



Ninfa de *Philaenus spumarius*.

## Caracterización molecular de los vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares empleando el código de barras de ADN

*Xylella fastidiosa* es una bacteria que infecta los vasos de xilema de una gran variedad de especies de plantas provocando numerosas enfermedades que, en el peor de los casos, pueden llegar a terminar con la vida de las mismas. En España, este patógeno emergente de origen americano fue detectado por primera vez en el año 2016 en Mallorca (Govern de les Illes Balears, 10/11/2016). Estudios iniciales apuntan a que en Baleares tenemos un escenario distinto al que ocurre en otras partes del mundo, con 21 especies vegetales afectadas y tres subespecies de esta bacteria (Jeger y col. 2018). Hay muchos interrogantes no resueltos sobre los factores epidemiológicos que han determinado su colonización en las Islas, comenzando por las especies de hemípteros responsables de la transmisión. Las herramientas moleculares se vienen empleando con éxito para resolver interrogantes sobre la epidemiología y ecología de los vectores de enfermedades. Nuestro trabajo se centra en identificar los vectores de *X. fastidiosa* en las Islas Baleares empleando la técnica del código de barras de ADN (o DNA-barcoding, según sus siglas en inglés), que consiste en la amplificación de un fragmento de 650 pares de bases del genoma mitocondrial (Hebert y col. 2003).

**Sofía Delgado-Serra, Miguel Ángel Miranda, María Antonia Tugores, Júlia López Mercadal, Carlos Barceló y Claudia Paredes-Esquivel<sup>1</sup>**  
**Margarita Gomila<sup>2</sup>**  
**Katherine Lester<sup>3</sup>, David Kenyon<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Grupo de investigación en Zoología Aplicada y de la Conservación. Universitat de les Illes Balears. España.

<sup>2</sup> Microbiología. Departament de Biologia. Universitat de les Illes Balears. España.

<sup>3</sup> Diagnostics, Wildlife & Molecular Biology. Science and Advice for Scottish Agriculture. Scotland.

## Material y métodos

Para la extracción de ADN se usó el *DNeasy Blood & Tissue Kit* de QIAGEN a partir del tórax de insectos colectados en Ibiza en noviembre de 2017 (*Philaenus spumarius* n=42; *Neophilaenus campestris* n=31). La identificación de los vectores se realizó mediante una amplificación del fragmento *COI*, empleando los cebadores LCO1490 y HCO2198. Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante el kit *QIAquick PCR Purification*. El purificado se secuenció en sentido *forward* y *reverse* usando los mismos cebadores. La presencia de la bacteria en el aparato bucal de los insectos se determinó mediante análisis por qPCR.

Tras recibir las secuencias resultantes, éstas se analizaron, alineándolas y comparándolas empleando el programa Bioedit (Hall 1999). Posteriormente se procedió a estudiar su filogenia mediante la elaboración de un árbol utilizando el método bayesiano por medio del programa MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck 2003). En el análisis se incluyeron secuencias de GenBank, con el objetivo de realizar comparaciones.

## Resultados

La comparación de las secuencias con las disponibles en Genbank y Bold nos permitió confirmar que todos los especímenes pertenecían a *Ph. spumarius* o *N. campestris*. En ambas especies se encontraron ejemplares positivos de *X. fastidiosa* (n=10).



Adulto de *P. spumarius*

Al realizar el árbol filogenético de *N. campestris*, se ha podido comprobar que todos los individuos se agrupan en un mismo clado. Sin embargo, en el árbol filogenético de *Ph. spumarius* pueden apreciarse dos clados claramente diferenciados con un valor de probabilidad posterior elevado (95 y 100 respectivamente). Los resultados preliminares de este estudio demuestran que los insectos de la especie *P. spumarius* positivos a *Xylella fastidiosa* están localizados sólo en uno de los dos clados. Los individuos de ambos clados son simpátricos, es decir habitan en las mismas áreas geográficas.

## Conclusiones

La técnica del código de barras de ADN ha demostrado ser efectiva

para identificar y diferenciar *Philaenus spumarius* y *Neophilaenus campestris* de otras especies de éstos géneros en las Islas Baleares y puede ser un complemento adecuado en aquellos casos en que por diversos motivos los ejemplares no se pueden identificar a nivel morfológico (p.e. estructuras dañadas). Se observan dos clados claramente diferenciados dentro de *P. spumarius* en las Islas Baleares. Sin embargo, no se puede llegar, por el momento, a una conclusión más definitiva al respecto. Se espera que a mediano plazo estos resultados preliminares puedan completarse y demostrar que existe alguna relación entre determinadas poblaciones del vector y del patógeno.

## Bibliografía

- ! Govern Illes Balears. 10-11-2016. Localizados tres cerezos afectados por *Xylella fastidiosa* a un centro de jardinería de Mallorca. <https://www.caib.es/pidip2front/jsp/es/fitxa-convocatoria/8932920>
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270: 313-321.
- Michael Jeger, David Caffier, Thierry Candresse, Elisavet Chatzivassiliou, Katharina Dehnen-Schmutz, Gianni Gilioli, Jean-Claude Gr egoire, Josep Anton Jaques Miret, Alan MacLeod, Maria Navajas Navarro, Björn Niere, Stephen Parnell, Roel Potting, Trond Rafoss, Vittorio Rossi, Gregor Urek, Ariena Van Bruggen, Wopke Van der Werf, Jonathan West, Stephan Winter, Rodrigo Almeida, Domenico Bosco, Marie-Agnes Jacques, Blanca Landa, Alexander Purcell, Maria Saponari, Ewelina Czwieneczek, Alice Delbianco, Giuseppe Stancanelli, and Claude Bragard (2018). Updated pest categorisation of *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal*, 16(7), e05357.
- Ronquist, F., and J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.