

# *Xanthomonas*

## un género de bacterias fitopatógenas con una alta especialización

Jaime Cubero, Cristina Redondo, Pilar Sabuquillo, Marta Sena-Vélez,  
Jerson Garita-Cambroner y Elisa Ferragud

Grupo de Bacteriología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Crta de La Coruña Km 75. Madrid 28040

[cubero@inia.es](mailto:cubero@inia.es)



Foto de grupo. Grupo de Bacteriología del INIA. De izquierda a derecha, arriba: Cristina Redondo, Jaime Cubero, Pilar Sabuquillo, Jerson Garita-Cabrero. Abajo: Marta Sena-Vélez, Elisa Ferragud.

sables de enfermedades en plantas ornamentales de alto valor económico. Al mismo tiempo, el género *Xanthomonas* constituye un grupo de bacterias extremadamente interesante desde un punto de vista microbiológico por presentar una alta especificidad por el huésped, de tal manera que cepas pertenecientes a una misma especie pueden infectar de forma exclusiva huéspedes diferentes (Hayward, 1993; Rodríguez-R *et al.*, 2012).

En el grupo de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) nos hemos centrado en el estudio de bacterias del género *Xanthomonas* siguiendo dos líneas de investigación: abordamos, por un lado la puesta a punto de métodos de detección, identificación y caracterización de cepas de *Xanthomonas*, y por otro, el estudio de la interacción de estas bacterias con el entorno que las rodea, y en especial con la planta.

### ***XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI* Y *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *PRUNI* CAUSANTES DE LA CANCROSIS DE LOS CÍTRICOS Y LA MANCHA BACTERIANA DE LOS FRUTALES DE HUESO Y ALMENDRO**

Nuestro grupo trabaja en colaboración con otros grupos tanto nacionales como internacionales, principalmente con dos modelos de *Xanthomonas* infectan especies leñosas de plantas.

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) produce la cancrrosis o chancro de los cítricos, caracterizada por la aparición de lesiones en hojas y frutos (Figura 1a). La cancrrosis está extendida a nivel mundial y se encuentra en muchas de

El género *Xanthomonas* contiene principalmente especies de bacterias que causan graves enfermedades en plantas de utilidad agrícola y comercial. Destaca su presencia en cultivos de elevado interés como arroz, algodón, especies hortícolas como tomate o pimiento y plantas leñosas como los cítricos o los frutales de hueso. Además, son respon-

las zonas productoras de cítricos aunque no se ha descrito en Europa ni en ningún país del área mediterránea (López y Cubero, 2001). *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) produce la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro, enfermedad descrita recientemente en España (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014) y caracterizada también por la aparición de manchas en hojas y frutos (Figura 1b). Ambas enfermedades representan un serio problema para la agricultura, principalmente porque los frutos afectados son difícilmente comerciables y porque los árboles enfermos disminuyen generalmente su productividad. Cabe destacar que ambas enfermedades son consideradas de cuarentena en numerosas zonas del mundo, entre ellas la Unión Europea (DOCE, 2000), por lo que su presencia en un área limita el mercado de plantas y frutos desde ésta.

### DETECCIÓN, Y CARACTERIZACIÓN DE XANTHOMONAS, ASPECTOS ESENCIALES PARA EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES QUE PRODUCEN

La primera medida en cualquier estrategia de control de enfermedades de plantas se debe basar inicialmente en la exclusión del patógeno y para ello se requieren **métodos de detección, identificación y caracterización** que sean rápidos, precisos y fiables.

Nuestro grupo ha trabajado en la puesta a punto de métodos de PCR convencional o en tiempo real para la detección de *Xcc* cuando se encuentra en bajas concentraciones, asimismo, hemos desarrollado estrategias que evitan falsos negativos en el diagnóstico de la **cancrosis de los cítricos** (Gomohammadi *et al.*, 2007). Además, se han desarrollado protocolos para la detección exclusiva de bacterias viables basados en la amplificación de fragmentos de ARNm de baja estabilidad (Golmohammadi *et al.*, 2012). Dentro de la línea dirigida a la identificación y caracterización de *Xanthomonas* patógenas de cítricos, hemos trabajado en técnicas para la localización del origen de los

focos de la enfermedad en diferentes áreas, así como para la discriminación de cepas de amplia y limitada gama de huésped, aspectos fundamentales en los programas de erradicación de la enfermedad (Cubero y Graham, 2002, 2004, 2005)

En relación a la **mancha bacteriana de los frutales de hueso** hemos participado en el desarrollo de protocolos de PCR en tiempo real para la detección de *Xap* en las distintas especies de *Prunus* (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011). Además, en un trabajo reciente, hemos realizado una caracterización fenotípica y genotípica de cepas españolas de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* mediante análisis de secuencias multilocus, que nos ha permitido identificar cepas de *Xanthomonas arboricola* diferentes a las *Xap* descritas hasta el momento, y que en la actualidad son consideradas *Xap* «look-a-like» (Garita-Cambronero *et al.*, 2012). Adicionalmente hemos obtenido la secuencia del genoma completo de algunas de estas cepas e identificado en *Xap* factores de virulencia mediante estudios comparativos (Garita-Cambronero *et al.*, 2014)

### LA CANCROSIS DE LOS CÍTRICOS Y LA MANCHA BACTERIANA DE LOS FRUTALES DE HUESO: DOS ENFERMEDADES PROVOCADAS POR XANTHOMONAS Y DOS PROCESOS DIFERENTES DE INFECCIÓN

Las bacterias del género *Xanthomonas*, al igual que otras muchas bacterias, se **agregan de forma organizada formando biopelículas**. En el caso de la cancrosis de los cítricos, hemos demostrado que esta capacidad es utilizada por *Xcc* como estrategia de supervivencia cuando se encuentra en condiciones adversas en la superficie vegetal, o en los estadios iniciales de la infección en el apoplasto (Figura 2) (Cubero *et al.*, 2011). Para que se produzca la biopelícula son necesarias determinadas condiciones de temperatura y humedad y un huésped apropiado

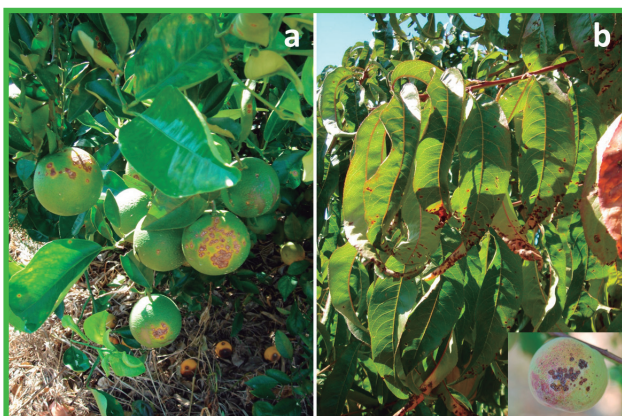


Figura 1. Síntomas en hojas y frutos de la cancrosis de los cítricos (a) y la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (b).

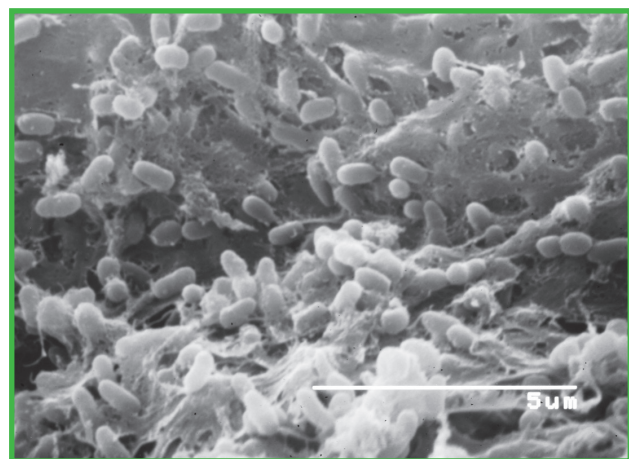


Figura 2. Biopelícula formada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en hoja de naranjo.

(Sena-Vélez *et al.*, 2014). En nuestro grupo además hemos caracterizado parcialmente la matriz de las biopelículas de *Xcc* y hemos encontrado que contiene **ADN extracelular y fibras de Pili tipo IV**. Asimismo, hemos observado que cepas que presentan diferente gama de huésped muestran diferencias en cuanto a la formación de las biopelículas y estas diferencias están relacionadas tanto con la producción de ADN extracelular como con la expresión de genes correspondiente al Pili tipo IV. En los estudios dirigidos a establecer diferencias entre las cepas de *Xcc* con distinta gama de huésped, también hemos incidido en otros aspectos como el papel que juegan los fenómenos de respuesta poblacional o **quorum sensing**, así como el de los procesos de **motilidad y quimiotaxis** (Sena-Vélez, Tesis Doctoral).

*Xap* posee mayor capacidad para sobrevivir en superficie vegetal y su agregación (Figura 3), al contrario de lo que ocurre en *Xcc*, está favorecida por la presencia de nutrientes y cuando existen condiciones para el crecimiento de la población (Sabuquillo *et al.*, 2014). Esta diferente capacidad para formar biopelículas en superficie vegetal respecto a *Xcc*, no hace más que confirmar una constatación que ya se tenía sobre el carácter epifita de esta bacteria en algunas partes de su ciclo vital, contrariamente a lo que le ocurre a *Xcc*, que no presenta normalmente esta fase.

Además de las diferencias que hemos encontrado en la capacidad para formar biopelículas entre *Xcc* y *Xap* y en las diferentes condiciones que lo propician para cada una de ellas, también hemos observado divergencias en otros aspectos como la motilidad y quimiotaxis. A diferencia de *Xcc*, *Xap* muestra un movimiento en superficie mediado por flagelo tipo «swarming» que pensamos puede estar relacionado con esa mayor capacidad epifita (Figura 4). Otros aspecto que hemos encontrado diferente entre los dos modelos bacterianos es en relación a procesos de quimiotaxis, y así por ejemplo, mientras que las cepas de *Xcc* presentan una homogeneidad clara en el contenido de **proteínas aceptoras de grupos metilo o MCPs**,

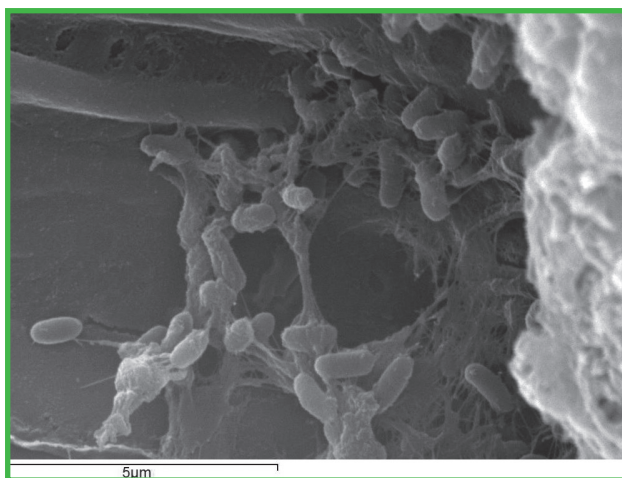


Figura 3. Biopelícula formada por *Xanthomonas arboricola* pv. pruni en hoja de almendro.

involucradas en quimiotaxis, en un estudio realizado en *Xap*, hemos observado una gran diversidad de estas proteínas entre las cepas (Garita-Cambroner *et al.*, 2013).

En resumen, *Xcc* parece formar preferentemente biopelículas una vez ha alcanzado el apoplasto, posiblemente para desencadenar los procesos moleculares que dan lugar a la liberación de nutrientes y crecimiento de la población en el interior del tejido vegetal. Sin embargo, *Xap* se agrega durante su fase epifita para incrementar su población en superficie y facilitar la posterior infección del interior de los tejidos vegetales. La agregación y formación de biopelículas además, están relacionadas con procesos diferentes de motilidad en ambos modelos.

## CONCLUSIONES

El fenómeno de la globalización conlleva la diseminación de enfermedades de las plantas a lo largo del planeta e implica la necesidad de disponer de estrategias eficaces para su control que deben estar acordes con la preservación del medio ambiente. Un aspecto esencial en el control de enfermedades es el desarrollo de métodos de detección e identificación de las bacterias responsables de las mismas y especialmente de aquellas consideradas de cuarentena. Además, es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos de infección y

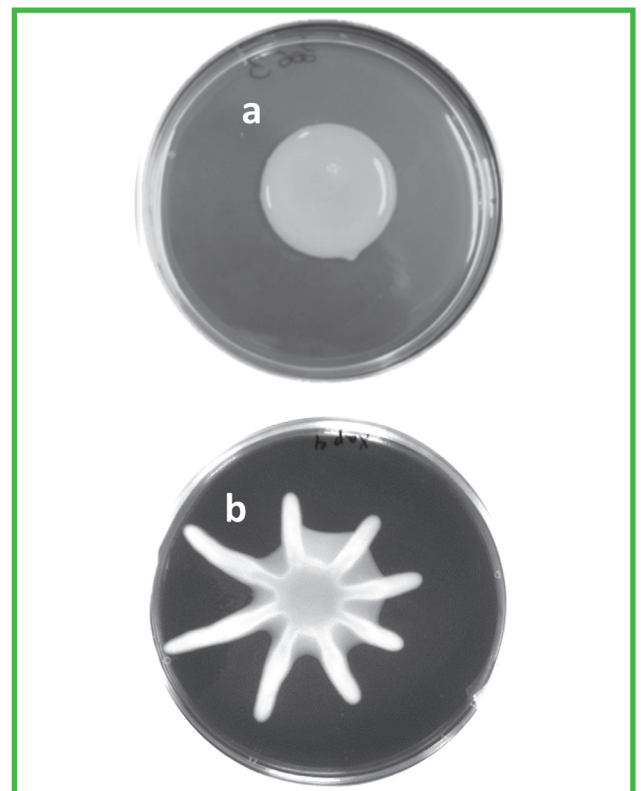


Figura 4. Movimiento en superficie de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (a) y *Xanthomonas arboricola* pv. pruni (b).

para ello son de extremada utilidad los estudios comparativos entre enfermedades similares provocadas por especies o cepas próximas taxonómicamente, pero con mecanismos de infección diferentes, como es el caso de *Xanthomonas*. El conocimiento de los mecanismos implicados en los primeros estadios de infección permitirá el desarrollo de estrategias de control basados en el bloqueo de alguno de los pasos que forman parte del proceso, evitando el avance de las enfermedades bacterianas.

## COMPONENTES DEL GRUPO DE BACTERIOLOGÍA DEL INIA

**Jaime Cubero Dabrio.** Doctor en Biología por la Universidad de Valencia, en la actualidad es Científico Titular en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Realizó la Tesis Doctoral en *Agrobacterium tumefaciens*, causante de tumores en plantas, bajo la dirección de la Dra. María Milagros López en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Una vez terminado su periodo doctoral, trabajó cinco años en el Citrus Research and Education Center (CREC) de la Universidad de Florida en diferentes aspectos relacionados con la cancrrosis de los cítricos. En la actualidad, dirige en el INIA un grupo, de reciente creación, cuyo objetivo es el estudio de Bacterias Fitopatógenas y las enfermedades que producen. Además, actualmente es Vicepresidente de la Sociedad Española de Fitopatología.

**Cristina Redondo Casero.** Doctora en Biología por la Universidad Politécnica de Madrid, en 2007 obtuvo una plaza de Técnico Superior Especialista de los Organismos Públicos de Investigación. Realizó la Tesis Doctoral «Enfermedades fúngicas de degradación de la madera de vid» (*Vitis vinifera* L.) bajo la dirección del Dr. Eloy Mateo-Sagasta, catedrático de Patología Vegetal de la E.T.S.I. Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, y la Dra. María Luisa Tello, Posteriormente, trabajó durante tres años en el INIA en el grupo de Patología Vegetal. En la actualidad pertenece al grupo de Bacteriología en el que desarrolla su actividad.

**Pilar Sabuquillo Castrillo.** Doctora en CC. Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid. Su Tesis Doctoral sobre la utilización de enzimas microbianas en biotransformaciones fue desarrollada en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC y dirigida por el Profesor José Manuel Guisan Seijas. Durante este tiempo realizó una estancia en la Universidad de Strathclyde (Escocia). Posteriormente empezó a trabajar como post-doctoral en el INIA en el departamento de Protección Vegetal en el control de hongos fitopatógenos. En la actualidad está contratada como Titulado Superior en el grupo de Bacteriología realizando distintos estudios sobre *Xanthomonas*.

**Marta Sena-Velez** es Doctora Ingeniero Agrónomo y ha defendido recientemente su Tesis Doctoral sobre procesos de quimiotaxis, motilidad y formación de biopelículas en *Xcc*. **Jerson Garita-Cambronero** es Profesor de la Universidad de Costa Rica y está realizando la Tesis Doctoral en el grupo de Bacteriología estudiando diferentes aspectos de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y almendro. **Elisa Ferragud** es técnico de laboratorio y desarrolla su actividad tanto en *Xap* como en *Xcc*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Cubero J, Graham JH.** (2002). Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl Environ Microbiol* 68: 1257-64.
- Cubero J, Graham JH.** (2004). The Leucine Responsive Regulatory Protein (*lrp*) for Characterization of the Relationship among *Xanthomonas* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 429-37.
- Cubero J y Graham JH.** (2005). Quantitative Real Time PCR for Bacterial Enumeration and Allelic Discrimination to Differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology* 95: 1333-40.
- Cubero J, Gell I, Johnson E, Redondo A, Jones JB, Graham JH.** (2011). Unstable green fluorescence protein for study of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* survival on citrus. *Plant Pathology* 60: 977-85.
- DOCE.** (2000). Directiva 2000/29/CE del Consejo de 8 de Mayo de 2000 relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L169: 1-112.
- Garita-Cambronero J, Sabuquillo P, Sena-Vélez M, Ferragud E, Redondo C, Palacio-Bielsa A, López MM, Cubero J.** (2012). Caracterización genotípica y estudio fenotípico de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* y de los procesos asociados a los primeros estadios de infección XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Málaga, España. *Libro de Resúmenes*, p80, PL-12. Málaga, España.
- Garita-Cambronero J, Sena-Vélez M, Sabuquillo P, Bianco MI, Ferragud E, Redondo C, Cubero J.** (2013). Early steps in the infection process in two *Xanthomonas* spp. models: chemotaxis and biofilm formation. 10<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology. *Acta Phytopathologica Sinica* p419, Q31.016, Beijing. China.
- Garita-Cambronero J, Sena-Vélez M, Palacio-Bielsa A, Cubero J.** (2014). Draft Genome Sequence of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strain Xap33, causal agent of Bacterial Spot Disease on Almond. *Genome Announcement* 2: e00440-14.
- Golmohammadi M, Cubero J, Peñalver J, Quesada JM, López MM, Llop P.** (2007). Diagnosis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods. *J Appl Microbiol* 103: 2309-15.
- Golmohammadi M, Llop P, Scuderi G, Gell I, Graham JH, Cubero J.** (2012). mRNA and rRNA for evaluation of viability for *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by monitoring stability of selected genes. *Plant Pathology* 61: 479-88
- Hayward AC.** (1993). The hosts of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*, eds. Swings, J. G and E. L Civerolo, 1-119. (London, UK: Chapman and Hall).
- López MM, Cubero J.** (2001). Bacteriosis de los cítricos con riesgo de introducción en España. *Phytoma* 130: 53-62.
- Palacio-Bielsa, Cubero J, Cambra MA, Collados R, Berruete IM, López MM.** (2011). Development of an efficient quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Appl Environ Microbiol* 77: 89-97
- Palacio-Bielsa A, Cambra MA, Cubero J, Garita-Cambronero J, Roselló M, López MM.** (2014). La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*), una grave enfermedad emergente en España. *Phytoma* 259: 36-42
- Rodríguez-R LM, Grajales A, Arrieta-Ortiz ML, Salazar C, Restrepo S, Bernal A.** (2012) Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiol* 12: 43.
- Sabuquillo P, Ferragud E, Cubero J.** (2014). Formación de biofilms en *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. *Libro de Resúmenes* p174, P-054-01236. Lleida, España.
- Sena-Vélez M, Redondo C, Gell I, Ferragud E, Johnson E, Graham JH, Cubero J.** (2014) Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. *Plant Pathology* 64: 767-775