc	R110	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1								
Giró Ros	R110	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0								
Giró Ros	161/49			3	0	5	0	0	0	1	0			0	0	0	0	0	0						
Esperó de Gall	R110	0	0	0	0	0	0	0	0	15	1	1	0												
Callet	R110	0	0	1	0	0	0			0	0	0	0	0	0	12	4	5	0						
Mancés	R110	0	0	2	0	0	1	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Manto Negro	R110	8	0	8	0	10	1	2	4	3	0	5	6	0	0	0	0								
Argamussa	R110	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0								

El test de Wilcoxon mostra que existeixen diferències significatives en quant al moviment del bacteri dins la planta ($p\text{-value}=1,17 \cdot 10^{-11}$), ja que en el moviment apical es veu una mitja de 2,75 fulles més afectades que en el moviment basal.

4.2.2. Vinya en condicions de camp

Per tal d'establir una classificació de varietats en condicions naturals, sense inoculació forçada, es van observar unes 10200 plantes de 17 camps diferents, repartits pel territori de Mallorca, només 2 d'ells amb maneig de cultiu ecològic.

Com s'observa a les taules següents (Taula 15.1 i 15.2) les varietats responen de diferent manera segons la localització de la parcel·la, depenent de les seves condicions ambientals i del seu voltant. També s'ha vist que una mateixa varietat tractada de manera ecològica, com per exemple la varietat 'Callet' de dues parcel·les properes de Felanitx, mostra una major susceptibilitat en el tractament ecològic; o 'Cabernet sauvignon' que de tres parcel·les de Binissalem les que pareixen tenir major tolerància al bacteri són les que tenen un maneig convencional. Això pot ser degut al maneig del cultiu amb un menor nombre de tractaments fitosanitaris i al maneig de la coberta vegetal que si no s'elimina pot actuar com a reservori dels vectors.

Taula 15.1. Percentatge d'incidència i mitjana del grau de severitat de la malaltia de Pierce en camp en diferents municipis de Mallorca. Las parcel·les Felanitx 1 i Binissalem 3 són parcel·les d'agricultura ecològica. El percentatge d'incidència s'expressa com el nombre de plantes afectades amb qualsevol grau d'afecció.

Varietat	Municipi	Grau Severitat	% Incidència
Gorgollassa	Binissalem 1	0,014	0,71
	Consell	0,221	14,29
	Santa	2,779	95,71
Callet	Manacor 2	1,372	50
	Felanitx 1	1,325	55,1
	Felanitx 2	0,407	20,71
	Santa	1,65	77,86
	Consell	0,393	27,86
Syrah	Binissalem 1	1,65	3,57
	Manacor 2	1,521	82,14
	Consell	1,5	77,14
	Felanitx 1	1,029	47,86
	Santa	0,993	53,57
	Sencelles	0,114	7,143
	Pollença	0	0
	Petra	0	0
	Llucmajor	0,014	1,43
Prensal (Moll)	Algaida	0,1	6,43
	Binissalem 1	0,114	4,29
	Consell	0	0
	Santa	0,771	38,57
	Petra	0,021	1,43
	Santa Maria	0,15	8,57
Chardonnay	Algaida	0,057	4,29
	Binissalem 1	0,771	2,86
	Manacor 1	0,057	2,86
	Consell	0,029	2,14
	Felanitx 1	0,283	13,87
	Sencelles	0,05	2,857
	Pollença	0	0
Cabernet Sauvignon	Llucmajor	0,007	0,71
	Son Servera	0,271	19,29
	Binissalem 1	0,05	0,71
	Binissalem 2	0,007	30,71
	Binissalem 3	0,564	59,29
	Consell	0,45	32,14
	Felanitx 2	0,186	8,57
	Sencelles	0,307	15,71
	Porreres	0,014	1,43
	Santa Maria	0,021	2,14
Petra	0	0	
Son Servera	0,564	27,14	

Taula 15.2. Percentatge d'incidència i mitjana del grau de severitat de la malaltia de Pierce en camp en diferents municipis de Mallorca. Les parcel·les Felanitx 1 i Binissalem 3 són parcel·les d'agricultura ecològica. El percentatge d'incidència s'expressa com el nombre de plantes afectades amb qualsevol grau d'afecció.

Varietat	Municipi	Grau Severitat	% Incidència
Viura	Felanitx 2	0,4	14,29
	Sencelles	0,946	48,72
	Son Servera	1,914	77,14
Merlot	Binissalem 1	0,946	2,86
	Sencelles	0,057	2,86
	Pollença	0	0
	Petra	0	0
	Porreres	0	0
	Llucmajor	0	0
	Binissalem 1	0,064	2,14
Tempranillo	Petra	0	0
	Binissalem 1	0,057	2,14
Manto Negro	Binissalem 3	0,036	56,43
	Consell	0,014	1,43
	Sencelles	0,05	2,857
	Santa Maria	0,071	6,43
	Algaida	0,036	2,86
	Manacor 1	2,1	98,57
Parellada	Manacor 1	1,129	54,29
	Pollença	0	0
	Llucmajor	0	0
Sauvignon Blanc	Manacor 2	1,482	72,14
	Algaida	0,014	1,43
Giró	Llucmajor	0	0
Giró Ros	Felanitx 2	0,071	3,57
	Petra	0	0
Moscatell	Consell	0,807	46,43
	Santa Maria	0	0
	Petra	0,036	2,14
	Algaida	0,029	2,14
Malvasia	Llucmajor	0,007	0,71
	Son Servera	0,371	27,29
Muscat	Algaida	0,036	2,14
Reisling	Algaida	0,036	2,14

La variable camp es comporta com a variable aleatòria, ja que la incidència de la malaltia és significativament diferents entre ells.

Podem fer una classificació de les varietats segons la susceptibilitat mostrada a camp (Taula 16), trobant diferències significatives entre aquelles més susceptibles ('Gorgollassa', 'Callet', 'Viura' i 'Parellada') i les menys susceptibles.

Taula 16. Classificació de les varietats de vinya en condicions naturals segons el seu grau de susceptibilitat.

Més susceptibles	Mitjanament susceptibles	Menys susceptibles
Gorgollassa	Syrah	Merlot
Callet	Sauvignon Blanc	Moscatell
Macabeu (Viura)	Viognier	Rielsing
Parellada	Muscat	Tempranillo
	Cabernet Sauvignon	Malvasia
	Giró Negre	Chardonnay
		Manto Negro
		Prensal
		Giró Ros

Si ens centrem en comparar els resultats dels camps segons el maneig de cultiu, agricultura ecològica o convencional (Figura 16), segons la correlació de Spearman, el grau de severitat està altament correlacionat amb el percentatge d'incidència de manera positiva (0.91). Tot i això, amb el test de Kruskal-Wallis, no es troben diferències significatives entre el grau de severitat de les plantes tractades amb agricultura convencional o amb agricultura ecològica ($p\text{-value}=0,11$). Però si que difereixen en quant a percentatge d'incidència ($p\text{-value}=0,01$), essent la incidència major en agricultura ecològica (46,51%) que en agricultura convencional (17,14%).

De totes maneres, és difícil arribar a unes conclusions fiables si el nombre de camps amb agricultura ecològica és molt menor que els que es dediquen a l'agricultura convencional, per la qual cosa, seria convenient realitzar més observacions en camps amb maneig del sòl de manera ecològica.

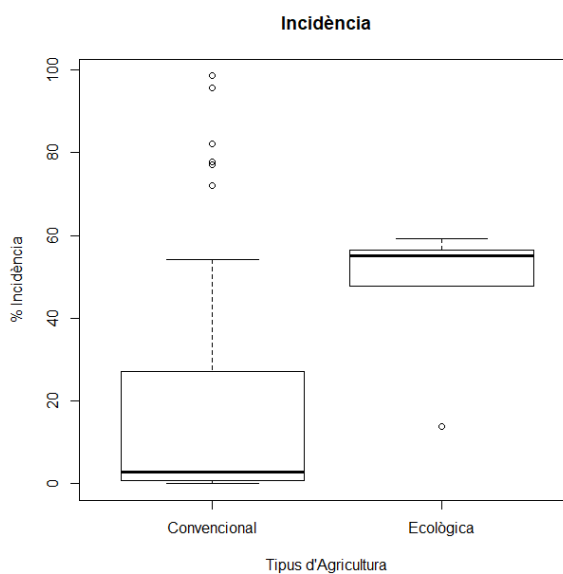


Figura 16. Distribució dels percentatges d'incidència segons el mètode de cultiu. Les caixes delimiten el primer i tercer quartil (representen el 50% de les dades centrals), dins de la caixa la línia indica on es troba la mitjana (segon quartil). Les línies verticals representen el rangs màxim i mínim de les dades. Els punts representen els valors atípics o extrems, que no compleixen amb els requisits d'heterogeneïtat de les dades.

Per acabar amb l'assaig de vinya, si comparem el percentatge d'incidència segons el tipus de raïm, blan o negre (Figura 17), es comprova que, de la mateixa manera que passa en condicions d'hivernacle, no hi ha diferències significatives en quant a percentatge d'incidència de varietats blanques i negres ($p\text{-value}=0,86$), mentre que les varietats blanques tenen un percentatge d'incidència mitjà del 15,46%, les varietats negres el tenen de 21,66%, només un 6,2% més que les varietats blanques.

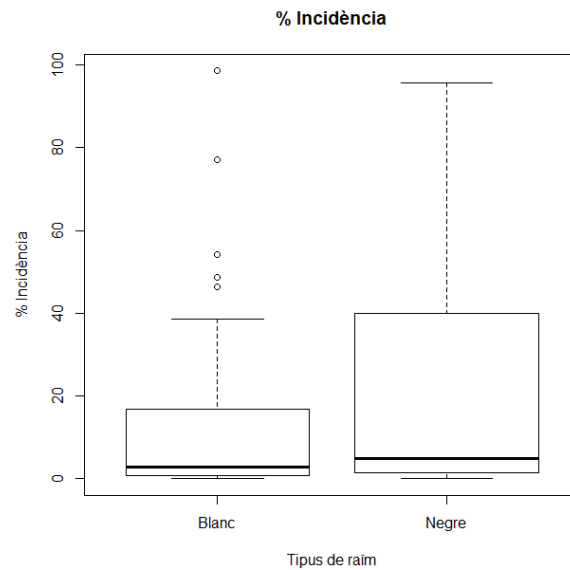


Figura 17. Distribució del percentatge d'incidència de la malaltia, segons els tipus de raïm. Les caixes delimiten el primer i tercer quartil (representen el 50% de les dades centrals), dins de la caixa la línia indica on es troba la mitjana (segon quartil). Les línies verticals representen el rangs màxim i mínim de les dades. Els punts representen els valors atípics o extrems, que no compleixen amb els requisits d'heterogeneïtat de les dades.

4.2.3. Inoculacions en ametllers

Pel que fa a les inoculacions dels ametllers, trobem els resultats en la següent taula (Taula 17). Només 9 de les plantes inoculades de totes les combinacions (n=160) han donat resultats positius, resultant l'assaig de poca rellevància. Així i tot, es veu que la varietat d'ametller que ha presentat majors símptomes ha estat la 'Penta' o 'Pentacebas' amb el peu 'G x N' amb un 75% de positius. Seguida de la mateixa varietat amb el peu 'RP-20', 'Soleta (RP-20)' i 'Marinada (GF677)'. Es pot veure una diferència en la utilització de distints portaempelts, que mostren una diferència en quant a susceptibilitat dins una mateixa varietat.

Taula 17. Nombre i percentatge de positius mitjançant PCR de les combinacions varietats-portaempelt d'ametller.

Varietat	Peu	Nº Positius	% Positius
Marta	GF 677	0	0
Vairo	GF 677	0	0
Marinada	GF 677	1	12,5
	G x N	0	0
Soleta	GF 677	0	0
	G x N	0	0
	RP-20	1	12,5
Belona	GF 677	0	0
	G x N	0	0
Avijor	GF 677	0	0
	G x N	0	0
	RP-20	0	0
	RP-40	0	0
Vialfas	RP-20	0	0
	R-R	0	0
Isabelona	RP-20	0	0
	GF 677	0	0
Penta	RP-20	1	12,5
	G x N	6	75
Guara	RP-20	0	0

Encara que amb els resultats obtinguts no tenim informació suficient per a establir una classificació, en una primera estimació, aquesta quedaria de la següent manera:

- Penta GxN: combinació de varietat-peu més susceptible
- Penta RP20, Soleta RP20 i Marinada GF677: com a combinacions mitjanament susceptibles.
- La resta de combinacions com a poc susceptibles, ja que no s'ha obtingut cap resultat de les inoculacions.

L'afecció no mostra diferències significatives en cap varietat ($p=0,48$), peu ($0,54$) o combinació ($p=0,061$), ja que la majoria de les plantes mostraven símptomes que no indicaven una infecció per *Xylella fastidiosa*, però es poden confondre fàcilment amb els símptomes causats per altres

factors biòtics o abiòtics, com altres patògens, estresos ambientals, deficiències d'aigua, salinitat, contaminants de l'aire, problemes nutricionals, cremades del sòl... (Landa *et al.*, 2017). Només es troben diferències significatives entre la varietat 'Pentacebas' i la varietat 'Avijor' ($p=0,0016$). Els resultats indiquen que la varietat més susceptible a n'aquest assaig ha estat 'Pentacebas' i la menys susceptible 'Avijor', ja que no ha mostrat cap resultat positiu a cap dels 4 peus utilitzats. Tot i que altres varietats tampoc no han mostrat resultats positius, no s'han utilitzat el mateix nombre de plantes, ja que el nombre de peus assajat no ha estat el mateix.

Amb la prova de Kruskal-Wallis, les varietats no mostren diferències significatives en quant a símptomes observats, però sí en quant a resultats de les PCRs ($p\text{-value} = 3,97 \cdot 10^{-7}$). A la Figura 18 es pot veure la quantitat de valors atípics i de plantes amb símptomes que no coincideixen amb els resultats obtinguts amb les PCRs.

Segons la correlació de Spearman per a mostres amb distribució no normal, la correlació entre l'afecció o els símptomes observats és de 0,38, un valor baix però positiu, això es deu a que els símptomes provocats pel bacteri no són específics i es poden confondre fàcilment amb símptomes d'estrés de la planta, com per exemple per la falta d'aigua o d'alguna carència nutricional, com també es poden veure afectats per fongs o altres plagues o malalties, com s'ha comentat anteriorment.

Els resultats són insuficients per arribar a unes conclusions fiables, ja que amb la majoria de les varietats no s'ha obtingut a cap resultat. De totes maneres, el model que millor defineix l'afecció i els resultats obtinguts, és la combinació de varietat i peu.

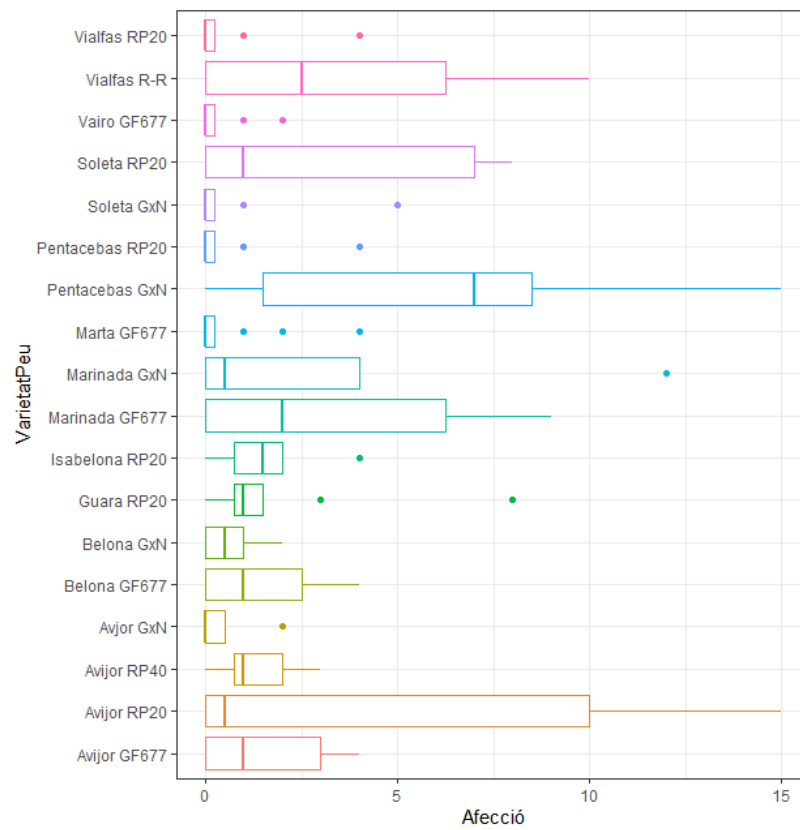


Figura 18. Nombre de fulles amb símptomes (Afecció), segons la combinació de varietat i peu d'ametller. Les caixes delimiten el primer i tercer quartil (representen el 50% de les dades centrals), dins de la caixa la línia indica on es troba la mitjana (segon quartil). Les línies verticals representen el rangs màxim i mínim de les dades. Els punts representen els valors atípics o extrems, que no compleixen amb els requisits d'heterogeneïtat de les dades.

4.3. Transmissió per empelts

Com es pot veure a la Taula 18 el percentatge d'èxit dels empelts va ser proper al 70%. Així i tot alguns dels brots joves van agafar més força que altres, per tant, mentre que en alguns ametllers ja trobaven algunes fulles idònies per a mostrejar, altres arbres només presentaven fulles joves (Figura 19), no indicades per al mostreig per la baixa o nul·la concentració del bacteri (EPPO, 2019). Podent ser una de les raons per les quals només un 15% dels arbres empeltats van donar positius, és a dir, només dos de 13 brotats.

Taula 18. Nombre i percentatge d'empelts brotats i de empelts positius a PCR damunt 'Vivot (GF 677)'.

Arbres estudi	24
Arbres empeltats (mostra positiva)	16
Arbres brotats	13
% Brotats	68,75
Positius PCR	2
% Positius PCR	15,38



Figura 19. Evolució dels empelts. Primera fotografia: brots dels empelts dia 13/07/18. Segona i tercera fotografia: diferència entre les brots dia 11/09/18.

5. DISCUSSIÓ

5.1. Inoculacions en vinya

Els símptomes apareguts a les plantes de vinya han variat depenent del cultivar, però coincideixen amb els descrits a la bibliografia consultada, per exemple en varietats tintes com la 'Gorgollassa' la fulla ha mostrat molta més proporció de color porpra que en altres cultivars, i les varietats blanques presentaven les fulles més groguenques. Pel que fa als símptomes més característics, com la necrosis marginal de les fulles i les fulles cloròtiques, la caiguda de les fulles amb els pecíols encara fixats a la tija ('matchsticks') (Pierce, 1982; Hopkins i Purcell, 2002), s'han observat a totes les varietats. No s'han observat símptomes més avançats com la mort de la planta com a conseqüència de la infecció (Thorne *et al.*, 2006), ni la curació de les vinyes durant l'hivern o mitjançant la poda com ho fan a Califòrnia (Feil, 2002), ja que els resultats es basen en l'observació de només un any.

Si comparem els resultats obtinguts en condicions de camp (encara que no es sap amb certesa el peu utilitzat) amb els resultats dins l'hivernacle, veiem que moltes de les varietats es comporten de la mateixa manera, com per exemple les varietats 'Viura' i 'Gorgollassa' que es comporten com a varietats molt susceptibles; Giró Ros' que té un comportament poc susceptible; o 'Sauvignon Blanc' i 'Giró Negre' que es comporten com a mitjanament susceptibles. La varietat 'Syrah' es troba en el cas de l'assaig en condicions d'hivernacle entre susceptibilitat mitjana i baixa, però en el cas de la combinació amb el peu R110, que es aquell que més s'utilitza a camp, es troba a susceptibilitat mitjana, per tant pareix coincidir amb el resultat de camp. Altres varietats no coincideixen amb els resultats a hivernacle, com 'Cabernet Sauvignon' que en el cas de condicions controlades es comporta com a poc susceptible; i les varietats 'Chardonnay', 'Manto Negro' i 'Prensal', passen de ser poc susceptibles a camp a mitjanament susceptibles amb inoculacions forçades. Així hi tot, els resultats no varien molt de l'assaig en condicions controlades dins hivernacle.

Segons Salazar i López (2018), investigadors de valència, les varietats més sensibles són 'Chardonnay', 'Garnatxa', 'Monastrell', 'Cabernet', 'Merlot', 'Viura', 'Viognier', 'Moscatell' i 'Malvasia'. Només quatre d'aquestes varietats no s'han estudiat a n'aquest assaig ('Garnatxa', 'Monastrell', 'Moscatell' i 'Malvasia') de les altres cinc varietats els resultats pareixen coincidir en quatre d'elles ('Chardonnay', 'Merlot', 'Viura' i 'Viognier'), presentant percentatges majors al 70% de positius. De fet, a les nostres classificacions 'Viura' és aquella que major susceptibilitat presenta, classificant-la com a molt susceptible, mentre que 'Chardonnay', 'Merlot' i 'Viognier' es classifiquen com a mitjanament susceptibles. La única varietat que ha mostrat un comportament diferent ha estat 'Cabernet', ja que només ha presentat un 25% de positius, qualificant la varietat com a menys susceptible, no com a molt sensible. Un altre estudi realitzat a la Universitat de Califòrnia (Varela *et al.*, 2001) coincideix amb el resultat de qualificar a la varietat 'Cabernet' com a menys sensible, així com també amb la classificació de 'Chardonnay' com a molt susceptible. Per altre banda l'estudi classifica les varietats 'Sauvignon Blanc' i 'Merlot' com a poc susceptibles, distant dels resultats obtinguts (75% en 'Merlot', varietat mitjanament susceptible), encara que la varietat 'Sauvignon Blanc' en el nostre estudi amb un dels peus (SO4) ha obtingut un 0% d'infecció, per la qual cosa, només amb aquest s'ha comportat com a tolerant, mentre que el comportament general és com a mitjanament susceptible.

Els resultats de Feil (2002) mostren que el cultivar 'Chardonnay' té una major incidència que 'Cabernet sauvignon', cosa que no succeeix en camp, però sí a les inoculacions dins hivernacle.

Establir una classificació de la resistència/tolerància per a les varietats de *Vitis vinifera* és un repte, ja que són termes relatius que depenen del conjunt de cultivars que s'avaluen en un determinat estudi (Rashed *et al.*, 2013), ja que es comparen uns amb els altres fent difícil una homogeneïtat dels resultats de diferents estudis. De la mateixa manera, existeixen nombrosos cultivars de vinya fent que sigui difícil comparar resultats ja que no tots els cultivars s'han assajat.

En aquest estudi es pot veure que el peu juga un paper dins el comportament de la varietat, encara que es necessari fer més incidència en aquesta variable, per tant, es tindria que realitzar un disseny experimental en el que totes les varietats s'assetgessin amb els mateixos peus, per tal de poder veure un efecte clar del peu en cada una de les varietats. S'estan investigant estratègies de control basades en la selecció de portaempelts que minimitzin el desenvolupament dels símptomes en les varietats (Wallis *et al.*, 2013), aconseguint, d'aquesta manera, utilitzar les varietats més demandades en viticultura i no aquelles més tolerants, que poden ser d'un menor atractiu vinícola.

5.2. Inoculacions en ametller

En quant als resultats de les inoculacions d'ametllers, segons els obtinguts en camp el mateix any, es pot veure que no coincideixen, ja que segons Juan (2018) les varietats 'Soleta', 'Penta' i 'Marinada' pertanyen al grup de varietats foranies no afectades (Taula 3), per tant, que no han mostrat símptomes en camp ni han donat PCRs positives, sent les úniques varietats amb resultats positius en hivernacle amb alguns dels peus estudiats. Tot i que si coincideixen resultats com la classificació de la varietat 'Vairo', que pertany al grup de varietats foranies no afectades. Encara que no és del tot comparable un estudi amb l'altre pels pocs resultats obtinguts.

Al contrari del que passa amb les varietats de vinya, que s'utilitzen moltes varietats similars a molts llocs diferents pels seus potencials vinícoles, és molt difícil trobar estudis varietals d'ametllers, però així i tot, la majoria d'estudis de *X. fastidiosa* s'han realitzat amb altres varietats d'ametllers, com per exemple el de Wilhelm *et al.* (2011) a Califòrnia, que va classificar les varietats 'Buttle' i 'Carmel' com a resistents i 'Peerles' i 'Sonora' com a susceptibles, varietats que no s'utilitzen a la nostra zona. Per la qual cosa, ha estat difícil comparar els resultats obtinguts.

Cao *et al.* (2011), a Califòrnia, va comparar si la data de la inoculació influïa en la manifestació dels símptomes en ametller, es van comparar dates des del mes de maig fins al mes d'octubre, els mesos amb majors símptomes van ser els mesos de juny i juliol (sobretot juny), i els que menys, van ser les inoculacions fetes els mesos d'agost i d'octubre. En el nostre cas, la data de les inoculacions d'ametller pareix no influir en els resultats, ja que de les 4 varietats amb resultats positius 2 es van inocular a finals del mes de maig (25/05), amb les reinoculacions durant el mes de juny (18/06); i les altres 2 durant el mes de juny (18/06), amb les reinoculacions també durant aquest mes (29/06). L'edat de la planta tampoc pareix ser un factor d'importància, ja que els ametllers inoculats per maig eren ametllers de 2 anys, mentre que els inoculats per juny eren ametllers més joves, del mateix any.

Les mostres dels ametllers es van agafar a les 12 setmanes de les inoculacions, de la mateixa manera que la vinya. Tot i que la vinya necessita entre 60 i 80 dies (EPPO, 2019) o, més concretament, una mitja de 52 dies (EFSA, 2019) per manifestar símptomes; els ametllers necessiten uns 13 mesos (EPPO, 2019) o 105 dies en el cas de la subespècie *fastidiosa* i 116 dies, en el cas de *múltiplex* (EFSA, 2019), és a dir, necessita com a mínim uns tres mesos i mig per poder manifestar símptomes, en lloc dels 84 dies que vàrem deixar nosaltres entre la primera inoculació i la recollida de mostres, pel que els 3 mesos de marge poden ser pocs per arribar als resultats esperats.

El mètode d'inoculació també pot ser un factor a tenir en compte, ja que pareix que la gran majoria de plantes no han adquirit el bacteri. Segons l'EPPO (2019) tot i que el mètode més utilitzat per a la inoculació de *Xylella fastidiosa* és l'emprat en aquest assaig, un altre dels mètodes convencionals és la inoculació a través de xeringa (xeringa de tuberculina d'1mL) amb la que s'infiltra gotes amb una concentració de 10^8 /mL. A cítrics també s'han utilitzat altres mètodes com per exemple aixecar una 'finestra' de teixit d'escorça tallant tangencialment cap a dalt amb una fulla de bisturí i aplicant 10-30 μ L de suspensió (10^8 /mL) davall de la 'finestra'; o com extirpar un tros de teixit d'escorça i col·locar-lo en un tub Eppendorf amb 500 μ L de suspensió bacteriana durant 2 hores, després desplaçar el tros de teixit i envoltar-ho amb cinta d'empelt, ambdós mètodes molt agressius que no simulen la infecció natural.

5.3. Empelts en ametller

Una de les conseqüències de que només un 15% dels arbres empeltats mostressin presència de *Xylella fastidiosa* donant positiu a PCR, podria ser l'edat de les fulles (EPPO, 2019) o que els brots joves agafats per empeltar no tinguessin el bacteri. Per tant, seria necessari tornar a agafar material vegetal en el moment més adequat de mostreig, per tant, esperant a que els brots presentessin fulles madures i, si es possible, amb símptomes.

A estudis con el de Mircetich *et al.* (1976), els empelts amb ALSD van tenir un 50% d'efectivitat, demostrant que les gemmes utilitzades que no mostraven símptomes, no transmetien el bacteri, a diferència del empelts de tija, que transmeten de manera més eficaç el bacteri. En el nostre assaig, el material utilitzat va donar positiu a les proves de PCR, però no tots els brots, i per tant, no totes les gemmes utilitzades, mostraven símptomes clars de ALSD, com es pot veure a la fotografia del material utilitzat (Figura 10). Per la qual cosa, es tindria que utilitzar gemmes de fulles amb símptomes clar de *Xylella fastidiosa* o també seria convenient provar si altres tipus d'empelts, més utilitzats en agricultura poden transmetre el bacteri de manera més eficaç.

6. CONCLUSIONS

De l'assaig s'han obtingut les següent conclusions:

- S'han obtingut aïllaments de les tres illes, la major part de Mallorca de la subespècie *fastidiosa*.
- Els resultats no varien molt en condicions controlades d'hivernacle i en condicions de camp en vinya.
- Les varietats més susceptibles de vinya tant con condicions d'hivernacle com en condicions de camp són 'Gorgollassa' i 'Viura'. Mentre que la varietat menys susceptible és 'Giró Ros'.
- El portaempelt de vinya que pareix conferir major susceptibilitat és el P1103.
- És molt difícil comparar resultats varietals d'ametller, ja que les varietats utilitzades en els nostres camps no s'utilitzen a la gran part de llocs. En aquest estudi els resultats són insuficients per a arribar a unes conclusions fiables en quant a susceptibilitat/tolerància de varietats, però pareix que la varietat que major susceptibilitat mostra és 'Penta'.
- No es pot arribar a unes conclusions en quant a quin portaempelt confereix major susceptibilitat/tolerància en quant a ametller, ja que no s'han obtingut els resultats esperats.
- Seria convenient provar altres mètodes d'inoculació en ametller, per a veure si l'eficàcia d'infecció augmenta.
- Es confirma la transmissió del bacteri mitjançant empelt a ametller, encara que en baix percentatge, per la qual cosa seria convenient provar si altres tipus d'empelts i amb material més afectat transmeten d'una millor manera el bacteri.

7. PUBLICACIONS I ALTRES COMUNICACIONS DERIVADES

Part dels treballs que aquí s'han presentat han contribuït a les següents publicacions científiques i altres comunicacions:

ARTÍCLES SCI:

Eduardo Moralejo, Margarita Gomila, **Marina Montesinos**, David Borràs, Aura Pascual, Alicia Nieto, Francesc Adrover, Pere A. Gost, Guillem Seguí, Antonio Busquets, José A. Jurado-Rivera, Bàrbara Quetglas, Juan de Dios García, Omar Beidas, Andreu Juan, María P. Velasco-Amo, Blanca B. Landa y Diego Olmo, 2020. Phylogenetic inference enables reconstruction of a long-overlooked outbreak of almond leaf scorch disease (*Xylella fastidiosa*) in Europe. *Commun Biol* 3, 560 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01284-7>

E. Moralejo, D. Borràs, M. Gomila, **M. Montesinos**, F. Adrover, A. Juan, A. Nieto, D. Olmo, G. Seguí, B. B. Landa 2019. Insights into the epidemiology of Pierce's Disease in vineyards of Mallorca, Spain. *Plant Pathology*. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13076>

CAPÍTUL DE LLIBRE:

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 2017. Cap. 12: *X. fastidiosa* en las Islas Baleares. En: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López (coords.) 2017 Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Ed. Cajamar Caja Rural. 319 pp.

CONGRESOS:

Moralejo E, Olmo D, M Gomila, Nieto A, **Montesinos M**, Borràs D, Andreu J, Landa B B. Rethinking the *Xylella fastidiosa* scenario in the Balearic Islands: what epidemiological, phylogenetic and dendrochronological data tell us. Comunicación oral. EFSA- Second European Conference on *Xylella fastidiosa* Ajaccio, Córcega 29 Octubre de 2019. Disponible online: <http://www.efsa.europa.eu/es/events/event/conference-xylella-fastidiosa-29-30-october-2019>

Marc, S., Nieto, A., Borràs, D., Adrover, F., Gost, P. A., **Montesinos, M.**, Moralejo, E., Landa, B. B., Beidas, O., Juan, A., Olmo, D. Improving Xylella sampling in Mallorca. Póster en EFSA-Second European Conference on Xylella fastidiosa Ajaccio, Córcega 29 Octubre de 2019.

Diego Olmo, Alicia Nieto, David Borràs, **Marina Montesinos**, Francesc Adrover, Alejandro Urbano, Aura Pascual, Eduardo Moralejo, Juan de Dios García, Omar Beidas, Andreu Juan. 2018. Panorama actual de *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares. Comunicación oral. Ponencia invitada. XIX Congreso de la sociedad española de fitopatología. Toledo, 8 a 10 de Octubre de 2018. Revista Fitopatología, Núm. 2.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALDRICH, J. H., GOULD, A. B. I MARTIN, F. G. (1992). Distribution of *Xylella fastidiosa* within roots of peach. *Plant Disease*, **76**: 885-888.
- 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.
- ALMEIDA, R. P. P. I NUNNEY, L. (2015). How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge?. *Plant Dis.* **99**: 1457-1467.
- ALMEIDA, R. P. P. I PURCELL, A. H. (2003). Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* Hemiptera: Cicadellidae. *J. Econ. Entomol.* **96**(2): 264-271.
- ALMEIDA, R. P. P., HASHIM, J. I PURCELL, A. H. (2005). Vector transmission of *Xylella fastidiosa* to dormant grape. *Plant Dis.* **89**(4): 419-424.
- ALMEIDA, R. P. P., NASCIMENTO, F. E., CHAU, J., PRADO, S. S., TSAI, C. W., LOPES, S. A. I LOPES, J. R. (2008). Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3690-3701.
- ALMEIDA, R. P. P., PEREIRA, E. F., PURCELL, A. H. I LOPES, J. R. S. (2001). Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Disease*, **85**: 382-386.
- ALMEIDA, S., VETTORE, A. L., ZAGO, M. A., ZATZ, M., MEIDANIS, J., I SETUBAL, J. C. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, **406**: 151-157.
- ANDERSEN, P. C. I BRODBECK, B. V. (1989). Diurnal and temporal changes in the chemical profile of xylem exudate from *Vitis rotundifolia*. *Physiol. Plant.* **75**(1): 63-70.
- ANDERSEN, P. C., BRODBECK, B. V. I 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): 149-159.
- CAO, T., CONNELL, J. H., WILHELM, M. I KIRKPATRICK, B., C. (2011). Influence of inoculation date on the colonization of *Xylella fastidiosa* and the persistence of almond leaf scorch disease among almond cultivars. *Plant Dis.* **95**:158-165.
- CHANG, C. J. I WALKER, J. T. (1988). Bacterial leaf scorch of northern red oak: Isolation, cultivation, and pathogenicity of xylem-limited bacterium. *Plant Dis.* **72**: 730-733.
- CHATTERJEE, S., ALMEIDA, R. P. P. I LINDOW, S. (2008). Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **46**: 243-271.
- CHEN, J., GROVES, R., CIVEROLO, E. L., VIVEROS, M., FREEMAN, M. I ZHENG, Y. (2005). Two *Xylella fastidiosa* Genotypes Associated with Almond Leaf Scorch Disease on the Same Location in California. *Phytopathology Bacteriolog*, **95**(5): 708-714

- CHEN, J., LAMIKANRA, O., CHANG, C. J. I HOPKINS, L. (1995). Randomly amplifies polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce's Disease and Oak Leaf Scorch pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(5): 1688-1690.
- CHMIEL, S. M. I 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): 682-685.
- COLETTA-FILHO, H. D., FRANCISCO, C. S., LOPES, J. R., MULLER, C. I ALMEIDA, R. P. (2017). Homologous recombination and *Xylella fastidiosa* host-pathogen associations in South America. *Phytopathology*, 107: 305-312.
- COSTA, H. S., BLUA, M. S., BETHK, J. A. I REDAK, R. A. (2000). Transmission of *Xylella fastidiosa* to Oleander by the glassywinged sharpshooter, *Homalodisca coagulate*. *Hortscience*, 35(7): 1265-1267.
- 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.
- DAUGHERTY, M. P., LOPES, J. I ALMEIDA, R. P. P. (2010). Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. *Ecol. Entomol.* 35(3): 360-366.
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H. I THOMPSON, S. V. (1978). Pierce's disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium. *Science*, 199: 75-77.
- DAVIS, M. J.; PURCELL, A. H. I THOMPSON, S. V. (1980). Isolation medium for the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology*, 70: 734-739.
- DELONG, D. M. I SEVERIN, H. H. P. (1950). Spittle-insect vectors of Pierce's disease virus. I. Characters, distribution and food plants. *Hilgardia*, 19(11): 357-380.
- DROSOPOULOS, S. I 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.
- DURÁN, J. M.; GÓNZALEZ, M. I.; SÁNCHEZ, A. M.; SERRANO, A. (2018). Observaciones sobre *Philaenus spumarius*, vector potencial de *Xylella fastidiosa*, en el olivar de Sevilla. *Phytoma*, 304: 40-46.
- EFSA (2020): « UPDATE OF THE XYLELLA SPP. HOST PLANT DATABASE»; EFSA JOURNAL 2020;18(4): 6114.
- ELBEAINO, T., VALENTINI, F., ABOU KUBAA, R., MOUBARAK, P., YASEEN, T. I DIGIARO, M. (2014). Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by "olive quick decline syndrome" in Italy. *Phytopathol. Medit.* 53: 533-542.
- EPPO, 2019. Dignostics PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. *Bulletin EPPO*, 49 (2): 175-227.

- FEIL, H., AND PURCELL, A. H. (2001). Temperature-Dependent Growth and Survival of *Xylella fastidiosa* in Vitro and in Potted Grapevines. *Plant Dis.* **85**:1230-1234
- FEIL, H. (2002). Effect of sub-freezing temperature on the survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in plants. In *Ph.D. dissertation*, University of California, Berkeley.
- FRANCIS, M., CIVEROLO, E. L., AND BRUENING, G. (2008). Improved bioassay of *Xylella fastidiosa* strains using *Nicotiana tabacum* cultivar SR1. *Plant Dis.* **92**: 14-20.
- FRANCIS M, LIN H, CABRERA-LA ROSA J, DODDAPANENI H & CIVEROLO EL (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* **115**: 203–213.
- FREITAG, J. H. (1951). Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathology*, **41**(10): 920-934.
- GARDNER, M. W. I 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., I HOPKINS, D. L. (1988). Pierce's disease. In *Compendium of Grape Diseases*. R.C. Pearson and A.C. Goheen (Eds.), pp. 44–45. *American Phytopathological Society Press*, St. Paul.
- GÓMEZ, J. I FELIPE, A. (1987). Reinjerto de almendros. *J. T. E. A.* **69**: 42-46.
- GOMILA, M., MORALEJO, E., BUSQUETS, A. (2019). Draft genome resources of two strains of *Xylella fastidiosa* XYL1732/17 and XYL2055/17 isolated from Mallorca vineyards. *Phytopathology* **109**, 222–4.
- HALKKA, O. I HALKKA, L. (1990). Population genetics of the polymorphic meadow spittlebug, *Philaenus spumarius* L. *Evol. Biol.* **24**: 149-141.
- HARPER SJ, WARD LI & CLOVER GRG (2010) Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* **100**: 1282–1288.
- HARTUNG, J. S., BERETTA, J., BRLANSKY, R. H., SPISSO, J. I LEE, R. (1994). Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **84**: 591-597.
- HENNEBERGER, T. S. M., STEVENSON, K. L., BRITTON, K. O. I CHANG, C. J. (2004). Distribution of *Xylella fastidiosa* in sycamore associated with low temperature and host resistance. *Plant Dis.* **88**: 951-958.
- HEWITT, W. B., FRAZIER, N. W. I FREITAG, J. H. (1949). Pierce's disease investigations. *Hilgardia.* **19**: 207-264.
- HILL, B. L. I PURCELL, A. H. (1995). Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* ,**85**(2): 209-212.

- HILL, B. L. I PURCELL, A. H. (1997). Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology*, **87**(12): 1197-1201.
- 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**: 691-699.
- HOPKINS, D. L. (1980). Use of the pin-prick inoculation technique to demonstrate variability in virulence of the Pierce's disease bacterium. *Proc. Vllth Int. Conf. Viruses Grapevine (ICVG)*. Canadà, Niagara Falls. pp. 177-180.
- HOPKINS, D. L., BISTLINE, F. W., RUSSO, L. W. I THOMPSON, C. M. (1991). Seasonal fluctuation in the occurrence of *Xylella fastidiosa* in root and stem extracts from citrus with blight. *Plant Dis.* **75**: 145-147.
- HOPKINS, D. L. I PURCELL, A. H. (2002). *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease* Vol. **86** No. 10 pp. 1056-1066
- HOPKINS, D. L. I 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**: 419-420.
- HORSFIELD, D. (1977). Relationships between feeding of *Philaenus spumarius* L. and the amino acid concentration in the xylem sap. *Ecol. Entomol.* **2**(4): 259-266.
- JANSE, J. D. I OBRADOVIC, A. (2010). *Xylella fastidiosa*: Its biology, diagnosis, control and risks. *J. Plant Pathol.* **92**: 35-48, *sup.* 1.
- JUAN, A. 2018. Situación actual y actuaciones frente a *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares. *Transferencia Tecnológica. Phytoma España*, **304**.
- KANDEL, P. P., ALMEIDA, R. P. P., COBINE, P. A. I DE LA FUENTE, L. (2017). Natural Competence rates are variable among *Xylella fastidiosa* strains and homologous recombination occurs in vitro between subspecies *fastidiosa* and múltiple. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **30**: 589-600.
- LANDA, B. B., MARCO-NOALES, E. I MILAGROS, M. (coords.) (2017). Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. *Ed. Cajamar Caja Rural*.
- LEGENDRE, B. S., MISSISSIPI, S., OLIVER, V., MOREL, E., CROUZILLAT, D., DURAND, K., PORTIER, P., POLIAKOFF, F. I 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. Itàlia, Gallipoli-Locorotondo, pp. 27-28.
- LI, Y., HAO, G., GALVANI, C. D., MENG, Y., DE LA FUENTE, L., HOCH, H. C. I BURR, T. J. (2007). Type I and type II pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation, and cell-wall aggregation. *Microbiology* **153**: 719-726.

- LI, W., TEIXERA, D. C., HARTUNG, J. S., HUANG, Q., DUAN, Y. I ZHOU, L. (2013). Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Journal of Microbiological Methods* **92**: 79-89.
- LOCONSOLE, G., BOSCIA, D., PALMISANO, F., SAVINO, V., POTERE, O., MARTELLI, G. P. I 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**: 34-38.
- LÓPEZ, M. M., LANDA, B. B. I MARCO-NOALES, E. (2017). Métodos de inspección, diagnóstico y detección. A: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López (coords.) 2017 Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Ed. Cajamar Caja Rural, **5**: 95.
- MCÉLRONE, A., SHERALD, J. L. I FORSETH, I. N. (2001). Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. *Plant Dis.* **85**: 1160-1164.
- MADDEN, L. V. I HUGHES, G. (1995). Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. *Annual Review of Phytopathology* **33**, 529–64.
- MARCO-NOALES, E., LANDA, B. B. I LÓPEZ, M. M. (2017). *Xylella fastidiosa* y las enfermedades que causa. Un problema global. A: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López (coords.) 2017 Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Ed. Cajamar Caja Rural, **1**: 19.
- Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació (2019). [En línia] <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/xylella-fastidiosa/> [Consulta 07 de Maig de 2019].
- MIRANDA, M. A., A. MARQUÉS, T. SUREDA, A. AMORE, C. PAREDES-ESQUIVEL, M. LEZA, O. BEIDAS, D. OLMO, M. MORENTE, A. FERERES, AND A. JUAN. (2017). Seasonal pattern , hosts and abundance of the potential vectors of *Xylella fastidiosa* in Mallorca (Balearic Islands , Spain), pp. 53–54. *In Eur. Conf. Xylella Fastidiosa Find. Answers to a Glob. Probl.*
- MIRCETICH, S. M., LOWE, S. K., MOLLER, W. J. I NYLAND, G. (1976). Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology*, **66**: 17-24.
- MITTLER, T. E. (1967). Water tension in plants. An entomological approach. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **60**(5): 1074-1076.
- MOLLER, W. J., SANBORN, R. R., MIRCETICH, S. M., WILLIAMS, H. E. I BEUTEL, J. A. (1974). A newly recognized leaf scorch disease of almond. *Plant Dis. Rep.* **58**: 99-101.
- MORENTE, M. I FERERES, A. (2017). *Xylella fastidiosa* y las enfermedades que causa. Un problema global. A: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López (coords.) 2017 Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Ed. Cajamar Caja Rural, **4**: 73.
- NUNNEY, L., SCHUENZEL, E. L., SCALLY, M., BROMLEY, R. E. I STOUTHAMER, R. (2014). Large-scale intersubspecific recombination in the plantpathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 3025-33.

- OLMO, D., NIETO, A., BORRÀS, D., MONTESINOS, M., ADROVER, F., URBANO, A., PASCUAL, A., MORALEJO, E., GARCÍA, J. D., BEIDAS, O., I JUAN, A. (2017). *X. fastidiosa* en las Islas Baleares. A: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López (coords.) 2017 Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Ed. Cajamar Caja Rural, **12**: 319.
- OSSIANNILSON, F. (1981). The Auchenorrhyncha Homoptera of Fennoscandia and Denmark. Part 2: *The Families Cicadidae, Cercopidae, Membracidae, and Cicadellidae Excl. Deltocephalinae*, **7**(2): 223-593.
- PIERCE, N. B. (1892). The California vine disease. A preliminary report of investigations. U.S. Department of Agriculture. Division of vegetable pathology. Bulletin No. **2**. Washington, U.S. 222 pp.
- PURCELL, A. H. (1977). Cold therapy of Pierce's disease of grapevines. *Plant Dis. Rep.* **61**: 514-518.
- PURCELL, A. H. (1989). Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. A Harrys F. K., ed.: *Advances in disease vector research*. Springer, New York; pp. 243-266.
- PURCELL, A. H. (2013). Paradigms: Examples from the Bacterium *Xylella fastidiosa*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **51**: 339-356.
- PURCELL, A. H. I FINLAY, A. (1979). Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathology*, **69**(4): 393-395.
- PURCELL, A. H., FINLAY, A. H. I MCLEAN, D. L. (1979). Pierce's disease bacterium: mechanism of transmission by leafhopper vectors. *Science*, **206**(4420): 839-841.
- RASHED, A., KWAN, J., BARAFF, B. (2013). Relative susceptibility of *Vitis vinifera* cultivars to vector-borne *Xylella fastidiosa* through time. PLoS ONE **8**, e55326.
- REDAK, R. A., PURCELL, A. H., LOPES, J. R. S., BLUA, M. J., MIZELL III, R. F. I 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): 243-270.
- RETCHLESS, A. C., LABROUSSAA, F., SHAPIRO, L., STENGER, D. C., LINDOW, S. E. I ALMEIDA, R. P. P. (2014). Genomic Insights into *Xylella fastidiosa* interactions with plant and insect hosts. Lichens-Park, A. I Kole, C., eds. *Genomics of plant-associated bacteria*. Berlin, Heidelberg. Springer: 177-202.
- SADDLER, G. S. I BRADBURY, J. F. (2015). *Xylella*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: 1-10.
- SALAZAR, D. I LÓPEZ-CORTÉS, I. (2018). *Xylella fastidiosa* en viñedo: cómo identificarla y métodos de control. *La semana vitivinícola*, **3514**(324).
- SANDERLIN, R. S. (2017). Host Specificity of Pecan Strains of *Xylella fastidiosa* subs. *Multiplex*. *Plant Disease*, **101**: 144-750.
- SAPONARI, M., BOSCIA, D., ALTAMURA, G., D'ATTOMA, G., CAVALIERI, V., ZICCA, S., MORELLI, M., TAVACO, D., LOCONSOLE, G., SUSCA, L., POTERE, O., SAVINO, V., MARTELLI, G. P., PALMISANO, F.,

- DONGIOVANI, C., SAPONARI, A., FUMAROLA, G. I DI CAROLO, M. (2016). Pilot project on *Xylella fastidiosa* to reduce risk assessment uncertainties. *Institute for Sustainable Plant Protection*, Nation Research. Council of Italy, CNR.
- SAPONARI, M., BOSCIA, D., NIGRO, F. I MARTELLI, G. P. (2013). Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olivet trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). *Journal of Plant Pathology*, **95**: 668.
- SEVERIN, H. H. P. (1949). Transmission of the virus of Pierce's disease of grapevines by leafhoppers. *Hilgardia*, **19**(6): 190-202.
- SCHAAD, N. W., POSTNIKOVA, E., LACY, G., FATMI, M. I 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**: 290-300.
- SCHUENZEL, E., SCALLY, M., STOUTHAMER, R. I 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**: 3832-3839.
- SHERDALS, J. L. I LEI, J. D. (1991). Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees. *Plant Disease*. **75**: 200-203.
- STEVENSON, J. F., MATTHEWS, M. A. I ROST, T. L. (2005). The developmental anatomy of green islands and matchsticks as symptoms of Pierce's disease of grapevines. *Plant Dis.* **89**: 543-548.
- STEWART, A. J. A. I 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**: 69-89.
- SU, C., CHANG, C. J., CHANG, C., SHIH, H., TZENG, K., JAN, F., KAO, C., I DENG, W. (2013). Pierce's Disease of Grapevines in Taiwan: Isolation, Cultivation and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *J Phytopathol*, **161**: 389-396.
- SU, C. C., DENG, W. L., JAN, F. J., CHANG, C. J., HUANG, H., SHIH, H. T., I CHEN, J. (2016). *Xylella taiwanensis* sp. nov., causing pear leaf scorch disease. *Int. J. Syst. Microbiol.* **66**(11): 4766-4771.
- THOMPSON, V. (1994). Spittlebug indicators of nitrogen-fixing plants. *Ecol. Entomol.* **19**(4): 391-398.
- THORNE, E. T., STEVENSON, J. F., ROST, T. L., LABAVITCH, J. M. I MATTHEWS, M. A. (2006). Pierce's Disease symptoms: Comparasion with Symptoms of Water Deficit and the impact of Water Deficits. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**:1
- VALÉRIO, J. R., CARDONA MEJÍA, C., PECK, D. C., SOTELO, G. I KELEMU, S. (2001). Spittlebugs: Bioecology, host plant resistance and advances in IPM. *An 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.

- VARELA, L. G., SMITH, R. J. i PHILLIPS, P. A. (2001). Pierce's Disease. Symptoms of Pierce's Disease. Grapevine susceptibility.
- WALLIS, C. M., i CHEN, J. (2012). Grapevine phenolic compounds in xylem sap and tissues are significantly altered during infection by *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **102**(9): 816-26.
- WALLIS, C. M., WALLINGFORD, A. K., CHEN, J. (2013). Grapevine rootstock effects on scion sap phenolic levels, resistance to *Xylella fastidiosa* infection, and progression of Pierce's disease. *Frontiers in Plant Science* **4**, 502.
- WEAVER, C. i KING, D. (1954). Meadow spittlebug, *Philaenus leucophthalmus* L. Ohio Agricultural Experiment Station. *Research bulletin*, **741**: 1-99.
- WELLS, J. M., RAJU, B. C., NYLAND, G. i LOWE, S. K. (1981). Medium for isolation and growth of bacteria associated with Plum leaf scald and Phony peach diseases. *Applied Environmental Microbiology*. **42**: 357-363.
- WELLS, J. M., RAJU, B. C., HUNG, H. Y., WEISBURG, W. G., MANDELCO-PAUL, L. i 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**: 136-143.
- WEST, J. i LEES, D. R. (1988). Temperature and egg development in the spittlebug *Philaenus spumarius* L. Homoptera: Aphrophoridae. *Entomologist*, **107**(1): 46-51.
- WILHELM, M., BRODBECK, B. V., ANDERSEN, P. C., KASUN, G. W. i KIRKPATRICK, B. C. (2011). Analysis of xylem fluid components in almond cultivars differing to almond leaf scorch disease. *Plant. Dis.* **95**: 166-172.
- YUAN, X., MORANO, L., BROMLEY, R., SPRING-PEARSON, S., STOUTHAMER, R. i NUNNEY, L. (2010). Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology*, **100**: 601-611.