

Técnicas de detección de *Xf*

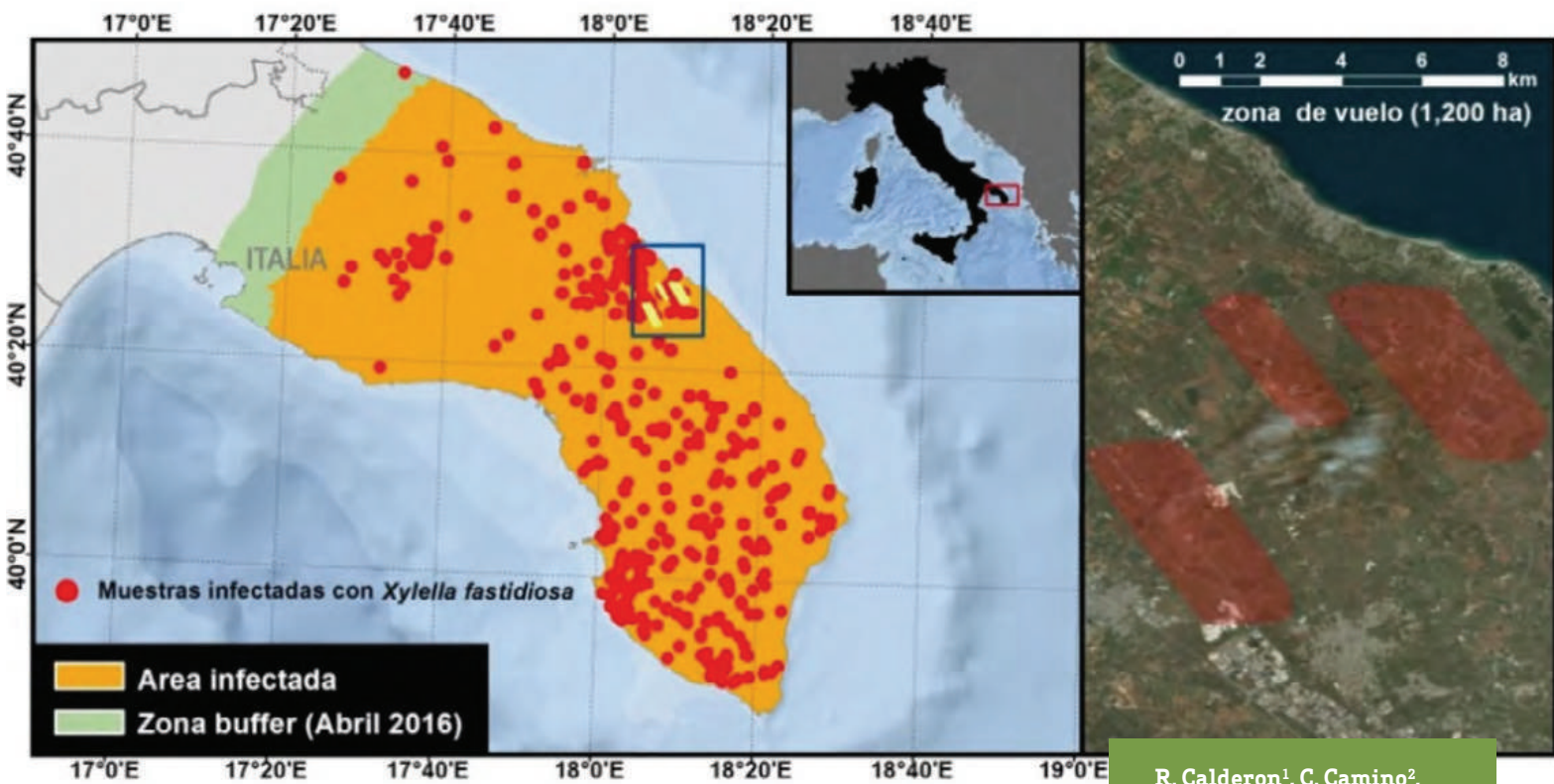


Figura 1. Área demarcada como infectada por *Xf* en la región de Apulia en abril de 2016 y zonas de estudio voladas durante las campañas 2016 y 2017.

DetECCIÓN pre-visual de la infección por *Xylella fastidiosa* en olivo a partir de imágenes hiperespectrales y térmicas

El descubrimiento de *Xylella fastidiosa* (*Xf*) en Italia y la larga lista de especies de plantas hospedantes señala a este patógeno como una amenaza para toda Europa, demostrándose su potencial de propagación en las detecciones más recientes de Francia y España. *Xf* es de difícil manejo una vez establecida en un territorio, por lo que su detección temprana es crítica para su erradicación. En Zarco-Tejada y col. (2018) se demuestra que las imágenes aerotransportadas hiperespectrales y térmicas revelan cambios en los rasgos funcionales de la planta relacionados con la infección por *Xf* en olivos antes de que los síntomas sean visibles, requisito esencial para erradicar esta enfermedad ya que plantas infectadas por *Xf* pueden tardar meses en comenzar a desarrollar síntomas visibles, constituyendo una fuente de inóculo para la propagación de las epidemias de *Xf*.

R. Calderon¹, C. Camino², P.S.A. Beck³, A. Hornero⁴, R. Hernández-Clemente⁴, T. Kattenborn⁵, M. Montes-Borrego², L. Susca⁶, M. Morelli⁷, V. Gonzalez-Dugo², P.R.J. North⁴, B.B. Landa², D. Boscia⁷, M. Saponari⁷, P.J. Zarco-Tejada^{3,8,9} and J.A. Navas-Cortes²

¹ School of Environment and Life Sciences, University of Salford, Manchester, United Kingdom.

² Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Córdoba, Spain.

³ European Commission (EC), Joint Research Centre (JRC), Directorate D-Sustainable Resources, (VA), Italy.

⁴ Department of Geography, Swansea University, Swansea, United Kingdom.

⁵ Institute of Geography and Geoecology, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany

⁶ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti dell'Università di Bari Aldo Moro, Bari, Italy.

⁷ CNR, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Sede Secondaria di Bari, Bari, Italy.

⁸ School of Agriculture and Food, Faculty of Veterinary and Agricultural Sciences, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia.

⁹ Department of Infrastructure Engineering, Melbourne School of Engineering, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia.

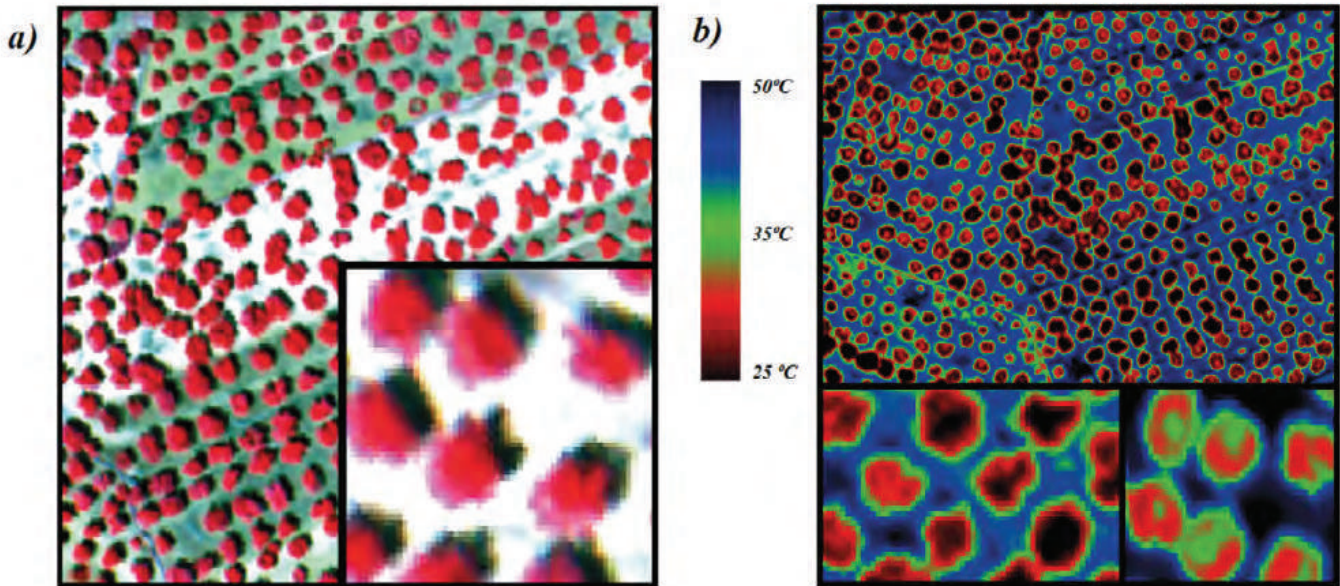


Figura 2. Mosaicos obtenidos con el sensor hiperespectral (a) y térmico (b) a una resolución espacial de 40 y 60 cm/píxel, respectivamente.

En los últimos años se ha experimentado un aumento drástico en el número de enfermedades emergentes de las plantas, asociado a factores naturales y antropogénicos, cuyo impacto en la producción de cultivos y la seguridad alimentaria ha sido muy significativo. Los patógenos se han introducido en nuevas áreas geográficas a través de material infectado transportado por personas y por cambios en el clima que favorecen su establecimiento en áreas donde antes no era posible. La reciente llegada de *Xylella fastidiosa* (*Xf*) a Europa es un aviso del claro peligro que representan las enfermedades emergentes de las plantas (Martelli y col., 2016). La subespecie *pauca* de *Xf* fue descubierta en olivos en la región de Apulia, sur de Italia, en 2013 y se ha extendido por toda la región causando un impacto socio-económico de gran alcance. La larga lista de posibles especies hospedantes de *Xf* (>550 especies de plantas) significa que este patógeno es una amenaza considerable para toda Europa, demostrando su potencial de propagación en las detecciones más recientes de *Xf* en Francia y España. A medida que aumenta el número de casos de epidemias de las plantas, también aumenta la importancia de una vigilancia eficaz para su control. Los efectos devastadores causados en Italia y la presencia confirmada en Francia y España hicieron que el bro-

te de *Xf* en la UE tuviera una mayor repercusión. En este sentido, según Almeida (2016), la erradicación de *Xf* requiere i) una detección temprana, y ii) una pequeña zona infectada, lo cual ya no es posible en el caso de Apulia, pero sí en Francia y en el reciente caso de España, así como en otras áreas susceptibles de Italia y potencialmente la UE entera. Por estas razones, el desarrollo de metodologías a gran escala y de rápida respuesta para la detección precoz de la enfermedad en áreas cercanas a zonas infectadas es crucial. En consecuencia, los métodos avanzados de teledetección son la única tecnología factible para el exitoso seguimiento y detección temprana a gran escala de árboles afectados.

Material y Métodos

Campañas de vuelo y evaluaciones de campo

Se realizaron dos vuelos, en 2016 y 2017, con un sensor hiperespectral y térmico a bordo de un avión tripulado, cubriendo tres zonas de olivar situadas dentro del área afectada por *Xf* en la región de Apulia (Figura 1). El sensor hiperespectral (Micro-Hyperspec VNIR model, Headwall Photonics, MA, EEUU) obtuvo imágenes a una resolución espacial de 40 cm y 260 bandas espectrales. La cámara térmica (FLIR SC655, FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA) sumi-

nistró imágenes de 60 cm de resolución espacial y fue utilizada en torno a las 12:00 GMT.

La incidencia y severidad (SE) de la infección por *Xf* se evaluó conjuntamente con las campañas de vuelo mediante observación visual de síntomas foliares en quince parcelas de olivar (más de 7000 olivos evaluados durante 2016 y 2017). La evaluación se estableció de 0 a 4 de acuerdo al porcentaje de follaje de la copa con síntomas, donde 0 indica la ausencia de síntomas visibles y 4 árboles con predominio de ramas muertas. Además, otras tres evaluaciones se llevaron a cabo después del primer vuelo en octubre 2016, febrero y junio de 2017. Análisis cuantitativos de PCR (qPCR) fueron realizados en todas las parcelas para verificar la infección por *Xf*.

Esquema metodológico y análisis estadístico

La metodología desarrollada se basó en un esquema integrado multicapa de rasgos funcionales relacionados con la infección por *Xf*, calculados a partir de la inversión de modelos de transferencia radiativa (PROSAIL), emisión de fluorescencia (3D-Fluor-FLIGHT) y características fisiológicas, como el estado de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, la degradación de clorofila a través de la feofitización, la conductancia estomática y las altera-

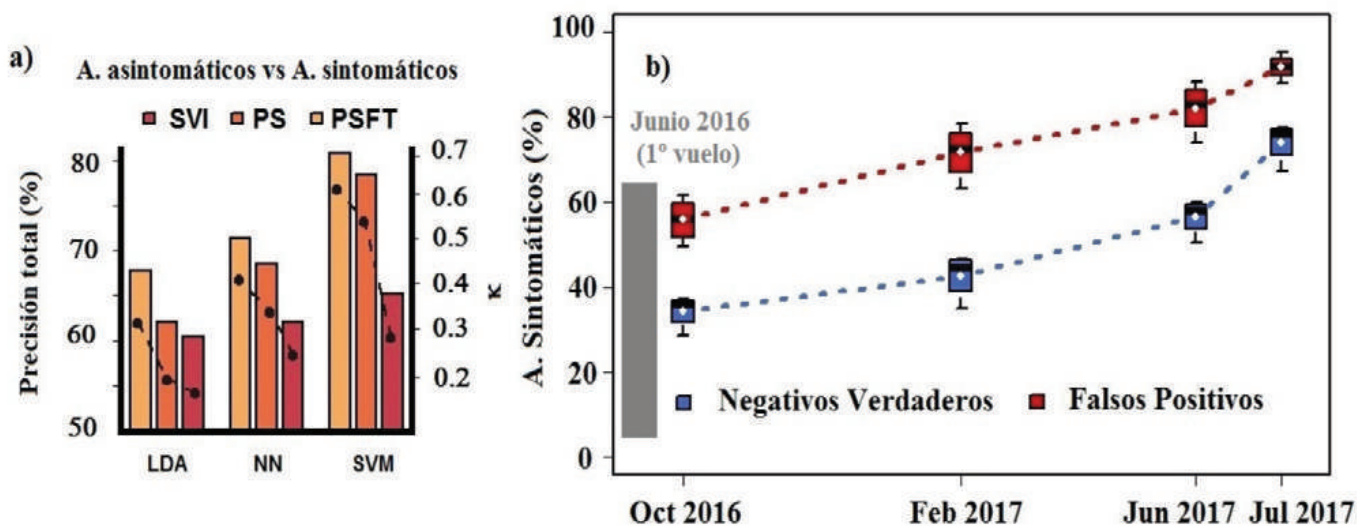


Figura 3. Precisión de los tres modelos de clasificación para los tres conjuntos de rasgos funcionales obtenidos por teledetección para discriminar entre árboles asintomáticos y árboles sintomáticos con *Xf* (a). Análisis temporal para árboles clasificados como asintomáticos (negativos verdaderos) y sintomáticos por teledetección (falsos positivos) (b).

ciones de la transpiración, estimados a partir de índices espectrales y térmicos. Los rasgos funcionales se usaron como entrada en algoritmos de clasificación basados en aprendizaje automático, en particular máquinas de soporte vectorial (SVM), redes neuronales (NN) y análisis discriminante lineal (LDA), para detectar la enfermedad en dos niveles: i) olivos asintomáticos versus olivos sintomáticos y ii) olivos con síntomas iniciales de *Xf* (SE=1) versus olivos con síntomas avanzados de *Xf* (SE ≥ 2). Como primer paso, se realizó un análisis de curva ROC (Receiver Operating characteristic Curve) para determinar los rasgos funciones de la planta más importantes para caracterizar los síntomas de *Xf*. Segundo, se evaluaron los tres algoritmos de clasificación con tres conjuntos diferentes de rasgos funcionales basados: i) en pigmentos, estructura, fluorescencia y temperatura (PSFT); ii) en pigmentos y efectos estructurales (PS); y iii) en el conjunto de bandas espectrales localizadas en la región Visible-NIR (SVI).

Resultados y discusión

El análisis ROC reveló que el rasgo espectral basado en la feofitinización de la degradación de la clorofila (NPQI) y el CWSI (Crop Water Stress Index), relacionado con la trasp-

/ La fluorescencia fue el rasgo funcional mas sensible para discriminar entre arboles con síntomas iniciales y árboles con síntomas de *Xf* más severos /

ración y conductancia estomática, fueron los rasgos que mejor distinguieron los árboles asintomáticos de los sintomáticos, seguidos de la concentración de antocianinas, carotenoides y fluorescencia. Sin embargo, la fluorescencia fue el rasgo funcional más sensible para discriminar entre árboles con síntomas iniciales y árboles con síntomas de *Xf* más severos. La sensibilidad de estos rasgos funcionales basados en la fi-

siología de las plantas para detectar etapas tempranas de la infección por *Xf* está respaldada por trabajos científicos que muestran el papel foto-protector de los carotenoides y la protección contra daños inducidos por estreses abióticos y bióticos proporcionados por flavonoides como las antocianinas (Dalglish y col., 2007). Además, las alteraciones en la regulación estomática (Zeng y col., 2010) y la fotosíntesis causadas por las interacciones planta-patógeno (Berger y col., 2007) conducen a una disminución de la fluorescencia (Calderón y col., 2013) y la transpiración (Chaerle y col., 2004), y la producción de compuestos fenólicos de defensa en las plantas (Barón y col., 2016).

El conjunto de rasgos funcionales PSFT obtuvo el mejor resultado de clasificación a través del algoritmo SVM para discriminar árboles asintomáticos de sintomáticos, alcanzando una precisión en la clasificación del 80,9% (Figura 3a). Por el contrario, los conjuntos de rasgos PS y SVI obtuvieron resultados menos precisos para los tres algoritmos de clasificación, alcanzando precisiones del 78,5% y 65,4% para el algoritmo SVM, respectivamente. Cuando el objetivo fue discriminar entre árboles con síntomas de *Xf* iniciales frente a árboles con síntomas avanzados, el conjunto PSFT con SVM volvió a ob-

/ Este trabajo demuestra el potencial de la teledetección como nueva forma de vigilancia para la detección temprana y pre-visual de enfermedades emergentes en plantas /

tener el mejor rendimiento global con una precisión del 73,05%. Además, en una parcela seleccionada al azar, se validó el modelo de clasificación PSFT-SVM con qPCR alcanzado un 94% de precisión, mientras la evaluación visual fue del 77,6%.

Para evaluar si el modelo basado en teledetección realmente detectaba los síntomas causados por *Xf* en etapas pre-visuales, agregamos una dimensión temporal al análisis (Figura 3b). En particular, cuatro meses después del primer vuelo (octubre de 2016), el 61% de los falsos positivos (árboles asintomáticos clasificados como sintomáticos por el modelo de teledetección) habían desarrollado síntomas, mientras que solo el 39% de los árboles asintomáticos clasificados como no afectados por el modelo PSFT-SVM (negativos verdaderos) lo hicieron. Esta diferencia en el desarrollo de los síntomas visibles se mantuvo a lo largo de las evaluaciones posteriores al primer vuelo. Los resultados obtenidos en el esquema de revisita multi-temporal, apoyados por el análisis qPCR, confirmaron que el modelo de detección remota basado en los rasgos PSFT podía detectar los síntomas de *Xf* antes que las inspecciones visuales tradicionales realizadas por los fitopatólogos.

Conclusiones

Este trabajo demuestra el potencial de la teledetección como nueva forma de vigilancia para la detección temprana y pre-visual de enfermedades emergentes en plantas. La metodología presentada permite su generalización y transferencia a otras especies de plantas o enfermedades, ya que los rasgos recuperados por teledetección están estrechamente o incluso directamente relacionados con los cambios fisiológicos que ocurren en la vegetación afectada. Se resalta el uso de modelos de transferencia radiativa para cuantificar los rasgos fisiológicos vinculados a la fotosíntesis, la degradación de los pigmentos y los cambios estructurales de los árboles que sufren estrés temprano derivado de la infección por *Xf*. La importancia relativa de estos rasgos para la detección de la enfermedad diferirá entre los patógenos y las plantas huésped, dependiendo de los efectos fisiológicos asociados con la enfermedad.

Bibliografía

- ! Almeida R.P.P. 2016. Can Apulia's olive trees be saved?. *Science* 353(6297), 346-348.
- Barón, M., Pineda, M., Pérez-Bueno, M.L., 2016. Picturing pathogen infection in plants. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 71, 355-368.
- Berger, S., Sinha, A.K., Roitsch, T., 2007. Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 58, 4019-4026.
- Calderón, R., Navas-Cortés, J.A., Lucena, C., Zarco-Tejada, P.J., 2013. High-resolution airborne hyperspectral and thermal imagery for early detection of *Verticillium* wilt of olive using fluorescence, temperature and narrow-band spectral indices. *Remote Sens. Environ.* 139, 231-245.
- Chaerle, L., Hagenbeek, D., De Bruyne, E., Valcke, R., Van Der Straeten, D., 2004. Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiol.* 45, 887-896.
- Dalglish, T., Williams, J.M.G., Golden, A.-M.J., Perkins, N., Barrett, L.F., Barnard, P.J., Au Yeung, C., Murphy, V., Elward, R., Tchanturia, K., Watkins, E., 2007. Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications, *Journal of Experimental Psychology: General*.
- Martelli, G.P., Boscia, D., Porcelli, F., Saponari, M., 2016. The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. *Eur. J. Plant Pathol.* 144, 235-243.
- Zarco-Tejada, P.J., Camino, C., Beck, P.S.A.A., Calderon, R., Hornero, A., Hernández-Clemente, R., Kattenborn, T., Montes-Borrego, M., Susca, L., Morelli, M., Gonzalez-Dugo, V., North, P.R.J.J., Landa, B.B., Boscia, D., Saponari, M., Navas-Cortes, J.A., 2018. Previsual symptoms of *Xylella fastidiosa* infection revealed in spectral plant-trait alterations. *Nat. Plants* 4, 432-439.
- Zeng, W., Melotto, M., He, S.Y., 2010. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 599-603.