

Investigación europea sobre *Xylella fastidiosa*

Principales contribuciones de
los proyectos europeos
POnTE y XF-ACTORS
financiados en Horizonte 2020

Conferencia Europea sobre
Xylella fastidiosa y
reuniones anuales del proyecto

Palma de Mallorca (España)
13 al 16 de noviembre de 2017



European
Commission

Horizon 2020
European Union funding
for Research & Innovation



Este documento fue preparado con la contribución de los consorcios XF-ACTORS y PONTE.

“XF-ACTORS project has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement N. 727987”

www.xfactorsproject.eu

“PONTE project has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement N. 645636”

www.ponteproject.eu

Recopilación de contribuciones y preparación del texto original: **IPSP-CNR, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Sede di Bari (Italia)**

www.ipsp.cnr.it

Layout: **S-COM**

www.scom.eu

Cover: **NET7**

www.netseven.it

Traducción al español: **CITOLIVA, IFAPA, IAS-CSIC**

www.citoliva.es/

www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/web

www.ias.csic.es

Contactos:

info@xfactorsproject.eu

communication@xfactorsproject.eu

info@ponteproject.eu

Mayo, 2018

Contenido

Introducción	5
Avances en la comprensión sobre la genética y la genómica de <i>Xylella fastidiosa</i>	7
Biología de <i>Xylella fastidiosa</i> : patogenicidad e interacciones con el huésped	10
Insectos vectores de <i>Xylella fastidiosa</i>	13
Control de la enfermedad en las plantas huéspedes	17
Diagnósticos y herramientas para la detección temprana	21
Dinámica de enfermedades, modelización y evaluación del riesgo de plagas	23
Comentarios de las entidades interesadas sobre los programas de investigación sobre <i>Xylella fastidiosa</i>	26
Observaciones finales generales	27

Introducción

Del 13 al 15 de noviembre de 2017 tuvo lugar en Palma de Mallorca, España, una conferencia científica internacional acerca de las investigaciones en curso sobre *Xylella fastidiosa*. La conferencia fue organizada conjuntamente por la EFSA, la Universidad de las Islas Baleares, la red Euphresco de coordinación y financiación de investigación fitosanitaria, los proyectos europeos POnTE y XF-ACTORS financiados por Horizonte 2020 y la Dirección General de Investigación e Innovación de la Comisión Europea (DG RTD).

La conferencia se centró en los resultados de los programas de investigación europeos actualmente en marcha sobre *X. fastidiosa*

con el objeto de difundir los últimos avances científicos y fomentar el diálogo, las interacciones y la colaboración entre los grupos de investigación que trabajan en esta amenaza emergente para la salud de las plantas.

Las conferencias magistrales fueron a cargo de expertos americanos que presentaron sus conocimientos y experiencia sobre el patógeno, los vectores y las estrategias de mitigación de la enfermedad, en apoyo de los esfuerzos en curso para controlar el brote europeo de *X. fastidiosa*.

A la conferencia asistieron más de 260 participantes de 20 países miembros y de 14 países no pertenecientes a la UE



(Europa; Europa del Este; Norte de África; Norte, Centro y Sudamérica; Australia y Nueva Zelanda).

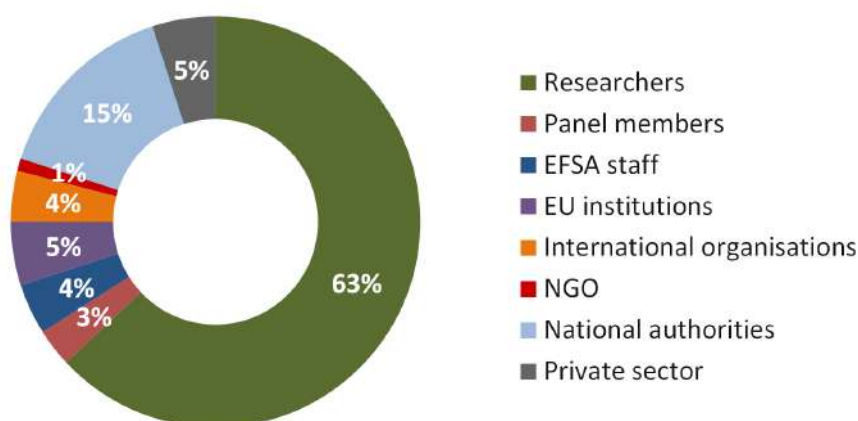
Los 3 días de conferencia se organizaron en 8 sesiones cubriendo todos los aspectos del patógeno, incluyendo las interacciones con sus vectores y hospedadores, diagnóstico y detección temprana, y patología, desde la modelización de la dinámica de la enfermedad y la evaluación de riesgos hasta herramientas para la gestión y el análisis del impacto socioeconómico.

Los proyectos de investigación H2020, POnTE y XF-ACTORS, contribuyeron con más del 70% del contenido del programa científico con actividades y resultados obtenidos por estos dos consorcios de investigación de la UE.



La conferencia fue seguida por la reunión anual conjunta de ambos proyectos H2020 (15-16 de noviembre de 2017) y contó con la participación de los miembros de cada proyecto, las partes interesadas que los respaldan y los observadores externos.

Durante la reunión interna de 2 días se presentaron informes breves de cada paquete de trabajo para describir los experimentos en curso y compartir resultados preliminares no presentados en la conferencia y que abordaron la implementación del plan de trabajo de ambos proyectos.



Las contribuciones clave de los consorcios POnTE y XF-ACTORS se resumen a continuación.

Avances en la comprensión sobre la genética y la genómica de *Xylella fastidiosa*

Los estudios genéticos son fundamentales para comprender la epidemiología de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa*. Estos datos ayudan a identificar los medios de propagación del patógeno a través del ambiente y el paisaje; proporcionan una visión de la adaptación al clima o al hospedador y su historia evolutiva; identifican genotipos y sus rutas de diseminación; y proporcionan información sobre la biología de las diferentes cepas.

Los equipos de investigación de ambos consorcios han contribuido al desarrollo del mayor conjunto de datos mundiales de secuencias genómicas y datos genéticos funcionales de *Xylella* para apoyar los estudios epidemiológicos de las enfermedades y la biología de las cepas de la UE.

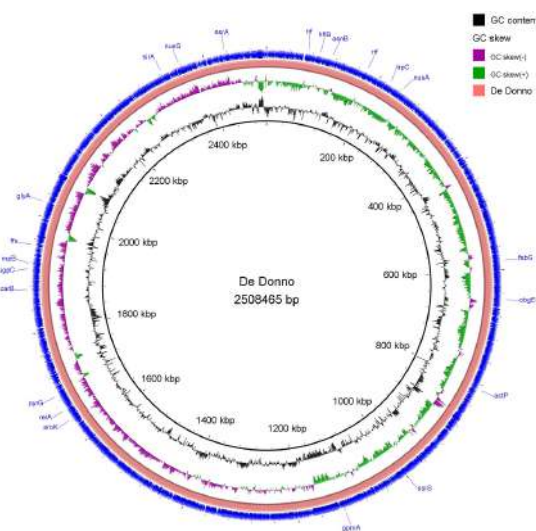
El Departamento de Ciencias Ambientales, Política y Gestión de la Universidad de California, Berkeley (EE. UU.) está coordinando un gran proyecto de secuenciación de nueva generación (NGS), obteniendo y procesando más de 200 aislados de *X. fastidiosa* de diferentes orígenes (California, Italia, Brasil, Costa Rica y España).

Se han desarrollado herramientas informáticas específicas para poder analizar rápidamente el gran conjunto de datos de secuencias en bruto y extraer información genética y epidemiológica

útil.

Los resultados preliminares del proyecto han avanzado en el conocimiento sobre la diversidad genética de *X. fastidiosa* en todo el mundo y la tecnología/metodología para explorar su diversidad. Los siguientes puntos resumen los principales logros presentados en la conferencia:

- Optimización e integración de diferentes herramientas bioinformáticas que dieron como resultado **el primer genoma completo de un aislado europeo de *X. fastidiosa***, la cepa “De Donno”, procedente del sur de Italia y asociada a la grave epidemia en olivo.



- Se demostró que el análisis de secuenciación del genoma completo basado en **polimorfismos de nucleótido único** (SNP) es una alternativa valiosa al análisis de microsatélites (SSR) o tipificación multilocus de secuencias

(MLST) con **el fin de identificar** cepas de *X. fastidiosa* con una resolución genética con profundidad necesaria para explorar la **variabilidad genética** en estudios epidemiológicos.

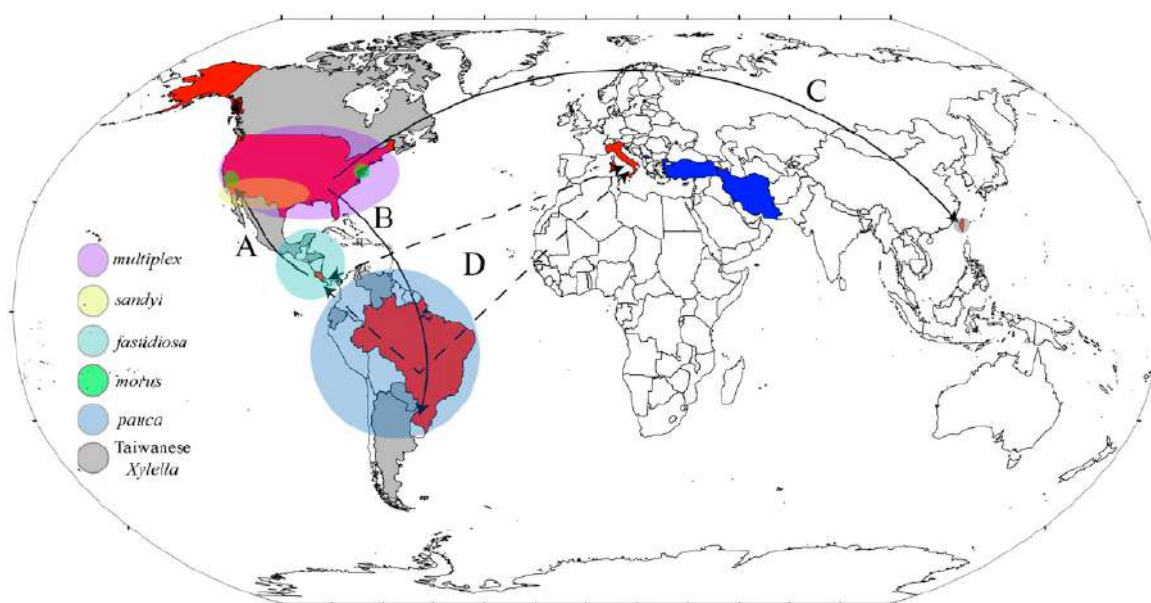
- Herramientas bioinformáticas y estadísticas específicas que han permitido llevar a acabo análisis filogenéticos comparativos de gran valor para poder estimar la fecha de divergencia putativa (en aproximadamente 35 - 50 años) entre las cepas predominantes detectadas en Francia y las pertenecientes al mismo tipo de secuencia (ST) en los EE. UU. (es decir, ST6 y ST7, pertenecientes a la subespecie *multiplex*).

- Utilizando los enfoques antes mencionados, se encontró **un linaje común** entre los aislados de Costa Rica ST53 y la cepa “De Donno”, apoyando así la hipótesis sobre el origen centroamericano del aislado italiano. De hecho, la falta de estructura espacial (diferenciación geográfica) que se ha

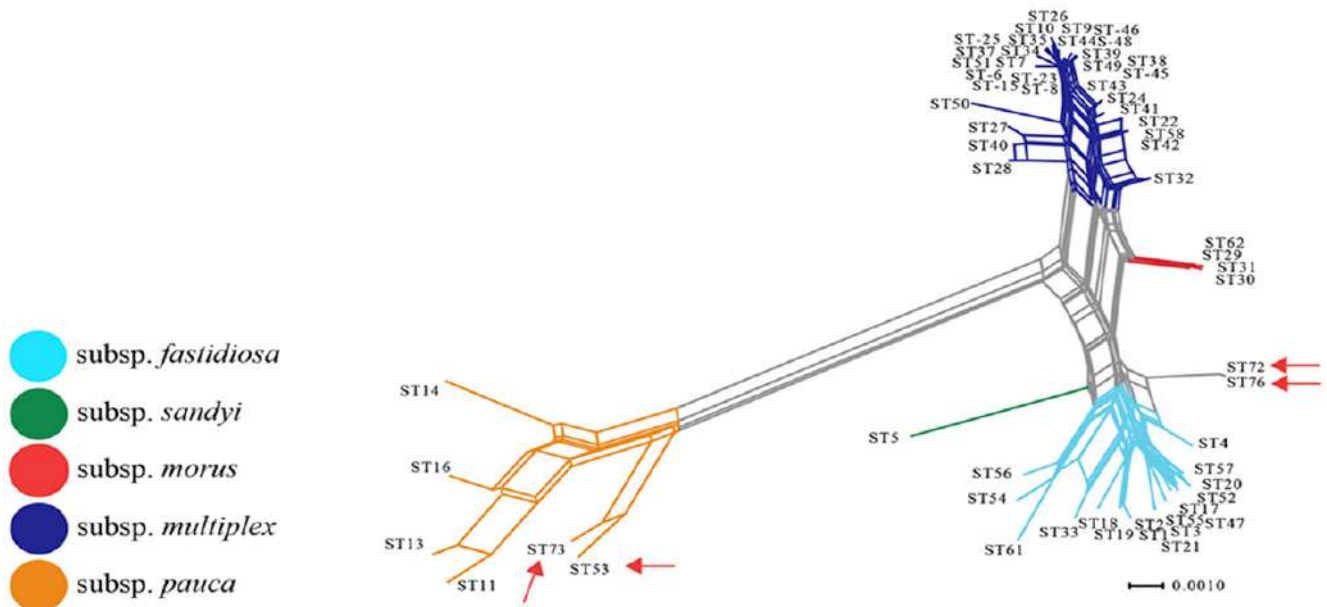
detectado en la población que causa la epidemia en olivos en el sur de Italia, lo que sugiere que está asociado con **una introducción única y reciente**.

- El enfoque MLST se utilizó para tipificar las cepas detectadas en los brotes surgidos más recientemente en Córcega y en el territorio continental de Francia, y en las Islas Baleares y la Península Ibérica. En general, los resultados revelaron la presencia en la UE de **aislados de las subespecies *pauca*, *fastidiosa* y *multiplex***, lo que indica una gran variabilidad genética entre los aislados detectados en Europa y sugiere que se han producido varias introducciones independientes.

Más importante aún, varias cepas detectadas en la UE representan un genotipo no descrito hasta ahora, un nuevo tipo de secuencia, lo que indica que el conocimiento actual sobre la genética de este patógeno aún está lejos de ser explorado completamente y que el patógeno está evolucionando.



- La tipificación de los aislados de la UE por MLST se logró rápidamente mediante el uso de ADN vegetal (dado que la situación más común es la presencia de infecciones causadas por una sola cepa), es decir, sin aislamiento y cultivo previos, produciendo resultados reproducibles en la mayoría de las muestras analizadas, con algunas excepciones relacionadas con matrices particulares de plantas ricas en inhibidores de PCR o que albergan poblaciones bacterianas bajas.



Biología de *Xylella fastidiosa*: patogenicidad e interacciones con el huésped

Las investigaciones biológicas y moleculares de las interacciones patógeno-hospedador incrementan nuestra comprensión de los mecanismos y determinantes implicados en la especificidad/adaptación al huésped, la patogenicidad y las respuestas a las infecciones causadas por cepas de *Xylella* genéticamente distintas.

Teniendo en cuenta que los genotipos estrechamente relacionados pueden variar drásticamente en su rango de huéspedes, el conocimiento de las características biológicas y epidemiológicas específicas de las cepas de la UE es una tarea importante de los programas de investigación en curso que conducirán a una mejor mitigación de las enfermedades causadas por *Xylella* y limitarán la propagación del patógeno.

Como tal, la reciente aparición de varios brotes en el territorio de la UE plantea desafíos y subraya la necesidad de estudios para respaldar la evaluación del riesgo de plagas en relación con las diferentes cepas detectadas.

La lista de hospedantes susceptibles a las cepas de la UE se actualiza continuamente sobre la base de los programas oficiales de vigilancia en los Estados miembros, respaldada por las actividades de investigación en curso centradas principalmente en la tipificación de las cepas (<http://bit.ly/2oGHEq9>). Esta información también forma parte de la implementación de la base de datos sobre hospedadores de *X. fastidiosa* en todo el mundo mantenida por la EFSA (<http://bit.ly/2D2EFO5>).



[Commission database of host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* in the Union territory - Update 10](#)



[Update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*](#)

Hasta ahora, el olivo es el principal cultivo afectado por *Xylella* en Europa y la cepa que causa esta grave epidemia en el sur de Italia parece ser la más virulenta de entre las cepas de la UE.

Los experimentos de inoculaciones artificiales se han implementado con éxito en Italia, Francia, Bélgica y Países Bajos.

Los problemas críticos son:

- (i) el requerimiento de grandes instalaciones de contención;
- (ii) el largo tiempo necesario para completar los experimentos (los estudios de patogenicidad son experimentos a largo plazo);
- (iii) las restricciones de cuarentena para poder manipular diferentes cepas del patógeno;
- (iv) la necesidad de cultivar y mantener en condiciones confinadas varias especies de plantas que requieren diferentes condiciones de cultivo.



Debido al reciente establecimiento de investigaciones sobre la biología de las cepas de la UE (algunas de las cuales nunca habían sido reportadas anteriormente), y la naturaleza compleja de este patógeno, aún no hay resultados disponibles de estudios a largo plazo.

Sin embargo, los experimentos en el sur de Italia han arrojado **importantes resultados preliminares sobre la patogenicidad de la cepa que causa la**

infección en el olivar y en las especies hospedadoras susceptibles:

- Las infecciones con inoculaciones artificiales (utilizando cultivos de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ST53) en plantas de olivo cultivadas en macetas reprodujeron síntomas típicos de desecación y decaimiento rápido, lo que confirma el papel patogénico de la bacteria en el **síndrome de decaimiento rápido del olivo (OQDS)**.
- Los intentos de inocular y establecer infecciones mecánicas en **cítricos y vid** resultaron fallidos, apoyando las observaciones de campo y los hallazgos que demostraron la **inmunidad de estas especies a la cepa italiana**.
- Las inoculaciones bajo condiciones controladas indicaron que la latencia de la infección **en el olivo podría durar más de 1 año**.
- Estudios experimentales de infectividad y muestreos en fincas de olivar encontraron **características de resistencia en la variedad Leccino a la cepa OQDS**, aunque los datos sobre la capacidad productiva a largo plazo aún no están disponibles. De hecho,



observaciones recientes de olivos en condiciones de campo identificaron a la **variedad FS-17®** como una selección de olivo **con posibles características de resistencia**.

- El procedimiento optimizado para inocular e infectar olivos ha permitido el inicio de **un gran programa de selección de variedades de olivo para resistencia a *X. fastidiosa***; hasta ahora, se han inoculado más de 70 selecciones en condiciones confinadas o en condiciones de campo expuestas a altas presiones de inóculo natural o han sido injertadas en árboles adultos infectados.

• Los perfiles del **transcriptoma** revelaron **expresiones génicas diferenciales** en variedades infectadas que mostraban diferentes fenotipos (**sintomáticos vs asintomáticos**), que se han asociado con respuestas de genes específicos y con el fenotipo del cultivar. Dichos hallazgos son consistentes con estudios

previos realizados en *Vitis vinifera* o en *Citrus spp.* y han motivado nuevas investigaciones para comprender el mecanismo molecular y los genes diana implicados en los fenómenos de resistencia en el olivo y acelerar el progreso de los programas de mejora y la selección asistida por marcadores.

Junto a este extenso programa de investigación en Italia, y la colaboración de varios socios de proyectos ubicados en otros países y el apoyo de partes interesadas locales, se han iniciado en paralelo experimentos de inoculaciones artificiales en Bélgica, Brasil y Francia para estudiar la biología de otras cepas de la UE y la susceptibilidad de diferentes especies de plantas/o variedades de éstas.

Los resultados definitivos se obtendrán en los próximos años del proyecto y se espera que contribuyan al conocimiento sobre la susceptibilidad del huésped y la influencia de las diferentes condiciones



de crecimiento para el desarrollo de las enfermedades. Los resultados preliminares de estos estudios se enumeran a continuación:

- Se han establecido combinaciones de diferentes condiciones de temperatura, disponibilidad de agua y de fertilización en Bélgica para evaluar los efectos sobre la colonización del hospedador y el desarrollo de la enfermedad en diferentes especies de plantas sometidas a infecciones artificiales con diferentes cepas de *X. fastidiosa*.
- Varias cepas (de café y cítricos) pertenecientes a la subespecie *pauca* (la misma subespecie a la que pertenece la cepa que causa la enfermedad epidémica en el olivo en el sur de Italia) se han utilizado para inocular diferentes variedades de olivo en Brasil y evaluar la susceptibilidad y la severidad de las infecciones en relación con la cepa bacteriana.

- Se han inoculado variedades relevantes de los principales cultivos (vid, olivo y cítricos) en Francia, con diferentes cepas.

- Con respecto a las plantas ornamentales, **las infecciones y los síntomas se reprodujeron con éxito en *Polygala myrtifolia*** transcurridos 6-8 meses después de las inoculaciones, utilizando tanto la cepa italiana (subespecie *pauca*) como una cepa francesa (subespecie *multiplax*). De forma similar, se desarrollaron exitosamente infecciones **y síntomas en plantas de adelfa** inoculadas con la cepa italiana aprox. 10 meses después de la inoculación.

- ***Lavandula stoechas*** ha sido seleccionada como una planta modelo para evaluar los efectos de la baja temperatura sobre la colonización de la planta y la multiplicación bacteriana, tras la inoculación con la cepa italiana.



Insectos vectores de *Xylella fastidiosa*

Se ha encontrado una gran diversidad de insectos chupadores y saltadores asociados con la propagación de *X. fastidiosa* en América. Puesto que es conocido que la transmisión de insectos de *X. fastidiosa* no es específica entre los que se alimentan de savia del xilema, todos estos insectos se consideran vectores potenciales en Europa, hasta que se demuestre lo contrario.

La relevancia y el papel de los vectores en la propagación de la bacteria depende no solo de la capacidad y eficiencia para transmitir el patógeno, sino también de las características ecológicas y de comportamiento, la afiliación del huésped, el movimiento estacional entre cultivos y especies silvestres, interacciones con otros componentes epidemiológicos, como las plantas reservorio, la dinámica de los patógenos en estos hospedadores,

el genotipo *X. fastidiosa* y las condiciones ambientales favorables.

En el marco de ambos proyectos, se realizan prospecciones y estudios faunísticos sobre la presencia, la afiliación del huésped y el ciclo de vida de los insectos que se alimentan de xilema en diferentes países, abarcando Europa meridional y central (Italia, España, Grecia, Alemania, Portugal, Serbia), así como en olivares en Brasil. El objetivo es adquirir datos sobre el riesgo potencial que presentan esas especies para el establecimiento y la dispersión de *X. fastidiosa*.

Estos estudios se benefician de la metodología y los procedimientos estandarizados desarrollados en un proyecto financiado por EFSA RC/EFSA/ALPHA/2015/01 - CT1, permitiendo un enfoque común para el muestreo y



*Aphrophora
alni*



*Aphrophora
salicina*



*Philaenus
spumarius*



*Neophilaenus
lineolatus*



*Cercopis
sanguinolenta*



*Cercopis
vulnerata*



*Cicadella
viridis*



*Graphocephala
fennahi*

el estudio de densidades y dinámicas de población con el objeto de reunir resultados armonizados y comparables.

En conjunto, los programas de investigación en curso contribuirán a maximizar el plan de trabajo experimental del proyecto “Recogida de datos e información en las Islas Baleares sobre biología de vectores y vectores potenciales de *Xylella fastidiosa*” (GP/EFSA / ALPHA / 2017/01), recientemente aprobado basado en los hallazgos de *X. fastidiosa* en las Islas Baleares.

Los primeros resultados de las prospecciones en curso indican:

- Diferencias regionales en la composición de la fauna de insectos chupadores de xilema.
- *Philaenus spumarius* es la especie dominante en Europa.
- Cicadellinae son poco frecuentes en las regiones del sur de la UE.
- Alta riqueza de especies en Brasil: 270 especies, de ellas 97 especies de chupadores del xilema.



Las prospecciones y la caracterización de los insectos que se alimentan de xilema se combinan con investigaciones centradas en la biología y la ecología de las especies de insectos ya identificadas como vector(es) en Europa, por lo que se dirigen principalmente a *P. spumarius*.

Un inconveniente experimental importante es la dificultad de criar *P. spumarius* para estudios de laboratorio, que requieren estudios que identifiquen las condiciones ambientales que regulan la oviposición, la diapausa del huevo y la eclosión.

Temas generales de investigación y resultados preliminares:

• Comunicación acústica y comportamiento de apareamiento

- *P. spumarius* emite señales de vibración para lograr el apareamiento.
- Los machos están activos desde el primer día que emergen como adultos, mientras que las hembras comienzan a llamar al menos 60 días después emerger (a partir de agosto).
- La llamada interactiva de machos y hembras permite a los machos localizar a las hembras para el apareamiento, la llamada femenina o su respuesta desencadena la emisión de la canción de cortejo masculino.

• Ecología química de *P. spumarius* y *Neophilaenus campestris*

- El bioensayo de olfatómetro para evaluar el atractivo de las plantas de olivo mostró: (i) las hembras jóvenes de *P. spumarius* tienen mayor capacidad

de respuesta que los machos jóvenes;
(ii) los insectos jóvenes son más receptivos que los más viejos;

(ii) presentan poca preferencia por una variedad de olivo entre las dos evaluadas.

- Se ha demostrado la respuesta electrofisiológica y conductual antenal positiva de *N. campestris* a volátiles del olivo; se realizarán nuevos ensayos en *P. spumarius*.

• Observaciones asistidas por EPG del comportamiento de alimentación de *P. spumarius*

- Se identificaron cinco formas de ondas eléctricas con la alimentación de *P. spumarius*.

- Están en curso estudios de descripción de parámetros y correlación.

- Se han realizado experimentos de EPG interrumpiendo la exploración del insecto con señales específicas en plantas infectadas, y se esperan resultados con respecto al período óptimo de acceso a la adquisición del patógeno (AAP).

• Evaluación del movimiento activo de *P. spumarius*

- Se han llevado a cabo experimentos repetidos de marcado-liberación-recaptura de insectos en dos áreas ecológicas diferentes y durante dos estaciones de cultivo consecutivas mostrando una capacidad de dispersión relativamente buena (es decir, hasta 120 m en 7-12 días), más alta en los olivares que en el prado.



• Evaluación del papel de los vectores candidatos:

Los adultos de *N. campestris*, *Philaenus italosignus*, *Cicada orni* y *Cicadella viridis* se han utilizado en pruebas experimentales de transmisión para evaluar su capacidad de adquirir y transmitir la bacteria, con transmisiones exitosas consistentes para *N. campestris* y *P. italosignus*, confirmando que son vectores competentes de la cepa de *X. fastidiosa* asociada a la epidemia en el sur de Italia. En contraste, hasta ahora se han obtenido resultados negativos con *C. orni*, y aún no hay datos disponibles para *C. viridis*.



- **Estudio piloto en Córcega para evaluar la presencia de *P. spumarius* infectados:**

- Usando una nueva PCR-MLST anidada, se logró la identificación simultánea de insectos infectados y la tipificación de la(s) cepa(s) de *X. fastidiosa*.

- Este nuevo enfoque presentó mayor sensibilidad en comparación con qPCR.

- Identificación de insectos infectados en áreas donde todavía no se detectó *X. fastidiosa* en plantas hospedadoras.



- **Se ha organizado un trabajo de colaboración sobre análisis de microbiomas y endosimbiontes**, y se espera que existan resultados para el próximo período de informe.

- **Las especies de depredadores potenciales** (*Zelus renardii*, *Synema globosum*, *Araniella cucurbitina*) se han ensayado con resultados alentadores a nivel de laboratorio.

El conocimiento y el progreso de la investigación sobre las actividades antes mencionadas tiene como objetivo desarrollar estrategias sostenibles para el control de las poblaciones de vectores.

Una vez validada, la información obtenida en estas actividades debería conducir a nuevas herramientas para el control de vectores.

Estos incluyen pero no se limitan a:

- (i) **el uso de vibraciones para apoyar estrategias de control sostenibles** (es decir, interrupción de apareamiento o técnicas de señuelo y muerte);

- (ii) **señales químicas y volátiles de plantas** para mejorar **las capturas de trampas**;

- (iii) uso de **bacterias endosimbióticas** como control biológico potencial.

Además, se han iniciado ensayos de campo para probar diferentes enfoques, principalmente dirigidos al control de *P. spumarius*; estos incluyen:

- (i) uso de plantas no hospedadoras como cultivos de cobertura en olivares;

- (ii) uso de árboles trampa en los bordes;

- (iii) prueba de diferentes formulaciones para aplicaciones bajo manejo integrado o régimen de agricultura ecológica.

Con respecto a los insecticidas para controlar *P. spumarius*, **los piretroides y los neonicotinoides** fueron, con mucho, los mejores entre las diferentes formulaciones ensayadas en términos de **eficacia y persistencia**. Estos aspectos, junto con la necesidad de definir el número y el tiempo de las aplicaciones y el desarrollo de enfoques



integrados para el manejo de plagas, han puesto de manifiesto la necesidad de **mucha más investigación sobre nuevas formulaciones y ensayos para lograr un control del vector más sostenible y efectivo.**

Control de la enfermedad en las plantas huéspedes

La búsqueda de **caracteres de resistencia en el germoplasma de olivo** se considera una de las áreas de investigación más prometedoras que a medio plazo dará lugar a una estrategia para controlar la propagación epidémica de *X. fastidiosa* en el sur de Italia y apoyará, a largo plazo, actividades de mejora.

Paralelamente, también se están explorando diferentes enfoques de investigación que apuntan hacia el desarrollo de intervenciones moleculares para restringir la multiplicación y el movimiento de la bacteria en las plantas huéspedes y contener el impacto de las infecciones.

Por otro lado, se han iniciado **experimentos para evaluar diferentes formulaciones / moléculas** y agentes de control, tales como **bacteriófagos, microorganismos endófitos antagonistas y competidores**. Sin embargo, estas actividades se encuentran en su mayoría en fase de prueba in vitro o, como en el caso de los bacteriófagos o endófitos antagonistas, en fase de aislar, seleccionar y caracterizar posibles microorganismos beneficiosos.

La falta de un modelo de planta-huésped adecuado que desarrolle rápidamente síntomas de enfermedad al ser infectado artificialmente, es una **limitación importante** para poder



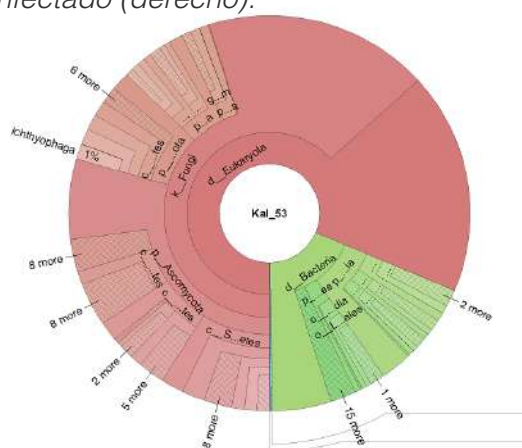
evaluar la eficacia de cualquiera de las estrategias de control bajo investigación, lo que a su vez requiere de esfuerzos a largo plazo y experimentos de varios años de duración.

• Ensayos de formulaciones y péptidos antimicrobianos

En base a algunas investigaciones prometedoras realizadas en Brasil en cítricos durante los últimos 5 años sobre la Clorosis variegada de los cítricos causada por *X. fastidiosa* subespecie *pauca*, en un olivar afectado por OQDS se inició un programa piloto de 2 años de duración con tratamientos con N-acetil cisteína (NAC), para su comparación con diferentes elicitores de factores de

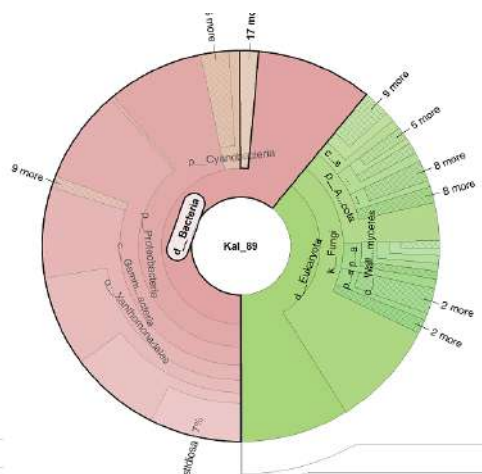
Ninguno de los elicitores probados produjo algún efecto positivo cuantificable en los árboles enfermos, ni redujeron el progreso de las nuevas infecciones en las plantaciones, mientras que se observó una leve atenuación de la severidad de los síntomas con el empleo de NAC aplicado con endoterapia o en combinación con la aplicación del suelo. Estos resultados alentadores han impulsado más experimentos de manejo integrado que están actualmente en marcha en el marco del proyecto H2020 POnTE.

Diagrama de Kona que representa los metagenomas de un olivo sano (izquierdo) e infectado (derecho).



- **Exploración del microbioma de los olivos**

Se han aislado y cultivado varios aislados de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Pantoea*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas* e *Methylobacterium spp.* y como tendencia general,



muestran **poblaciones mayores en árboles sanos** en comparación con árboles infectados.

En estudios previos en olivo se habían analizado las comunidades microbianas de raíz/suelo pero no las comunidades bacterianas que se encuentran exclusivamente en el tejido del xilema. Los datos recopilados de los análisis preliminares del conjunto de datos de WMGS han proporcionado una información importante sobre las comunidades microbianas asociadas a los tejidos del xilema de los olivos y sugirieron **una fuerte perturbación del microbioma en las variedades susceptibles e infectadas por *X. fastidiosa*** donde la bacteria **domina todo el nicho endofítico**.

Se están llevando a cabo análisis para determinar las correlaciones entre los datos moleculares (WMGS y 16S rDNA) y los resultados de los aislamientos cultivo-dependientes, lo que permitirá la descripción del microbioma del xilema de las plantas infectadas y seleccionar los endófitos candidatos para su estudio posterior en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Mientras tanto, se han iniciado experimentos utilizando **PsJN, la bacteria *Paraburkholderia phytofirmans***, en base a estudios desarrollados en California, que indican su posible papel de competencia con *X. fastidiosa* en vides afectadas por la enfermedad de Pierce.

Los datos sobre la colonización de olivo por *P. phytofirmans* aún no están

disponibles. Sin embargo, se logró con éxito la colonización endofítica de los tejidos vasculares en plantas de olivo cultivadas en macetas e inoculadas con la bacteria con el método de inyección.

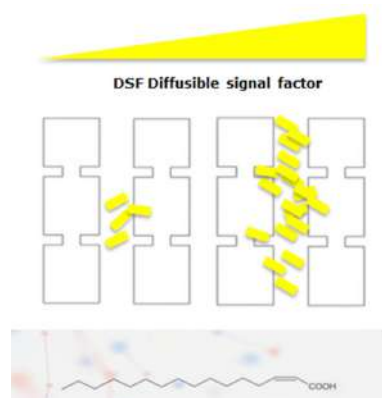
Por lo tanto, en base a estos resultados preliminares positivos, se ha planificado un programa coordinado de co-inoculaciones en plantas de olivo para la próxima estación de crecimiento.

• Estrategias de confusión del patógeno

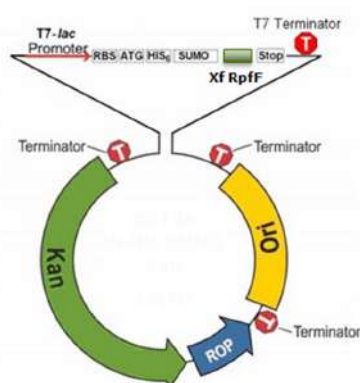
Esta tarea de investigación se refiere a la explotación de una estrategia de “confusión del patógeno”, que depende de la modulación de la acumulación del “factor de señalización difusible (DSF)”, un ácido graso sintetizado por el gen RpfF de *X. fastidiosa* involucrado en la autoinducción.

Los estudios iniciales están abordando la caracterización del DSF producido por la cepa específica asociada a la epidemia en el sur de Italia mediante análisis de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.

De hecho, un enfoque biotecnológico paralelo tiene como objetivo la



producción de DSF a través de un vector recombinante basado en virus de plantas y diseñado para contener y expresar transitoriamente *in planta* copias del gen Xf-RpfF. El resultado esperado es poder utilizar este enfoque para mitigar la virulencia de la bacteria en huéspedes susceptibles como las plantas de olivo.



- **Producción y propagación de material vegetal libre de *Xylella* mediante la implementación de un programa de certificación**

Esta tarea del proyecto se lleva a cabo mediante una cooperación entre investigadores y las partes interesadas. Los principales “actores” que contribuyen a esta tarea son las organizaciones y asociaciones que representan a los viveristas y/o están



a cargo de los controles e inspecciones fitosanitarias, bajo el paraguas y la supervisión de la EPPO. Las discusiones sobre el tema han comenzado dentro de un pequeño grupo de trabajo, que elaboró una propuesta preliminar para un “**Sistema Voluntario para Prevenir las Plagas (VSPP)**”.

El objetivo es proponer un sistema común de certificación de la UE y estándares de certificación, teniendo en cuenta el escenario emergente actual sobre *X. fastidiosa* en Europa.



Un comité internacional será designado formalmente para preparar los requisitos generales del proceso de certificación propuesto.

La red de expertos involucrados en esta tarea no se limita a los miembros del proyecto, sino que se han involucrado expertos externos (de diferentes países y que trabajan en diferentes cultivos / especies) para asegurar una alta convergencia y consenso sobre el resultado de esta tarea.

Diagnósticos y herramientas para la detección temprana

Una de las principales tareas de investigación dentro de ambos proyectos H2020 es promover, bajo la coordinación de la EPPO, el uso **de procedimientos comunes y armonizados de diagnóstico**, asegurando la disponibilidad de estándares de diagnóstico comunes para los laboratorios oficiales en los diferentes países.

Existen varios ensayos de diagnóstico disponibles en la literatura y muchos grupos de investigación han trabajado para la implementación de los procedimientos de extracción de ADN en plantas. De hecho, esto es un problema crítico, debido a la gran cantidad de plantas huéspedes potenciales que se analizarán.

Se han llevado a cabo un gran número de validaciones interlaboratorio para evaluar la competencia de las diferentes pruebas de diagnóstico y la comparación de los resultados **entre diferentes laboratorios**.

Como resultado de ello se han recomendado un panel de ensayos que se utilizarán según las áreas objetivo (es decir, en áreas demarcadas vs no demarcadas), que son parte de los estándares de la EPPO (bit.ly/2FuLL34), así como parte de la base de datos oficial de pruebas de validación de la Comisión (bit.ly/2FANuUJ).



Además de los trabajos de colaboración para la armonización y validación de procedimientos de diagnóstico, se llevan a cabo **trabajos continuos de investigación** en dos aspectos clave:

- (i) **métodos de muestreo**, con especial referencia al material vegetal asintomático, la detección de la bacteria durante la etapa latente de las infecciones y la fiabilidad de las diferentes pruebas cuando se usan muestras compuestas de diversas plantas;
- (ii) pruebas y validación de procedimientos rápidos para la detección altamente sensible en las plantas huéspedes y en los vectores.



Para respaldar aún más la eficacia de los programas de monitorización, se están llevando a cabo experimentos para buscar posibles **“plantas indicadoras (espía)”**, comenzando con *Polygala myrtifolia*, uno de los huéspedes comunes para las diferentes subespecies encontradas en los

diferentes focos de la UE. Se han colocado plantas en macetas de *P. myrtifolia* y alfalfa (se dejaron durante al menos 1 mes durante el verano) en diferentes lugares seleccionados, tanto en el área demarcada “infectada” como en la no demarcada de la región de Apulia (sur de Italia).

Hasta el momento, se han obtenido resultados prometedores, con detección positiva en las “**plantas espía de polígala**” ubicadas en las **áreas infectadas y de contención, en fases muy tempranas (1 mes)** después de su exposición en campo e incluso cuando las plantas todavía estaban asintomáticas.

De hecho, la detección se produjo en una planta de polígala que se encontraba a unos 500 metros de distancia de un brote conocido de infección (olivar infectado). Por lo tanto, la primera temporada de experimentación (verano de 2017) confirmó que las infecciones de las plantas espías ocurren en sitios infectados; una evidencia prometedora que puede ser útil para enfocar mejor el muestreo y los métodos de análisis para la evaluación del riesgo de enfermedad.

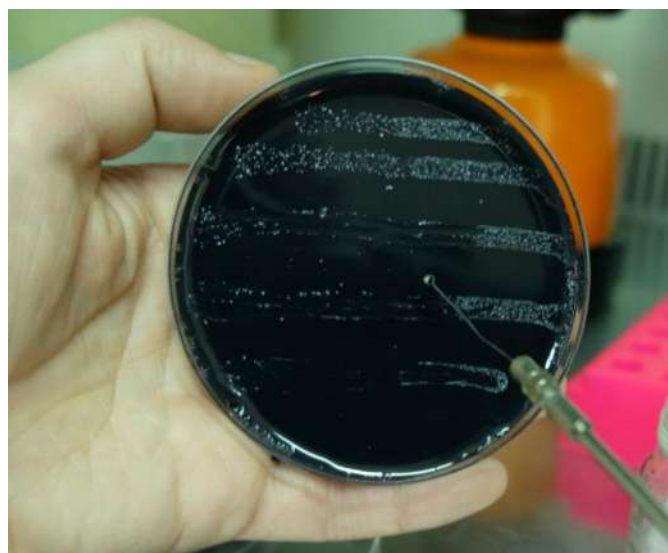
Dentro del marco general del diagnóstico, **la detección precoz** de infecciones por *X. fastidiosa* (es decir, antes de la manifestación de síntomas claros y evidentes) es una de las principales tareas y más ambiciosas a lograr.

Aprovechando los estudios y la experiencia adquirida para otros patógenos que causan enfermedades graves en olivo, i.e. diferentes patotipos

de *Verticillium dahliae*, se ha llevado a cabo durante **dos campañas consecutivas la evaluación del uso de la teledetección** de olivo afectado por OQDS en los que se cubrieron aprox. 200,000 olivos en la zona infectada de Apulia (sur de Italia).

En este sentido, con el fin de evaluar la presencia y la severidad de los síntomas y validar el conjunto de datos de teledetección, en un número seleccionado de olivares mediante una serie de inspecciones de campo periódicas, se recogieron simultáneamente **imágenes hiper-espectrales y térmicas** a una resolución inferior a un metro.

La alta resolución de imágenes de espectroscopía y termografía permitieron **la identificación** de cambios en los caracteres funcionales de las plantas, revelando la presencia de la enfermedad en la etapa pre-visual cuando **los síntomas aún no eran evidentes**, un requisito crítico para **programas efectivos de vigilancia** y para implementar de forma temprana un programa de erradicación efectivo.



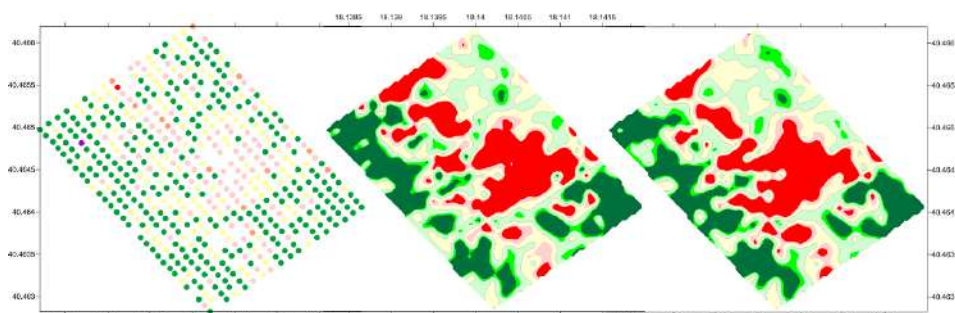
Dinámica de enfermedades, modelización y evaluación del riesgo de plagas

La información y el conocimiento inicial sobre la **propagación espacio-temporal** de las infecciones de *X. fastidiosa* se ha llevado a cabo en diferentes zonas de estudio en el sur de Italia.

El comprender la dinámica espacio-temporal de las infecciones y el posterior desarrollo de enfermedad en los olivares es crucial para poder abordar una estrategia adecuada de manejo.

A este respecto, aunque aún en fase de desarrollo, tras 2 años de estudio se dispone de una información valiosa sobre la dinámica espacial y temporal de la enfermedad en parcelas de olivo seleccionadas a propósito con un amplio rango de incidencia y de severidad de la enfermedad.

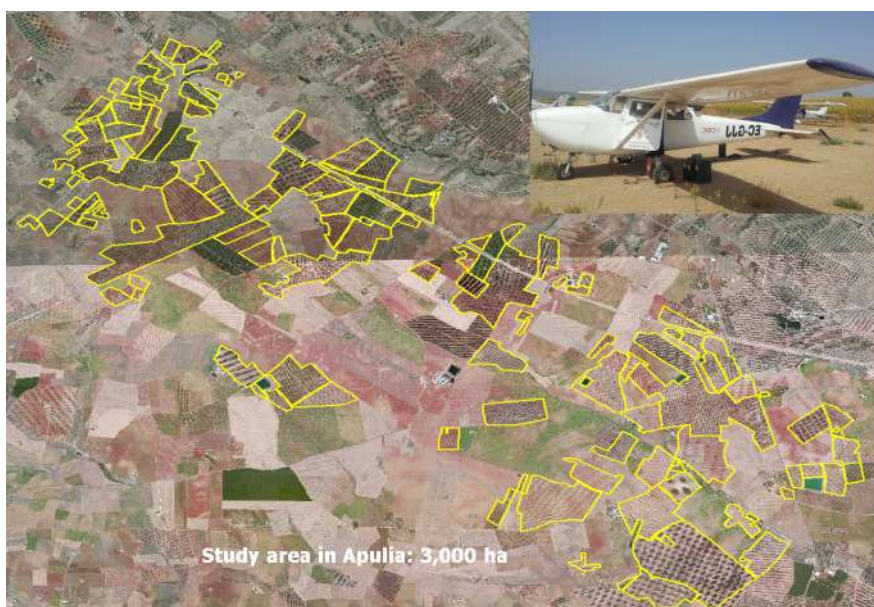
El patrón espacial obtenido utilizando el Análisis Espacial de Índices de Distancia (SADIE) indicó la existencia de patrones espaciales agregados (es decir, los árboles recién infectados están vinculados a las infecciones antiguas), confirmando que la propagación secundaria de la infección ocurre de los árboles infectados inicialmente a los árboles vecinos no infectados.



Incidencia y severidad de la enfermedad

Esto está de acuerdo con el hecho de que, hasta el momento, no se han observado infecciones extensivas en plantas silvestres, huéspedes alternativos riparios que se encuentran cercanos a olivares infectados sugiriendo que las infecciones ocurren y se extienden principalmente de un árbol de olivo a otro.

Este patrón espacial fue menos pronunciado en olivares con variedades tolerantes. Se ha demostrado que las concentraciones bacterianas en variedades de olivo tolerantes / resistentes son significativamente menores, lo que pueden incidir



negativamente sobre la eficacia de transmisión del vector (es decir, significativamente más baja). Estos hallazgos son consistentes con el patrón de la distribución espacial detectado en el caso de la variedad tolerante.

Con el fin de establecer **mecanismos y herramientas más eficaces para la evaluación y prevención de riesgos**, así como las estrategias idóneas para la erradicación o la contención, una tarea importante a la que han contribuido varios grupos de investigación de la UE ha sido el desarrollo de modelos de simulación.

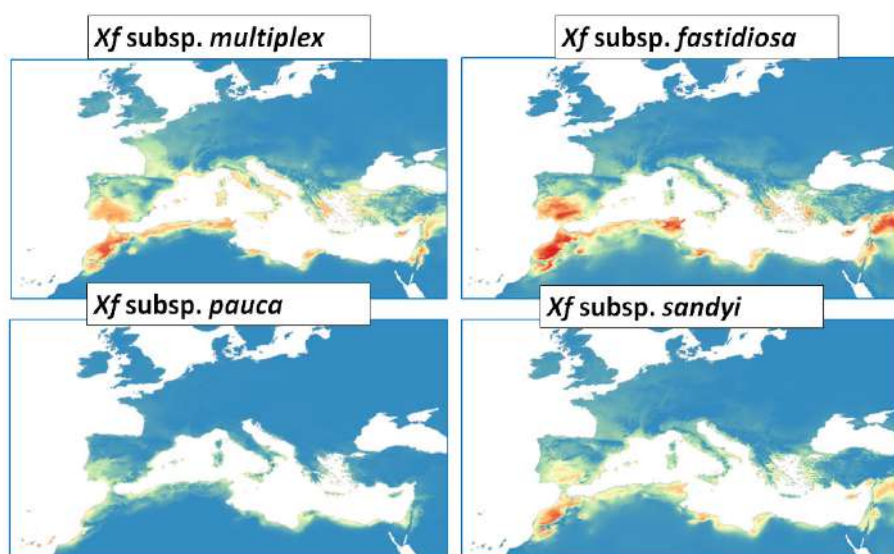
Existen diferentes metodologías complementarias para evaluar los modelos de evaluación de riesgos a escala regional, utilizando parámetros relevantes, como por ejemplo epidemiología de enfermedades causadas por *X. fastidiosa*, huésped/es, vectores, gestión pública y condiciones ambientales.

En este sentido, la disponibilidad de datos biológicos y epidemiológicos afecta mucho el resultado y la solidez

de los modelos de simulación. Por ello, se han hecho esfuerzos para coordinar y asegurar el intercambio continuo y efectivo de información y el establecimiento de redes de trabajo entre los investigadores que aportan nuevos conocimientos sobre el patógeno, el vector, la prevalencia del huésped y las interacciones huésped-patógeno y los investigadores que trabajan en modelos de simulación.

La integración de los datos biológicos / epidemiológicos existentes en los modelos de simulación conllevará a predicciones más precisas del posible establecimiento y dispersión, proporcionando elementos clave para intervenciones más específicas (estrategias de vigilancia, priorización de áreas y huéspedes para ensayos y muestreos, erradicación, criterios para la demarcación de las áreas, etc.).

La disponibilidad de conjuntos de datos de monitorización de las Autoridades Fitosanitarias Nacionales es un elemento adicional importante para el desarrollo y la calibración de estos modelos.



Idoneidad climática regional y distribución geográfica potencial en relación con las diferentes subespecies

Por lo tanto, en base al conjunto de datos de monitorización y el conocimiento disponible sobre la prevalencia en el huésped, se han desarrollado y probado diferentes modelos para estimar la introducción (como en el caso de Córcega), para revelar la presencia de “componentes ocultos” (es decir, nichos que sirven como fuente de inóculo), para comprender la historia de la invasión y para proyectar las dinámicas futuras de *Xylella* en diferentes escenarios.

Los resultados generales se resumen a continuación:

- **Los modelos espacio-temporales** ensayados mediante el empleo del conjunto de datos de monitorización en la región de Apulia confirmaron la alta capacidad de propagación de la enfermedad en condiciones ambientales favorables.

- Un análisis preliminar descriptivo indicó que las variables ambientales son bastante homogéneas en el área de estudio de Apulia, por lo tanto, no se espera que tengan mucha influencia en los modelos de simulación.

- Existe una **fuerte influencia del componente espacial** en la distribución de *X. fastidiosa*.

- El análisis realizado sobre los **datos recopilados en Córcega** abrió un debate científico sobre la fecha de introducción, con evidencias que apoyan **una posible introducción que data de 1985**.

- ***Cistus spp.* (Cistaceae)** (una de las principales especies huéspedes infectadas en Córcega) muy probablemente contribuye a la presencia del “**componente oculto**”, i.e. nichos que sirven como fuente de inóculo.

- Los modelos de simulación ponen en evidencia **la necesidad crítica de una detección temprana**, para que el arranque de las plantas en las zonas afectadas sea efectivo.

- Los modelos de difusión destacan la importancia de **la anchura de las zonas tampón y de contención** para detener la expansión de la difusión provocada por la dispersión a larga distancia. Cuando hay restricciones presupuestarias, es más probable que zonas tampón y de contención más anchas reduzcan el riesgo, en contraposición a una vigilancia más concentrada.

- La alta sensibilidad de las tasas de difusión, vigilancia y control presentan a la dispersión a larga distancia, indican la necesidad de más trabajos de investigación para cuantificar este proceso ecológico.

Se organizará una reunión con los evaluadores y los gestores de riesgos para analizar críticamente la metodología y los resultados esperados por los usuarios finales, así como para seleccionar y validar mejor los parámetros de entrada y el análisis que se lleve a cabo.

Debido a que un enfoque sistemático para la **gestión** y prevención del riesgo requiere la participación de las

entidades interesadas (stakeholders), se realizaron dos análisis independientes mediante la recopilación **de respuestas** a cuestionarios preparados ad hoc.

Se estudiaron los factores psicológicos y sociodemográficos asociados **con las percepciones e intención de los olivareros para participar en el control de *X. fastidiosa*** en el sur de Italia.

Los resultados preliminares indicaron que los agricultores en la zona infectada están muy preocupados por las pérdidas económicas causadas por la enfermedad, y que el 97% de los olivareros tenía la intención de informar a las autoridades competentes ante una sospecha de infección.

Del mismo modo, el 84% de los agricultores mostraron un gran interés en aplicar las mejores prácticas para frenar la propagación de la enfermedad. Solo el 26% indicó que estaba dispuesto a participar en tratamientos fitosanitarios contra los vectores transmisores de la bacteria.

Mientras que el interés de los olivareros en la eliminación de árboles infectados se limitó al 38%, con una compensación igual al precio del mercado del olivo y fue inferior (30%) en el caso de que no se pagase ninguna indemnización.

Comentarios de las entidades interesadas sobre los programas de investigación sobre *Xylella fastidiosa*

La conferencia y la reunión anual del proyecto se enriquecieron con sesiones dedicadas a la discusión con las entidades interesadas (agricultores, viveristas, inspectores de sanidad vegetal y gerentes de riesgos).

Hubo un consenso general sobre:

- **la relevancia de los conocimientos y avances científicos realizados en los últimos años por los equipos de investigación europeos** (conocimiento sobre las plantas huéspedes susceptibles de la UE y sobre la genética / biología de cepas de *Xylella*, vector (es) en la UE e información preliminar sobre su ciclo biológico y huéspedes de preferencia, desarrollo de nuevos enfoques prometedores de vigilancia como el uso de la teledetección, la identificación variedades resistentes de olivo, etc.)
- **el alto nivel de cooperación internacional** en los programas de investigación en curso, como una buena base para alcanzar de forma eficiente objetivos importantes.

- **los impactos** de los brotes de enfermedad causada por *Xylella* no se limitan sólo a **las producciones agrícolas y el paisaje**, sino que también causan **pérdidas económicas** significativas a la industria viverística (la existencia de reglas estrictas para la producción y comercialización en zonas demarcadas afectan particularmente a los viveros ubicados en dichas áreas).

Desde la perspectiva de las entidades interesadas (stakeholders), se identificaron como necesidades principales a investigar:

- Sistema de detección temprana / **ensayos de campo rápidos** y fáciles.
- **Guías para la vigilancia** en niveles de presencia del patógeno bajos y de muestreo de plantas asintomáticas.
- **Tratamientos (curativos)** para plantas infectadas (como formulaciones o termoterapia extendida a otras especies además de la vid).
- Necesidad de definir **los requisitos de las instalaciones utilizadas para la propagación de material vegetal libre de *Xylella*** (tamaño / tipo de malla, medios para el control de vectores antes



de realizar intercambios comerciales).

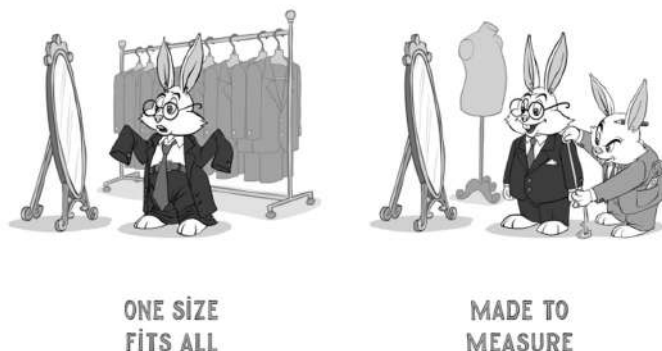
- **Ampliar el conocimiento** del comportamiento **del vector** en diferentes condiciones climáticas de la UE y **de la capacidad de dispersión de los vectores**.

- Desarrollar **tratamientos respetuosos con el medioambiente para controlar los vectores** aplicables en diferentes cultivos.

- Probar / seleccionar la mayor cantidad posible de especies de plantas para la identificación de **huéspedes no susceptibles / variedades resistentes** para su replantación en las áreas afectadas.

- Aumentar o iniciar **programas de mejora** para la resistencia al patógeno

Una única talla no le encaja a todos



Author: "No Bugs" Hare
<http://bit.ly/2HxzdVO>

Observaciones finales generales

- En los últimos años, en Europa se han logrado avances significativos y una cooperación relevante en la investigación sobre *Xylella*, pero el desarrollo de estrategias de gestión sostenible requiere programas de investigación de la UE a largo plazo.

- Los científicos son conscientes de la importancia de sus trabajos de investigación para la prevención, la gestión y el control de las enfermedades causadas por *Xylella* y, por ello, están compartiendo y discutiendo sus resultados, incluso antes de ser publicados.

- El control de *X. fastidiosa* es complejo y debe adaptarse a cada caso (región) tratando de comprender el patosistema específico involucrado (patógeno, vectores, huésped, ambiente).



- 1 Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante**



- 2 Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (C.I.H.E.A.M.)**



- 3 Università degli Studi di Bari “Aldo Moro” (UNIBA) - Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti**



- 4 Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Research Institut for Horticulture and Seeds and Fruit Biology and Pathology**



- 5 Agencia Estatal Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC) - Institute For Sustainable Agriculture and Institute Of Agricultural Sciences**



- 6 Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) - Department of Plant Protection and Agro-Engineering**



- 7 Benaki Phytopathological Institute (BPI) - Department of Phytopathology and Department of Entomology and Agricultural Zoology**



- 8 Julius Kuhn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI) - Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau**



- 9 Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO)**



- 10 The Regents of the University of California (UC) – Department of Environmental Science, Policy, and Management**



- 11 Centro de Citricultura (IAC) - Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular**



- 12 National Taiwan University (NTU) - Department of Entomology**



- 13 University of Costa Rica (UCR) - Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular**



- 14 Natural Environment Research Council (NERC) - Centre for Ecology & Hydrology**



15 Instituto Politécnico de Bragança (IPB)



**16 The University of Salford (USAL) -
School of Environment and Life Sciences**



**17 Joint Research Centre - European
Commission (JRC) - Institute for
Environment and Sustainability - Forest
Resources**



**18 Consiglio per la Ricerca in Agricoltura
e l'Analisi dell'Economia agraria
(CREA) - Centro di ricerca per la
Patologia Vegetale**



**19 Centro Euro-Mediterraneo sui
Cambiamenti Climatici Scarl (CMCC)
– Department of Impacts on Agriculture,
Forests and Ecosystem Services**



**20 Nederlandse Voedsel En Waren
Autoriteit (NVWA)**



**21 Instituto Andaluz de Investigaciony
Formacion Agraria Pesquera
Alimentaria Y de la Produccion
Ecologica (IFAPA)**



**22 International Federation of Organic
Agriculture Movements European
Union Regional Group (IFOAM EU
GROUP)**



**23 European and Mediterranean Plant
Protection Organization (EPPO)**



24 RUSSEL IPM LTD



25 ENBIOTECH Srl



26 AINIA - Bioassays



**27 Sustainable Communication Aisbl
(S-COM)**



**28 Stichting Nederlandse Algemene
Kwaliteit Sdienst Tuinbouw
(NAKTUINBOUW)**



29 CIVI-ITALIA



Third linked parties

- CIHEAM - Bari
- CIHEAM - Chania
- Fondazione Edmund Mach
- CRSFA Basile Caramia
- NET7
- ID Consulting

- 1 Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Pianta**



- 2 Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" (UNIBA) - Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti**



- 3 Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Research Institut for Horticulture and Seeds and Fruit Biology and Pathology**



- 4 Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) - Laboratoire de la Santé des Végétaux**



- 5 Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) - Department of Plant Protection and Agro-Engineering**



- 6 Agencia Estatal Consejo Superior De Investigaciones Científicas (CSIC) - Institute For Sustainable Agriculture and Institute Of Agricultural Sciences**



- 7 Scottish Government (SG) - Science and Advice for Scottish Agriculture Edinburgh**



- 8 Forestry Commission Research Agency (FR) - Centre for Ecosystems, Society & Biosecurity**



- 9 Bundesforschungs-und Ausbildungszentrum für Wald, Naturgefahren und Landschaft (BFW) - Forest Protection**



- 10 Luonnonvarakeskus (LUKE) - Plant Production Research**



- 11 Wageningen University (WU) - Department of Social Sciences**



- 12 Norsk Institutt for Bioekonomi (NIBIO) - Plant Health and Plant Protection**



- 13 University of Costa Rica (UCR) - Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular**



- 14 The Agricultural Research Organisation of Israel (ARO) - The Volcani Centre - Department of Plant Pathology and Weed Sciences**



15 University of Belgrade (UB) - Faculty of Agriculture and Forestry



16 Certis Europe B.V. - Development and Registration Certis Europe B.V.



17 Aurea Imaging BV



18 Vilmorin



19 LOEWE Biochemica GmbH



20 Phytophthora Research and Consultancy (PRC)



21 Acli Racale Soc. Agr. Coop.



22 Agritest SRL



23 Fundacion Citoliva, Centro De Innovacion Y Tecnologia Del Olivar Y Del Aceite - Fundacion CITOLIVA



24 Agricola Villena, Coop. V.



25 A L Tozer Ltd



Third linked parties

- University of Turin
- University of Helsinki
- CRSFA Basile Caramia



www.ponteproject.eu/partners

XF-ACTORS - Organizzazioni di supporto

AESAVE - Asociación Española De Sanidad Vegetal



AIPH - The International Association of Horticultural Producers



ANVE - Associazione Nazionale Vivaisti Esportatori



APROL



ASAJA Córdoba



CIA - La Confederazione Italiana Agricoltori



Citoliva



CONFAGRICOLTURA, Confederazione Generale dell'Agricoltura Italiana



Copa-Cogeca



ENA - European Nurserystock Association



IOC - International Olive Council



InnovaPuglia



MIPAAF - Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali



Ministry of Environment and Energy, Greece



Ministry of Rural Development and Food, Greece



POnTE - Organizaciones de apoyo

DGAL - Ministry of Agriculture
(France)



Coldiretti



ANVE - National Association
of Nurserymen Exporters



MAPAMA - Plant and Forestry
Health (Spain)



ASAJA Córdoba



APROL Lecce



DOP EVO Consortium "Terra
D'Otranto"



EVIRA - Finnish Food Safety
Authority



Plant Protection Service -
Ministry of Agriculture (Costa
Rica)



Junta de Andalucía



ENA - European Nurserystock
Association



Inter-professional
organization of Spanish olive
oils



FEPEX



NVWA - Dutch Food Safety
Authority



Plant Health Service Apulia
(Italy)

