

---

This is the **published version** of the bachelor thesis:

Garcia Verellen, Laia; Gibert, Isidre , dir. Sideròfors : l'escut dels ametllers front Xylella fastidiosa. 2023. (Grau en Microbiologia)

---

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/291985>

under the terms of the  license



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Treball de Fi de Grau**

**Projecte de Recerca**

**Grau en Microbiologia**

# **Sideròfors: l'escut dels ametllers front *Xylella fastidiosa***

Autora: Laia Garcia Verellen

Tutor: Isidre Gibert González

Data: 27/05/2023

## Resum

*Xylella fastidiosa* (Xf) és un fitopatogen que representa una amenaça mundial per als cultius agrícoles, ornamentals i paisatges ecològics. Està altament present en el sud d'Europa, i les seves àrees potencials de distribució van en augment. S'han documentat més de 600 espècies vegetals susceptibles, entre altres, *Prunus dulcis* (ametller). Aquest bacteri exhibeix un complex cicle de vida i és capaç de coordinar minuciosament l'expressió gènica d'acord amb l'ésser que colonitza (sigui el vector o la planta) a través del *quorum sensing* (QS). En el xilema, s'alimenta de la saba i forma un biofilm que obstrueix el vas, provocant, en el cas de l'ametller, el socarrimat foliar que condueix a la "mort daurada". Ens és rellevant actuar deguda a la pèrdua massiva dels cultius d'ametllers, els quals són símbols del paisatge rural mediterrani. Es tracta d'una plaga sense cura amb elevat impacte social, econòmic i ambiental (de fet, la principal estratègia és l'erradicació de les plantes infectades).

La regulació del QS i virulència de Xf depèn de nutrients essencials com el ferro. Aquest metall juga un paper important en la viabilitat del patogen, i condicions de baixa disponibilitat comprometen la seva capacitat de colonització en la planta. Espècies del gènere *Methylobacterium* constitueixen part de la microbiota de l'ametller i són capaces de segrestar el ferro amb la síntesi de sideròfors. Per tant, els sideròfors de *Methylobacterium* spp. podrien exercir un paper competitiu en l'ametller, constituint-se aquest endòfit com bon bioagent de control front Xf.

## Paraules clau

*Xylella fastidiosa*, *Prunus dulcis*, sideròfor, *Methylobacterium* spp. i biofilm.

## Title

Siderophores: the shield of almond trees against *Xylella fastidiosa*.

## Summary

*Xylella fastidiosa* (Xf) is a phytopathogen that poses a global threat to agricultural crops, ornamental plants, and ecological landscapes. It is highly present in southern Europe, and its potential distribution areas are expanding. Over 600 susceptible plant species have been documented, including *Prunus dulcis* (almond tree). This bacterium exhibits a complex life cycle and is capable of finely coordinating gene expression based on the host it colonizes (either the vector or the plant) through quorum sensing (QS). In the xylem, it feeds on sap and forms a biofilm that obstructs the vessel, leading to foliar scorching and eventual "golden death" in the case of almond trees. It is crucial to act due to the massive loss of almond crops, which are symbols of the Mediterranean rural landscape. It is an incurable pest with high social,

economic, and environmental impacts (in fact, the main strategy is the eradication of infected plants).

The regulation of Xf's QS and virulence depends on essential nutrients such as iron. This metal plays an important role in the pathogen's viability, and conditions of low availability compromise its colonization capacity in the plant. Species of the genus *Methylobacterium* are part of the almond tree's microbiota and are capable of sequestering iron through siderophore synthesis. Therefore, the siderophores produced by *Methylobacterium* spp. could play a competitive role in the almond tree, making this endophyte a promising biocontrol agent against Xf.

## Key words

*Xylella fastidiosa*, *Prunus dulcis*, siderophore, *Methylobacterium* spp. and biofilm.

## Antecedents, estat actual i justificació de la proposta

*Xylella fastidiosa* (Xf) és un bacteri gramnegatiu de la família *Xanthomonadaceae* (1). El nom específic “*fastidiosa*” ja adverteix que es tracta d'un bacteri fastidiós i problemàtic, i és que es caracteritza per ser difícil de cultivar en el laboratori i exhibir un creixement lent (2). Xf és un fitopatogen que representa una amenaça mundial important per als cultius agrícoles, ornamentals i els paisatges ecològics (1). Segons el Reglament (UE) 2016/2031, actualment està considerada com a plaga quarantenària no molt estesa en la regió EPPO (Organització Europea i Mediterrània de Protecció de las Plantes). Referent a la seva taxonomia, existeixen tres subespècies ben establertes que infecten diversos tipus de plantes (subsp. *fastidiosa*, *multiplex* i *pauca*) (3), però se n'han reportat tres més (subsp. *sandyi*, *tashke* i *morus*) i una nova espècie del gènere (*X. taiwanensis*) (4). La classificació de cada soca es fa segons la seva seqüència tipus (ST), d'aquesta forma permet el rastreig de la propagació del bacteri i entendre la diversitat genètica en diferents regions geogràfiques (5). Endèmica les Amèriques (1), i anteriorment absent a Europa, s'estima que Xf va ser introduïda a través d'una planta de cafè des de Costa Rica en el 2008 a Puglia (Itàlia) (6), també es va reportar la seva presència en plantes de cafè confinades en hivernacles en el 2012 a França, procedents d'Equador i Mèxic (7). No fou fins l'any 2013 quan es va detectar Xf per primera vegada en un brot devastador que va provocar la mort massiva d'oliveres i també va afectar ametllers, altra vegada a Puglia (3) (8). A partir d'aquest any, es van realitzar enquestes obligatòries als Estats membres i va augmentar la recerca científica (8), fet que va delatar la presència de Xf en àrees climàtiques del sud d'Europa com són Itàlia, França, Espanya, Portugal, entre altres (1) (9) (10) (11). Pel que fa a l'Estat espanyol, el primer brot de Xf va ser detectat en els ametllers de Mallorca (Illes Balears) en el 2016, però estudis filogenètics fan sospitar que l'entrada del patogen a les illes va ser el 1993 degut a l'empelt de varietats d'ametllers californians amb portaempelts locals (8). Aquesta introducció presumiblement va possibilitar que els vectors de

transmissió afavoriren la infecció de Xf a múltiples hostes (10). El segon brot més important va succeir en el 2017 en ametllers d'Alacant (12). Realment, ja s'advertia la necessitat de disposar de mesures fitosanitàries vigilants per impedir-ne la introducció i expansió (13). Per contra, la situació és molt preocupant, ja que segons estudis estadístics, les àrees potencials de distribució de Xf inclouen, a més dels països europeus fins ara destacats, Albània, Montenegro, Grècia i Turquia, així com els països del nord d'Àfrica i Orient Mitjà (14). És per aquest motiu que el Reglament (CE) nº 178/2002 obliga a l'EFSA (*European Food Safety Authority*) a actualitzar periòdicament la base de dades referent al nombre total d'hostes del microorganisme nociu *Xylella* spp. (incloent *X. fastidiosa* i *X. taiwanensis*). Segons la seva última publicació en el gener del 2023, les xifres d'hostes susceptibles s'eleven a 679 espècies vegetals, 304 gèneres i 88 famílies. D'aquest total, 15 espècies i 6 gèneres no havien estat descrits anteriorment com a hostes de Xf (15). Efectivament, Xf exhibeix una taxa elevada de recombinació homòloga que possibilita l'emergència de noves variants amb elevat potencial per colonitzar nous hostes (16).

La incidència copiosa de les malalties causades per Xf arreu el món ha promogut la recerca exhaustiva referent a l'ecologia i biologia del fitopatogen. En efecte, Xf "viu en dos mons" (17), essent capaç de colonitzar la planta hoste i l'insecte vector. L'abundància de gens codificants de proteïnes adhesives (fimbrials i afimbrials) (18) i la capacitat d'alliberament de vesícules antiadhesives a l'entorn faciliten la formació del biofilm i l'estat lliure, respectivament (19). La regulació d'aquests processos és mitjançant el *quorum sensing* (QS) amb els àcids 2-enoics anomenats *Diffusible Signaling Factor* (DSF), els quals actuen com a molècules senyal (20) (21). La capacitat de canvi entre estats mòbils-immòbils beneficia l'establiment d'elevades densitats de Xf en la planta, així com l'augment de probabilitat d'adquisició del patogen per part dels vectors. El metabolisme de Xf no permet el seu creixement ràpid en la planta, i necessita els aminoàcids, alcohols, àcids orgànics, osmòlits, sucres i vitamines presents en la saba (19). A més, disposa d'una quitinasa que li possibilita aprofitar la quitina present en els vectors (22), però també per inhibir el creixement de fongs endòfits del xilema (19). La microbiota de la planta pot reduir el creixement de Xf mitjançant la competició pels nutrients, interaccions metabòliques competitives, exclusió de nínxol i inducció de la resposta immune de la planta (23) (24). Pel que fa a la transmissió, és duta gràcies a vectors hemípters pertanyents al subordre *Cicadomorpha*, els quals es caracteritzen per alimentar-se de la saba present als xilemes (4). Aquests poden retenir el patogen molts mesos després d'adquirir-lo i destaquen per ser extremadament polífags i atacar a un elevat nombre d'hostes vegetals, incrementant el risc d'infecció (14) (25). De fet, Xf està provocant greus conseqüències en els conreus de vinya, olives, cítrics, ametlles, cafè, moreres, préssecs, prunes, albercocs... Inclús s'ha detectat en plantes d'entorns naturals i urbans, i fins i tot en viviers (8) (9). És per aquest motiu que està considerada com la plaga amb major impacte ambiental, social i econòmic en els cultius agrícoles de la Unió Europea (1) (8) (26). Concretament, els ametllers són de les

espècies vegetals que més han sofert les conseqüències. Històricament, aquestes plantes són símbols del paisatge rural mediterrani, ja que han definit gran part dels cultius de secà a diferents comarques del sud-est peninsular (8) (27) (28) (29), i fins i tot han definit el nom d'algunes localitats com és "Els Lleus" (de l'àrab *al-lâuz* "els ametllers") (30). Conseqüentment, l'expansió de Xf representa un problema en la producció d'ametlla i en els aspectes ornamentals de l'ametller (8). Malgrat aquest fet i l'escassa inversió en el sector agrícola, existeix un interès per part dels agricultors per perpetuar aquest cultiu en el terreny (fins el punt que continuen compatibilitzant-lo amb l'exercici d'altres activitats laborals), i ha estat aquesta voluntat la base de la pervivència del paisatge de l'ametller (31). Malauradament, la principal estratègia de contenció de la Xf ha estat la identificació de àrees demarcades (incloent zona infectada i zona tampó) i l'erradicació dels ametllers presents en aquestes, segons l'article 7 del Reglament (UE) 2020/1201. Aquestes àrees es consideren "en quarantena" fins haver complert els 4 anys sense la presència de la plaga (32). Segons les últimes dades de la Conselleria d'Agricultura, Desenvolupament Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica de la Generalitat Valenciana, s'han eliminat 2.620 hectàrees amb 187.400 ametllers i part del sotabosc en terreny forestal. Lamentablement, les conseqüències d'aquesta tala afecten al llegat cultural i la riquesa patrimonial.

En la majoria d'hostes es considera Xf com un bacteri comensal benigne (1) (23). Ara bé, el seu creixement és limitat al xilema, fet que, junt amb l'acumulació de defenses de les plantes, acaben bloquejant el transport d'aigua i nutrients (33). Com a resultat, els hostes que pateixen la severitat de la malaltia exhibeixen símptomes de necrosi en el marge foliar, pansiment, assecat, deformació, clorosi, retard de creixement i reducció de rendiment de producció. Finalment, aquesta malaltia acaba amb la mort de la planta, raó per la qual aquest bacteri té una importància econòmica rellevant (4). Les malalties de major rellevància financera són la malaltia de Pierce (*Pierce's disease*, PD) en *Vitis* sp., decaïment sobtat de l'olivera (*olive quick decline syndrome*, OQDS), clorosis variegada en *Citrus* sp. (*citrus variegated chlorosis*, CVC) i socarrimat foliar en *Prunus* sp. (*almond leaf scorch disease*, ALS) (14). En el cas de la ALS, està causada per diverses soques de les subespècies *multiplex* i *fastidiosa* (25). Aquesta malaltia té un inici gradual relacionat amb la demanda d'aigua pròpia dels finals d'estiu. Les fulles adquireixen una coloració groguenca entre la zona verda i cremada. Sobtadament, en els següents anys ocorre la "mort daurada" (8). Per desgràcia, actualment no existeix cura, i diversos estudis han destacat estratègies que comprenen mesures profilàctiques i terapèutiques. Es destaca el control del vector, la detecció primerenca d'infecció amb plantes indicadores (34), el disseny de plantes transgèniques resistents, l'ús de soques de Xf avirulentes per "preparar" a la planta front una possible infecció i de compostos estimuladors de defensa de la planta (3), l'ús de bacteriòfags de Xf, de bacteris antagonistes de Xf presents en la microbiota de la planta (35) (36), de molècules antibacterianes com pèptids (37) (38) i compostos fenòlics (39), de metalls quelants que

interfereixin en la senyalització cel·lular de Xf (40) o l'augment dels nivells de DSF en la planta per promoure la confusió del patogen (21), entre altres.

## Hipòtesi

Xf és capaç de percebre la densitat poblacional mitjançant la detecció del quòrum amb les molècules DSF. L'acumulació de DSF activa el sistema de senyalització anomenat *rpf* (regulació dels factors de patogenicitat), format per gens involucrats en la regulació de l'expressió gènica. Davant la percepció i transducció de senyal de DSF, el sistema regulador de dos components RpfC i RpfG permet la regulació de la virulència i *quorum sensing* (QS) amb l'activació de la proteïna RpfF (DSF sintasa). És per aquest motiu que la interrupció del QS és una via prometedora per combatre la Xf (41) (42) (43). Diversos articles han documentat la importància de conèixer el ionoma dels microorganismes, ja que molts metalls estan implicats en l'expressió de factors de virulència. El ferro és un nutrient primordial que actua com a cofactor per moltes proteïnes que participen en funcions cel·lulars essencials (44) (45). Quan els patògens colonitzen l'hoste, el ferro es troba en condicions limitants, i la seva supervivència seria complicada si aquests no disposessin d'un control estricte en l'homeòstasi del ferro a partir dels seus reservoris intracel·lulars i activessin proteïnes adquiridores d'aquest mineral (45). Alguns estudis han connectat l'aprofitament del ferro amb la regulació del QS i conseqüent establiment de la virulència, com és el cas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, fitopatogen pertanyent a la mateixa família filogenètica que Xf. S'ha vist que el seu creixement *in planta* també està regulat per DSF/Rpf, els quals, al seu torn, també participen en la regulació positiva de captació de ferro (46) (47). Tot i haver-se anotat molts gens de Xf relacionats amb el metabolisme del ferro i la patogenicitat, les seves funcions i regulacions encara estan per demostrar. No obstant això, s'ha vist que tant la RpfF com el ferro regulen l'expressió dels factors de patogenicitat com són els gens que codifiquen pel pili tipus IV (44) (45) (48). Aquest pili és crucial per a la migració de Xf en el xilema i juga un paper determinant en la seva colonització en l'hoste (49). D'altra banda, la disponibilitat del ferro intracel·lular també regula la producció de la colicina tipus V i de l'acotinasa, un enzim necessari per a la producció dels exopolisacàrids constituents del biofilm en Xf (50). Aquestes troballes suggereixen que el ferro juga un paper importat en la colonització de la planta per activar determinants virulents i competir eficientment contra els microorganismes endòfits de l'hoste (45). És per aquest motiu que forçar condicions de baixa disponibilitat de ferro per Xf podria comprometre la seva viabilitat en la planta (51). De fet, aquest escenari és una situació cercada en situacions de competició entre microorganismes, ja que alguns són capaços de secretar determinats autoinductors que alteren en el seu competidor l'expressió de gens involucrats en l'adquisició de ferro i producció de sideròfors (52). Els sideròfors són molècules quelants de ferro que segresten aquest nutrient mineral i permeten l'acumulació d'aquests en el microorganisme (53). Xf és capaç de produir sideròfors (54), però també ho són alguns

membres de la comunitat endòfita de l'ametller, els quals ocupen el mateix nínxol ecològic (24) (55). És el cas de *Methylobacterium* spp., el qual, a més de promoure el creixement en les plantes (56) (57), també s'ha reportat seva la capacitat per sintetitzar sideròfors. Aquests podrien explicar la promoció del creixement de les plantes (58) i exercir una pressió competitiva en l'aprofitament d'aquest nutrient per part de Xf (59). De fet, en projectes finançats per la Unió Europea com POnTE (*Pest Organisms Threatening Europe*), grups de recerca com el d'Antelmi *et al.* (2019) (60) ja varen proposar aprofitar aquest gènere bacterià per promoure la resistència front Xf en les oliveres.

**Per aquest motiu, es formula la següent hipòtesi:** la producció de sideròfors per part de *Methylobacterium* spp. afectarà negativament la capacitat de Xf per créixer i establir-se en l'hoste. Per tant, es considera *Methylobacterium* spp. com un bon bioagent de control que exercirà un paper protector en l'ametller front Xf. D'aquesta manera, es proposarà un model que respongui a la problemàtica estesa en els ametllers com a conseqüència del fitopatogen.

## Objectius generals i específics

Per respondre a la hipòtesi proposada s'estableixen com a objectius generals:

1. Identificar *Methylobacterium* spp. i determinar la seva capacitat de producció de sideròfors.
2. Explorar el potencial competitiu de *Methylobacterium* spp. i dels seus sideròfors front Xf.

Per aconseguir el primer objectiu general, es plantegen els següents objectius específics:

- Mostrejar tiges d'ametller sa.
- Aïllar i caracteritzar soques de *Methylobacterium* spp. a partir de la saba xilemàtica provinent de les tiges dels ametllers mostrejats.
- Avaluar la capacitat de producció de sideròfors per part de les colònies de *Methylobacterium* spp. aïllades.

Per assolir el segon objectiu general, es plantegen els següents objectius concrets:

- Disposar del fitopatogen d'estudi.
- Realitzar assajos *in vitro* de competició amb *Methylobacterium* spp. i Xf.
- Realitzar assajos *in vitro* amb Xf i sideròfors.

A la **Figura 1** s'exposa la planificació de treball que es durà a terme per a la realització del projecte proposat. Es dividirà principalment en dues parts: la primera part consistirà en la identificació del gènere bacterià endòfit d'estudi i en determinar la seva capacitat de producció de sideròfors; i la segona part consistirà en explorar el seu potencial competitiu front Xf.



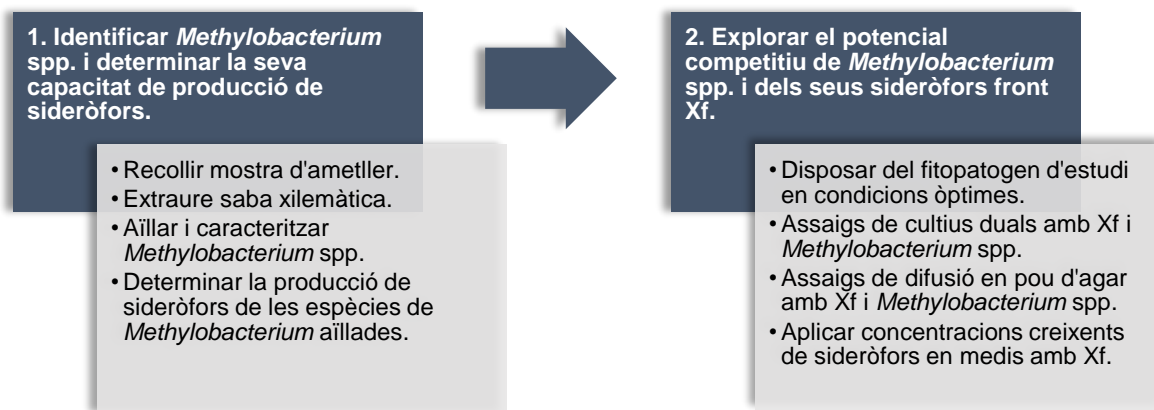


Figura 1. Planificació de treball del projecte proposat.

## Materials i mètodes

### Objectiu 1. Identificar *Methylobacterium* spp. i determinar la seva capacitat de producció de sideròfors.

**Material vegetal.** Per a l'adquisició de les mostres vegetals, es realitzarà el mostreig a partir de plantacions d'ametller localitzades a la finca experimental de Borges Blanques, Lleida. Aquestes plantacions constitueixen un dels centres de l'Institut d'Investigació i Tecnologia Agroalimentària (IRTA), el qual es considera centre de referència del cultiu en qüestió (61). Per al mostreig, es consideraran certs paràmetres per obtenir mostres representatives tals com l'estat fitosanitari i el posicionament de l'arbre en la parcel·la. S'adquiriran tres tiges de 10-15 cm per arbre, mostrejant-se un total de tres arbres. S'emmagatzemaran en tres recipients estèrils i es duran al laboratori abans que passin les 24h.

**Extracció de la saba.** Per evitar la contaminació microbiana de la saba xilemàtica, es tallaran les tiges a uns 4 cm cadascuna i se n'eliminaran 1 cm de cada extrem i es desinfectaran amb hipoclorit de sodi al 2%. Així, es disposaran de nou tiges de planta d'ametller de dos centímetres de longitud cadascuna. Es recol·lectarà el xilema reproduint el mètode d'extracció de saba xilemàtica de tiges descrita per Longchar *et al.* (2020) (62). Es tracta d'un sistema portàtil reproduïble amb una xeringa sense agulla, puntes de micropipetes, tubs de microcentrífuga, tires de parafilm i un bisturí. Aquesta metodologia permet obtenir de forma eficaç la saba, sense menester d'aparells econòmicament més cars (63). D'aquesta manera, la pressió negativa aplicada en les tiges permetrà obtenir un volum de saba, on part de la microbiota de l'ametller hi és present, entre altres i presumiblement, espècies de *Methylobacterium*. Les mostres obtingudes s'emmagatzemaran en refrigeració fins al procediment d'aïllament del microorganisme, no deixant passar més de 2 dies. Per als experiments de cultius duals que es realitzaran més endavant, es recol·lectarà un volum de saba xilemàtica i aquesta es filtrarà amb un filtre de llana de vidre i s'esterilitzarà amb un filtre de membrana de 0,22 µm (64). La mostra es congelarà a -80 °C fins al seu ús.

**Aïllament de *Methylobacterium* spp.** A partir de les mostres de saba del xilema, es realitzaran dilucions seriades i es sembraran amb medi selectiu. L'aïllament de les espècies de *Methylobacterium* és relativament senzilla ja que es caracteritzen per poder créixer amb metanol com a única font de carboni i energia, així com presentar colònies amb pigmentació color rosa pàl·lid. Així doncs, s'elaborarà el medi de cultiu de sals minerals i metanol (MMS), atenent a les indicacions de l'ATCC (medi 1474), i s'incubarà a 26°C durant 3 dies. Si les colònies no són prou visibles (menys d'1 mm) als 7 dies, es realitzaran subcultius amb medi glicerol-peptona (GP), tenint en compte que és un medi que permet el creixement més accentuat del microorganisme d'estudi però que també possibilita el creixement d'altres heteròtrofs. Una forma de fer el medi més selectiu és mitjançant l'administració de metanol com a única font de carboni en el medi. En aquest cas les colònies es visualitzaran de color ataronjat brillant (65). Els aïllats s'emmagatzemaran en glicerol al 20% a -80°C (66). Per confirmar que es tracta d'espècies de *Methylobacterium*, es sol·licitarà al Servei de Genòmica (SG) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) l'assaig de seqüenciació massiva amb MiSeq d'Illumina. Per això, primerament s'extraurà i purificarà el DNA el kit de Thermo Scientific™ K0512. Per assegurar la concentració i puresa de les mostres, s'emprarà l'espectrofotòmetre i es calcularà la concentració tenint en compte la longitud d'ona a 260 nm. La ràtio A260/280 s'emprarà per avaluar la puresa (haurà d'estar entre 1.8-2.0) (67). Posteriorment, es prepararan les mostres correctament etiquetades per a l'enviament. Per a la identificació d'espècies, es realitzarà l'anàlisi bioinformàtic amb BLAST.

**Producció de sideròfors de *Methylobacterium* spp.** S'analitzarà la capacitat de síntesi de sideròfors per part *Methylobacterium* spp. amb l'assaig desenvolupat per Schwyn i Neilands (1987) (68). S'emprarà l'indicador colorant Crom Azurol S (CAS), el qual pot incorporar-se a medis sòlids o líquids (69). El principi de l'assaig pot resumir-se en l'equació:  $\text{FeCAS} + \text{L} \rightarrow \text{FeL} + \text{CAS}$ , on "L" fa referència al lligand (sideròfor). L'aparició del sideròfor que la el ferro i vira el color blau del complex FeCAS a taronja (ja que l'indicador queda lliure) (70). L'elaboració d'aquest medi es realitzarà seguint pas a pas la descripció detallada per Loudon *et al.* (2011) (71), amb una modificació: es substituirà la glucosa per succinat com a font de carboni, ja que s'ha reportat que aquesta condició augmenta el rendiment de producció de sideròfors (72). S'empraran com a control positiu una soca de *Pseudomonas aeruginosa*, coneguda per ser gran productora de sideròfors (73) i control negatiu sèrum fisiològic. S'incubaran durant 5 dies a 26 °C, ja que és la temperatura òptima de *Methylobacterium* spp. Els resultats positius s'indicaran amb la formació d'un halo clar al voltant de les colònies i el canvi de color de blau a taronja (74). La producció de sideròfors s'expressarà com a taxa de reacció-CAS (mm d'halo per dia), segons ha descrit Machuca i Milagres (2003) (75). Per a l'estimació quantitativa de sideròfors, es farà servir el mètode de microplaca descrit per Senthilkumar *et al.* (2020) (76). La quantitat de sideròfors es calcularà atenent a la fórmula descrita per Srivastava *et al.* (2022) (77): % sideròfor =  $\frac{A_r - A_s}{A_r} \cdot 100$ , on  $A_r$  és l'absorbància

de referència (reactiu CAS) i As és la de la mostra a 630 nm. Per a la posterior purificació de sideròfors, les colònies productores s'inocularan en medi de succinat amb deficiència de ferro amb agitació constant (72) (ja que s'ha vist que sota aquestes condicions la producció de sideròfors és major) (78) i a 28 °C durant 4 dies (79).

## **Objectiu 2. Explorar el potencial competitiu de *Methylobacterium* spp. i dels seus sideròfors front Xf.**

**Fitopatogen.** S'emprarà la soca *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* CECT 9984. Aquesta es va mostrear per primera vegada a partir de *P. dulcis* a Benimantell (Alacant), i s'adquirirà a partir de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universitat de València) en forma de cultiu liofilitzat (80). Per a la rehidratació de les cèl·lules liofilitzades, s'emprarà una solució salina estèril seguint les passes descrites per la CECT (81). S'inocularà en medi sòlid recomanat i catalogat per la CECT nº 215, el BCYE *supplement* OXOID SR0251C. S'incubarà a 26°C i 15-20 dies en condicions aeròbiques (80). S'observaran colònies blanquinoses, brillants i arrodonides (82). Cal destacar que, al tractar-se d'una plaga quarantenària, s'aplicaran les mesures de bioseguretat pertinents (per informació detallada, vegeu l'apartat de **Condicions de bioseguretat**).

**Mètode de cultiu dual.** Amb l'objectiu d'avaluar el poder antagonista dels sideròfors produïts per les soques de *Methylobacterium* sp. CAS positives, es realitzarà el cultiu dual, amb la finalitat d'enfrontar ambdós microorganismes. El medi de cultiu recollirà característiques que potencien la producció de sideròfors. Almeida *et al.* (2003) (83) van descriure un medi de cultiu mínim sòlid per Xf anomenat XfD2, el qual presenta succinat com a font de carboni i GelRite com agent gelificant (l'agar provoca inhibició del creixement de Xf). A més, tenint en compte que ambdós microorganismes ocupen el mateix nínxol ecològic en l'ametller i la formació de biofilm de Xf es veu promoguda per la presència de la saba, es suplementarà aquest medi amb la mostra de saba anteriorment preparada. No obstant això, tal com descriuen Zaini *et al.* (2008) (64), aquesta haurà de descongelar-se i ser novament filtrada per assegurar-ne l'esterilitat i l'eliminació de qualsevol precipitat resultant del procés de congelació.

**Mètode de difusió en pou d'agar.** Per avaluar l'activitat antagonista de *Methylobacterium* spp. front Xf, es realitzarà el mètode de difusió en pou d'agar (84). Es prendran diverses colònies de Xf prèviament crescudes en BCYE i es resuspendran en Ringer fins una densitat cel·lular equivalent a un estàndard McFarland 0,5 (que correspon a una concentració bacteriana de  $\sim 10^8$  UFC/mL). Posteriorment, amb un hisop estèril es banyarà amb la suspensió bacteriana i es passarà en varies direccions per tota la superfície del medi de cultiu LB. S'assegurarà que l'inòcul està distribuït per tota la placa. Posteriorment, es realitzarà un orifici de forma asèptica en el medi amb la base d'una punta de micropipeta, i amb un ganxo s'eliminarà la porció del medi delimitat per la punta. Seguidament, s'introduirà en el pou un volum de medi fos i s'inocularà amb *Methylobacterium* spp. a una densitat cel·lular equivalent a un estàndard McFarland 0,5. Després, la placa s'incubarà a 24°C (per baix de l'òptim de

*Methylobacterium* spp.) durant 15-20 dies, i s'anirà comprovant l'evolució diàriament. Presumiblement, l'agent antimicrobià (sideròfor de *Methylobacterium* sp.) difondrà en el medi i inhibirà el creixement de Xf.

**Activitat antimicrobiana dels sideròfors.** Es sembraran diverses plaques de Xf en medi líquid XfD2 suplementat amb saba xilemàtica esterilitzada i s'hi aplicaran concentracions creixents de sideròfors en cada placa. Aquests sideròfors hauran estat purificats amb HPLC (cromatografia líquida d'alta eficiència) prèviament seguint la metodologia descrita per Senthilkumar *et al.* (2020) (76). S'incubarà a 26 °C durant 15 dies. El biofilm es tenyirà amb cristall violeta i es quantificarà mitjançant la mesura d'absorbància a 550 nm en un lector de plaques segons va descriure O'Toole (2011) (85).

**Aplicació *in planta*.** Per informació detallada, vegeu l'apartat d'**Annex 1**.

## Cronograma

A la **Taula 1** s'exposa el cronograma d'activitats del projecte. Es representa en funció dels anys i de cada semestre, amb una duració màxima de dos anys i mig. S'indica la duració aproximada de les activitats, les quals s'agrupen d'acord als objectius establerts.

Any		1		2		3	
		1	2	1	2	1	2
<b>Objectiu 1</b>	Mostreig del material vegetal	■					
	Extracció de la saba	■					
	Aïllament de <i>Methylobacterium</i> spp.	■					
	Anàlisi de la producció de sideròfors		■				
<b>Objectiu 2</b>	Cultivar Xf			■			
	Cultius duals Xf vs. <i>Methylobacterium</i> spp.			■			
	Assaig de difusió en pou amb Xf vs. <i>Methylobacterium</i> spp.				■		
	Assaig d'activitat antimicrobiana dels sideròfors					■	

**Taula 1.** Cronograma establert per a la realització del projecte.

## Limitacions i rellevància dels resultats esperats

Primerament, s'ha de destacar que aquesta proposta presenta una limitació evident, ja que la recerca s'ha centrat en el paper protector que podria exercir *Methylobacterium* spp., deixant de banda altres microorganismes que formen part de la comunitat endòfita i que també podrien exercir protecció per a la planta, tal com van descriure Anguita-Maeso *et al.* (2022) (24). A més, existeixen factors relacionats en el mostreig i transport del material al laboratori que podrien pertorbar la mostra d'estudi. Així mateix, tot i haver-se reportat nombrosos articles que defenen el paper protector dels sideròfors contra fitopatògens com Xf, cal fer esmena que Lacava *et al.* (2008) (74) van destacar que *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* té la capacitat d'aprofitar els sideròfors com a font de ferro, fet que contribueix potencialment al seu creixement i supervivència en els cítrics. És més, malgrat que les tècniques descrites són

dures a la pràctica en la microbiologia actual, també existeixen limitacions que calen tenir present. Segons Dimkpa (2016) (69), l'assaig CAS podria subestimar el nivell de sideròfors presents, ja que l'indicador pot reaccionar a la presència d'àcids orgànics de baix pes molecular. També convé ressaltar que els cultius duals podrien reflectir resultats dubtosos, ja que segons Zaini *et al.* (2008), els medis artificials influeixen en l'expressió gènica de Xf, incloent l'atenuació dels factors de virulència (64).

Ara bé, aquest treball es centra en esbrinar el potencial protector d'un microorganisme que forma part de la microbiota de l'ametller. Aquesta aproximació resulta beneficiosa en diversos aspectes, entre altres, es tracta d'una metodologia segura i amb possible perspectiva d'aplicació en el camp. A més, pot conduir a un augment en la salut i la productivitat dels cultius, així com a una reducció en l'ús de tractaments químics que puguin suposar un problema ambiental. Investigar i comprendre la dinàmica entre *Methylobacterium* spp. i Xf brinda una oportunitat per desenvolupar estratègies de maneig efectives i sostenibles per protegir tant el cultiu d'ametllers com el d'altres espècies afectades per aquesta malaltia. Es tracta d'un enfocament de control de malalties amb visió ecològica, holística i respectuosa amb el medi ambient. De fet, la proposta podria suposar una alternativa a l'erradicació de plantes malaltes, contribuint a la preservació del paisatge. La via terapèutica proposada en aquest treball podria contribuir a "salvar" aquelles plantes que estan infectades o inclús "preparar" a aquelles que encara no ho estan (com per exemple, les espècies que queden recollides en la zona tampó de l'àrea demarcada).

## **Condicions de bioseguretat**

Com ja s'ha comentat anteriorment, Xf és una plaga quarantenària i per això es complirà amb la normativa corresponent en matèria de bioseguretat i es disposarà d'una autorització per treballar amb aquest microorganisme. Encara que la CECT cataloga la soca en la qual es treballarà com a agent biològic del grup 1 (86), i que és poc probable que causi malaltia en l'humà (Art. 3 del RD 664/1997), es requereix un adequat nivell de contenció atès el seu impacte a escala ambiental (Secció 2 del RD 58/2005). Actualment, l'Institut d'Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) (centre que lidera el projecte europeu BeXyl, referent a l'estudi de Xf) (87) ha definit les característiques tècniques i funcionals de les instal·lacions per garantir els estudis controlats amb aquest fitopatogen. Així doncs, i seguint les seves prescripcions tècniques, es treballarà amb Xf en un laboratori amb nivell de seguretat NCB2 del Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG), el qual permet la contenció de Xf per evitar el seu alliberament ambiental.

## Pressupost

S'exposa a continuació a la **Taula 2** el pressupost estimat per a la realització del projecte, el qual tindrà una duració de 2 anys i mig. Cal remarcar que es compta amb un laboratori amb les instal·lacions i equipament de microbiologia bàsic per a l'estudi que es realitzarà (cabina de bioseguretat classe II, centrífuga, espectrofotòmetre, agitador orbital, entre altres).

	<b>Personal</b>	
Contracte personal tècnic durant 2 anys i mig		80,000.00 €
	<b>Subtotal</b>	<b>80,000.00 €</b>
	<b>Viatges i dietes</b>	
Assistència a workshops i congressos		3,500.00 €
Estància en altres centres d'investigació		1,000.00 €
	<b>Subtotal</b>	<b>4,500.00 €</b>
	<b>Inventariables</b>	
Lector de microplaques		20,000.00 €
	<b>Subtotal</b>	<b>20,000.00 €</b>
	<b>Manteniment de Inventariable</b>	
Manteniment d'equips		6,500.00 €
	<b>Subtotal</b>	<b>6,500.00 €</b>
	<b>Fungible</b>	
Reactius i fungibles		1,200.00 €
Material de cultiu estèril		15,000.00 €
Kits i reactius per a la preparació de mostres per al servei de genòmica		2,000.00 €
Altres reactius i materials (inclosos plàstic i vidre)		10,000.00 €
	<b>Subtotal</b>	<b>28,200.00 €</b>
	<b>Altres despeses</b>	
Servei de Genòmica (MiSeq)		5,000.00 €
Soca d'estudi		100.00 €
Despeses de publicació en open-access journals		5,000.00 €
Inscripció a congressos		1,000.00 €
	<b>Subtotal</b>	<b>11,100.00 €</b>
	<b>Cost total</b>	<b>150,300.00 €</b>

**Taula 2.** Pressupost estimat per al projecte de recerca exposat.

## Bibliografia

1. Castro C, DiSalvo B, Roper MC. 2021. Xylella fastidiosa: A reemerging plant pathogen that threatens crops globally. PLoS Pathog 17:e1009813.
2. Gentile A. 2022. How Xylella came to Apulia. Nature Italy <https://doi.org/10.1038/d43978-022-00008-1>.
3. Kyrkou I, Pusa T, Ellegaard-Jensen L, Sagot M-F, Hansen LH. 2018. Pierce's Disease of Grapevines: A Review of Control Strategies and an Outline of an Epidemiological Model. Frontiers in Microbiology 9.
4. 2017. Enfermedades causadas por la bacteria Xylella fastidiosa. Cajamar Caja Rural, Almería.
5. Scally M, Schuenzel EL, Stouthamer R, Nunney L. 2005. Multilocus sequence type system for the plant pathogen Xylella fastidiosa and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. Appl Environ Microbiol 71:8491–8499.

6. Sicard A, Saponari M, Vanhove M, Castillo AI, Giampetruzzi A, Loconsole G, Saldarelli P, Boscia D, Neema C, Almeida RPP. 2021. Introduction and adaptation of an emerging pathogen to olive trees in Italy. *Microbial Genomics* 7.
7. EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/reporting/article-2371>. Retrieved 6 April 2023.
8. Greco D, Aprile A, De Bellis L, Luvisi A. 2021. Diseases Caused by *Xylella fastidiosa* in *Prunus* Genus: An Overview of the Research on an Increasingly Widespread Pathogen. *Frontiers in Plant Science* 12.
9. Cuntly A, Legendre B, de Jerphanion P, Dousset C, Forveille A, Paillard S, Olivier V. 2022. Update of the *Xylella fastidiosa* outbreak in France: two new variants detected and a new region affected. *Eur J Plant Pathol* 163:505–510.
10. Moralejo E, Gomila M, Montesinos M, Borràs D, Pascual A, Nieto A, Adrover F, Gost PA, Seguí G, Busquets A, Jurado-Rivera JA, Quetglas B, García J de D, Beidas O, Juan A, Velasco-Amo MP, Landa BB, Olmo D. 2020. Phylogenetic inference enables reconstruction of a long-overlooked outbreak of almond leaf scorch disease (*Xylella fastidiosa*) in Europe. *Commun Biol* 3:560.
11. Olmo D, Nieto A, Borràs D, Montesinos M, Adrover F, Pascual A, Gost PA, Quetglas B, Urbano A, García J de D, Velasco-Amo MP, Olivares-García C, Beidas O, Juan A, Marco-Noales E, Gomila M, Rita J, Moralejo E, Landa BB. 2021. Landscape Epidemiology of *Xylella fastidiosa* in the Balearic Islands. 3. *Agronomy* 11:473.
12. Marco-Noales E, Barbé S, Monterde A, Navarro-Herrero I, Ferrer A, Dalmau V, Aure CM, Domingo-Calap ML, Landa BB, Roselló M. 2021. Evidence that *Xylella fastidiosa* is the Causal Agent of Almond Leaf Scorch Disease in Alicante, Mainland Spain (Iberian Peninsula). *Plant Disease* 105:3349–3352.
13. Purcell AH. 1997. *Xylella Fastidiosa*, a Regional Problem or Global Threat? *Journal of Plant Pathology* 79:99–105.
14. Trkulja V, Tomić A, Iličić R, Nožinić M, Milovanović TP. 2022. *Xylella fastidiosa* in Europe: From the Introduction to the Current Status. *Plant Pathol J* 38:551–571.
15. Authority (EFSA) EFS, Delbianco A, Gibin D, Pasinato L, Boscia D, Morelli M. 2023. Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2022. *EFSA Journal* 21:e07726.
16. Potnis N, Kandel PP, Merfa MV, Retchless AC, Parker JK, Stenger DC, Almeida RPP, Bergsma-Vlami M, Westenberg M, Cobine PA, De La Fuente L. 2019. Patterns of inter- and intrasubspecific homologous recombination inform eco-evolutionary dynamics of *Xylella fastidiosa*. 9. *ISME J* 13:2319–2333.
17. Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S. 2008. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology* 46:243–271.
18. Caserta R, Takita MA, Targon ML, Rosselli-Murai LK, de Souza AP, Peroni L, Stach-Machado DR, Andrade A, Labate CA, Kitajima EW, Machado MA, de Souza AA. 2010. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 76:4250–4259.
19. Landa BB, Saponari M, Feitosa-Junior OR, Giampetruzzi A, Vieira FJD, Mor E, Robatzek S. 2022. *Xylella fastidiosa*'s relationships: the bacterium, the host plants, and the plant microbiome. *New Phytologist* 234:1598–1605.
20. Chatterjee S, Wistrom C, Lindow SE. 2008. A cell–cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2670–2675.
21. Ionescu M, Yokota K, Antonova E, Garcia A, Beaulieu E, Hayes T, Iavarone AT, Lindow SE. 2016. Promiscuous Diffusible Signal Factor Production and Responsiveness of the *Xylella fastidiosa* Rpf System. *mBio* 7:e01054-16.
22. Killiny N, Prado SS, Almeida RPP. 2010. Chitin Utilization by the Insect-Transmitted Bacterium *Xylella fastidiosa*. *Appl Environ Microbiol* 76:6134–6140.
23. Cabezas-Cruz A, Maitre A. 2022. Is Plant Microbiota a Driver of Resistance to the Vector-Borne Pathogen *Xylella fastidiosa*? 12. *Pathogens* 11:1492.

24. Anguita-Maeso M, Ares-Yebra A, Haro C, Román-Écija M, Olivares-García C, Costa J, Marco-Noales E, Ferrer A, Navas-Cortés JA, Landa BB. 2022. *Xylella fastidiosa* Infection Reshapes Microbial Composition and Network Associations in the Xylem of Almond Trees. *Front Microbiol* 13:866085.
25. Bucci EM. 2018. *Xylella fastidiosa*, a new plant pathogen that threatens global farming: Ecology, molecular biology, search for remedies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 502:173–182.
26. Moll L, Baró A, Montesinos L, Badosa E, Bonaterra A, Montesinos E. 2022. Induction of Defense Responses and Protection of Almond Plants Against *Xylella fastidiosa* by Endotherapy with a Bifunctional Peptide. *Phytopathology* 112:1907–1916.
27. Montalá Magriñà R. 2006. *Evolució del treball de la terra a Catalunya*. Cossetània Edicions : Museu de Carros i Eines del Camp, Valls.
28. Cavanilles AJ. 1978. *Observaciones sobre la historia natural, geografía, agricultura, población y frutos del Reyno de Valencia*. 23. ed.; [Nachdr. der Ausg.] Madrid 1797. Valencia.
29. Anuario de Estadística 2020. Capítulo 07: Superficies y producciones de cultivos. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2020/default.aspx?parte=3&capitulo=07&grupo=10&seccion=1>. Retrieved 22 March 2023.
30. Coromines J, Casacuberta JM de. 1989. *Onomasticon Cataloniae: Els noms de lloc i noms de persona de totes les terres de llengua catalana*. L-N. V. Curial Edicions Catalanes.
31. Morey A, Fornés J. 2021. El cultivo tradicional del almendro en el Mediterráneo: Baleares en el contexto español (ca. 1770-2017). *HIST AGRAR* 107–140.
32. 2020. Reglamento de Ejecución (UE) 2020/1201 de la Comisión de 14 de agosto de 2020 sobre medidas para evitar la introducción y la propagación dentro de la Unión de *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) OJ L.
33. Almeida RPP, Blua MJ, Lopes JRS, Purcell AH. 2005. Vector Transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying Fundamental Knowledge to Generate Disease Management Strategies. *an* 98:775–786.
34. *Xylella fastidiosa* pest risk assessment. *EFSA Journal* <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3989>.
35. Mourou M, Hanani A, D'Onghia AM, Davino SW, Balestra GM, Valentini F. 2022. Antagonism and Antimicrobial Capacity of Epiphytic and Endophytic Bacteria against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. 6. *Agronomy* 12:1266.
36. Zicca S, De Bellis P, Masiello M, Saponari M, Saldarelli P, Boscia D, Sisto A. 2020. Antagonistic activity of olive endophytic bacteria and of *Bacillus* spp. strains against *Xylella fastidiosa*. *Microbiological Research* 236:126467.
37. El Handi K, Sabri M, Valentini F, De Stradis A, Achbani EH, Hafidi M, El Moujabber M, Elbeaino T. 2022. Exploring Active Peptides with Antimicrobial Activity In Planta against *Xylella fastidiosa*. 11. *Biology* 11:1685.
38. Moll L, Badosa E, Planas M, Feliu L, Montesinos E, Bonaterra A. 2021. Antimicrobial Peptides With Antibiofilm Activity Against *Xylella fastidiosa*. *Frontiers in Microbiology* 12.
39. Maddox CE, Laur LM, Tian L. 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol* 60:53–58.
40. Toney JH, Koh ML. 2006. Inhibition of *Xylella Fastidiosa* Biofilm Formation via Metal Chelators. *JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation* 11:30–32.
41. Helman Y, Chernin L. 2015. Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular Plant Pathology* 16:316–329.
42. Rapticavoli J, Ingel B, Blanco-Ulate B, Cantu D, Roper C. 2018. *Xylella fastidiosa*: an examination of a re-emerging plant pathogen. *Molecular Plant Pathology* 19:786–800.
43. Tang JL, Liu YN, Barber CE, Dow JM, Wootton JC, Daniels MJ. 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet* 226:409–417.
44. Cobine PA, Cruz LF, Navarrete F, Duncan D, Tygart M, De La Fuente L. 2013. *Xylella fastidiosa* Differentially Accumulates Mineral Elements in Biofilm and Planktonic Cells. *PLoS One* 8:e54936.



45. Zaini PA, Fogaça AC, Lupo FGN, Nakaya HI, Vêncio RZN, da Silva AM. 2008. The Iron Stimulon of *Xylella fastidiosa* Includes Genes for Type IV Pilus and Colicin V-Like Bacteriocins. *Journal of Bacteriology* 190:2368–2378.
46. Rai R, Javvadi S, Chatterjee S. 2015. Cell–cell signalling promotes ferric iron uptake in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that contribute to its virulence and growth inside rice. *Molecular Microbiology* 96:708–727.
47. Pandey SS, Chatterjee S. 2022. Insights into the Cell-to-Cell Signaling and Iron Homeostasis in *Xanthomonas* Virulence and Lifestyle. *Phytopathology*® 112:209–218.
48. Ionescu M, Baccari C, Da Silva AM, Garcia A, Yokota K, Lindow SE. 2013. Diffusible Signal Factor (DSF) Synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* Is a Multifunction Protein Also Required for Response to DSF. *J Bacteriol* 195:5273–5284.
49. Meng Y, Li Y, Galvani CD, Hao G, Turner JN, Burr TJ, Hoch HC. 2005. Upstream Migration of *Xylella fastidiosa* via Pilus-Driven Twitching Motility. *J Bacteriol* 187:5560–5567.
50. Toney JH, Koh ML. 2006. Inhibition of *Xylella Fastidiosa* Biofilm Formation via Metal Chelators. *SLAS Technology* 11:30–32.
51. Chatterjee S, Sonti RV. 2002. rpfF Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Are Deficient for Virulence and Growth Under Low Iron Conditions. *MPMI* 15:463–471.
52. He Y-W, Deng Y, Miao Y, Chatterjee S, Tran TM, Tian J, Lindow S. 2023. DSF-family quorum sensing signal-mediated intraspecies, interspecies, and inter-kingdom communication. *Trends in Microbiology* 31:36–50.
53. Behnsen J, Raffatellu M. 2016. Siderophores: More than Stealing Iron. *mBio* 7:e01906-16.
54. Silva-Stenico ME, Pacheco FTH, Rodrigues JLM, Carrilho E, Tsai SM. 2005. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol Res* 160:429–436.
55. McGarvey JA, Connell JH, Stanker LH, Hnasko R. 2014. Bacterial population structure and dynamics during the development of almond drupes. *J Appl Microbiol* 116:1543–1552.
56. Jo Y, Cho JK, Choi H, Chu H, Lian S, Cho WK. 2015. Bacterial communities in the phylloplane of *Prunus* species. *J Basic Microbiol* 55:504–508.
57. Madhaiyan M, Suresh Reddy BV, Anandham R, Senthilkumar M, Poonguzhali S, Sundaram SP, Sa T. 2006. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. *Curr Microbiol* 53:270–276.
58. Juma PO, Fujitani Y, Alessa O, Oyama T, Yurimoto H, Sakai Y, Tani A. 2022. Siderophore for Lanthanide and Iron Uptake for Methylo trophy and Plant Growth Promotion in *Methylobacterium aquaticum* Strain 22A. *Frontiers in Microbiology* 13.
59. Lacava PT, Silva-Stenico ME, Araújo WL, Simionato AVC, Carrilho E, Tsai SM, Azevedo JL. 2008. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Pesq agropec bras* 43:521–528.
60. I A, V S, P.G L, R L, F N. 2019. *Methylobacterium* spp., endophytes of olive trees, as potential biocontrol agents of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. 2nd European Conference on *Xylella fastidiosa* 2019, 29-30 October, Ajaccio, France. Zenodo.
61. 15. Finca experimental de Les Borges Blanques. IRTA. <https://www.irta.cat/es/centre/15-finca-experimental-de-les-borges-blanques/>. Retrieved 20 May 2023.
62. Longchar B, Phukan T, Yadav S, Senthil-Kumar M. 2020. An efficient low-cost xylem sap isolation method for bacterial wilt assays in tomato. *Appl Plant Sci* 8:e11335.
63. Alexou M, Peuke AD. 2013. Methods for Xylem Sap Collection, p. 195–207. *In* Maathuis, FJM (ed.), *Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.
64. Zaini PA, De La Fuente L, Hoch HC, Burr TJ. 2009. Grapevine xylem sap enhances biofilm development by *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiology Letters* 295:129–134.

65. Green PN. 2006. *Methylobacterium*, p. 257–265. In Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, K-H, Stackebrandt, E (eds.), *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. Springer, New York, NY.
66. Cantabella D, Dolcet-Sanjuan R, Casanovas M, Solsona C, Torres R, Teixidó N. 2020. Inoculation of in vitro cultures with rhizosphere microorganisms improve plant development and acclimatization during immature embryo rescue in nectarine and pear breeding programs. *Scientia Horticulturae* 273:109643.
67. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca).
68. Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56.
69. Dimkpa C. 2016. Microbial siderophores: Production, detection and application in agriculture and environment. *Endocytobiosis and Cell Research* 27:7–16.
70. Shin SH, Lim Y, Lee SE, Yang NW, Rhee JH. 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiological Methods* 44:89–95.
71. Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. 2011. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J Microbiol Biol Educ* 12:51–53.
72. Payne SM. 1994. [25] Detection, isolation, and characterization of siderophores, p. 329–344. In *Methods in Enzymology*. Elsevier.
73. Takase H, Nitana H, Hoshino K, Otani T. 2000. Impact of Siderophore Production on *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Immunosuppressed Mice. *Infect Immun* 68:1834–1839.
74. Lacava PT, Silva-Stenico ME, Araújo WL, Simionato AVC, Carrilho E, Tsai SM, Azevedo JL. 2008. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. *Pesq agropec bras* 43:521–528.
75. Machuca A, Milagres A m. f. 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology* 36:177–181.
76. Senthilkumar M, Amaresan N, Sankaranarayanan A. 2021. *Plant-Microbe Interactions: Laboratory Techniques* <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0>.
77. Srivastava P, Sahgal M, Sharma K, Enshasy HAE, Gafur A, Alfarraj S, Ansari MJ, Sayyed RZ. 2022. Optimization and identification of siderophores produced by *Pseudomonas monteillii* strain MN759447 and its antagonism toward fungi associated with mortality in *Dalbergia sissoo* plantation forests. *Frontiers in Plant Science* 13.
78. S. VK, Menon S, Agarwal H, Gopalakrishnan D. 2017. Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores. *Resource-Efficient Technologies* 3:434–439.
79. Grossi CEM, Fantino E, Serral F, Zawoznik MS, Fernandez Do Porto DA, Ulloa RM. 2020. *Methylobacterium* sp. 2A Is a Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Has the Potential to Improve Potato Crop Yield Under Adverse Conditions. *Front Plant Sci* 11:71.
80. X. <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/cect/catalogo-cepas/medios-cultivo/lista-bacterias/-x-1285892319958.html>. Retrieved 16 April 2023.
81. Recuperación de cultivos liofilizados de la CECT. <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/coleccion-espanola-cultivos-tipo/recuperacion-cultivos-liofilizados-cect-1285872233521/Recurs.html?id=1286053041583>. Retrieved 16 April 2023.
82. Blevé G, Marchi G, fra francesco. ranaldi@unifi. it, Gallo A, Cimaglia F, Logrieco A, Mita G, Ristori J, Surico G. 2016. Molecular characteristics of a strain (Salento-1) of *Xylella fastidiosa* isolated in Apulia (Italy) from an olive plant with the quick decline syndrome. *Phytopathologia Mediterranea* 55:139–146.
83. Almeida RPP, Mann R, Purcell AH. 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. *Curr Microbiol* 48:368–372.

84. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 6:71–79.
85. O'Toole GA. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp* 2437.
86. CECT. <https://www.cect.org/vstrn.php?lan=es&cect=9984>. Retrieved 14 May 2023.
87. CSIC. 2022. El CSIC lidera un proyecto internacional para mitigar los daños generados por la bacteria 'Xylella fastidiosa.' Consejo Superior de Investigaciones Científicas. <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/el-csic-lidera-un-proyecto-internacional-para-mitigar-los-danos-generados-por-la>. Retrieved 14 May 2023.
88. Cantabella D, Mendoza CR, Teixidó N, Vilaró F, Torres R, Dolcet-Sanjuan R. 2022. GreenTray® TIS bioreactor as an effective in vitro culture system for the micropropagation of *Prunus* spp. rootstocks and analysis of the plant-PGPMs interactions. *Scientia Horticulturae* 291:110622.
89. Ugandhar T, Venkateshwarlu M, Reddy K. 2018. Major Constrains and Verdict of Crop Productivity.
90. Roselló M, Ferrer A, Peris-Peris C, Llopis JM, Rallo E, Pacheco B, Climent E, Moreno AM, Sansaloni E, Gómez MF, Nebot V, Ríus L, Jorge MD, Serrablo I, Saéz JV, Piñeiro F, Úbeda S, Estivalis R, Aragón C. *Xylella fastidiosa* en la Comunidad Valenciana.
91. Martorell MM. Estudi de la susceptibilitat varietal de vinya i ametller a *Xylella fastidiosa* a Mallorca.
92. Masip D, Torguet L, Batlle I, Alegre S, Miarnau X. 2018. Almond fruit tolerance to frost temperatures in new Spanish cultivars. *Acta Hort* 67–72.

## Annex 1

Per a l'aplicació *in planta*, es realitzarà prèviament un cultiu *in vitro* d'ametller per disposar de tres plantes en condicions d'asèpsia. Per això, els cultius *in vitro* es realitzaran a partir d'àpexs de brot de la varietat d'ametller Marcona empeltada amb el patró d'arrel Rootpac® 20 (RP-20) (Agromillora Group, Espanya). El material vegetal es cultivarà mitjançant el mètode de micropropagació *in vitro*, tal i com descriuen Cantabella *et al.* (2022) (88). Aquesta tècnica està àmpliament implementada en el cultiu de vegetals lliure de malalties (89). Amb l'objectiu d'obtenir resultats que siguin útils per a les necessitats de producció d'ametlles, s'ha seleccionat la varietat Marcona ja que és autòctona a la província d'Alacant, regió d'elevada prevalença de Xf (90). A més, tot i ser forana a les Illes Balears i Catalunya, també hi és present i és de les que exhibeix major grau d'afectació durant la infecció (91). Cal destacar que, a més, diversos autors l'han considerada com una de les millors en termes de productivitat front els escenaris de canvi climàtic (92). Un cop es dispose de les plàntules, es realitzarà la inoculació amb Xf i *Methylobacterium* spp. mitjançant punció de la tija amb un preparat de suspensió bacteriana ajustada turbidomètricament en espectrofotòmetre a una DO600 equivalent a un McFarland 0,5 (72). El control negatiu es realitzarà amb la inoculació de sèrum fisiològic estèril. El control positiu consistirà en la inoculació de Xf. Després que l'ametller comenci a mostrar simptomatologia d'ALSD, la confirmació de la presència de Xf en la planta es farà segons els protocols descrits per l'Organització Europea i Mediterrània de Protecció de Plantes (EPPO) (92): extracció del DNA a partir del teixit vegetal amb el mètode basat en CTAB o bromur d'hexadeciltrimetilamoni i detecció de Xf amb PCR en temps real segons Li *et al.* (2013). Al seu torn, s'observarà l'aparició de simptomatologia en la planta

inoculada amb Xf i es compararà amb l'aparença de la planta inoculada amb ambdós bacteris.  
Es realitzarà un seguiment de 6 mesos de duració.