



Programa Iberoamericano  
de Ciencia y Tecnología  
para el Desarrollo

# **RED FRUT SAN - Fortalecimiento de las estrategias para el control integrado de enfermedades y plagas priorizadas en el cultivo de frutales de carozo**

**Curso bacterias y virus (IVIA, Valencia, España)**

**17-21 noviembre 2014**



# Diagnóstico y detección de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*)

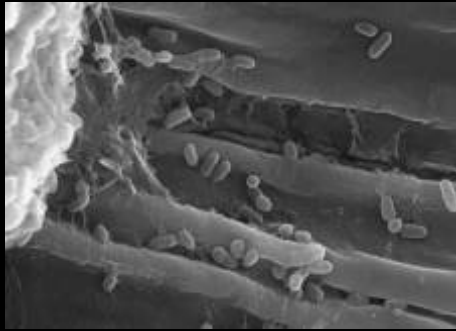
Ana Palacio Bielsa

Jaime Cubero Dabrio

María M. López González



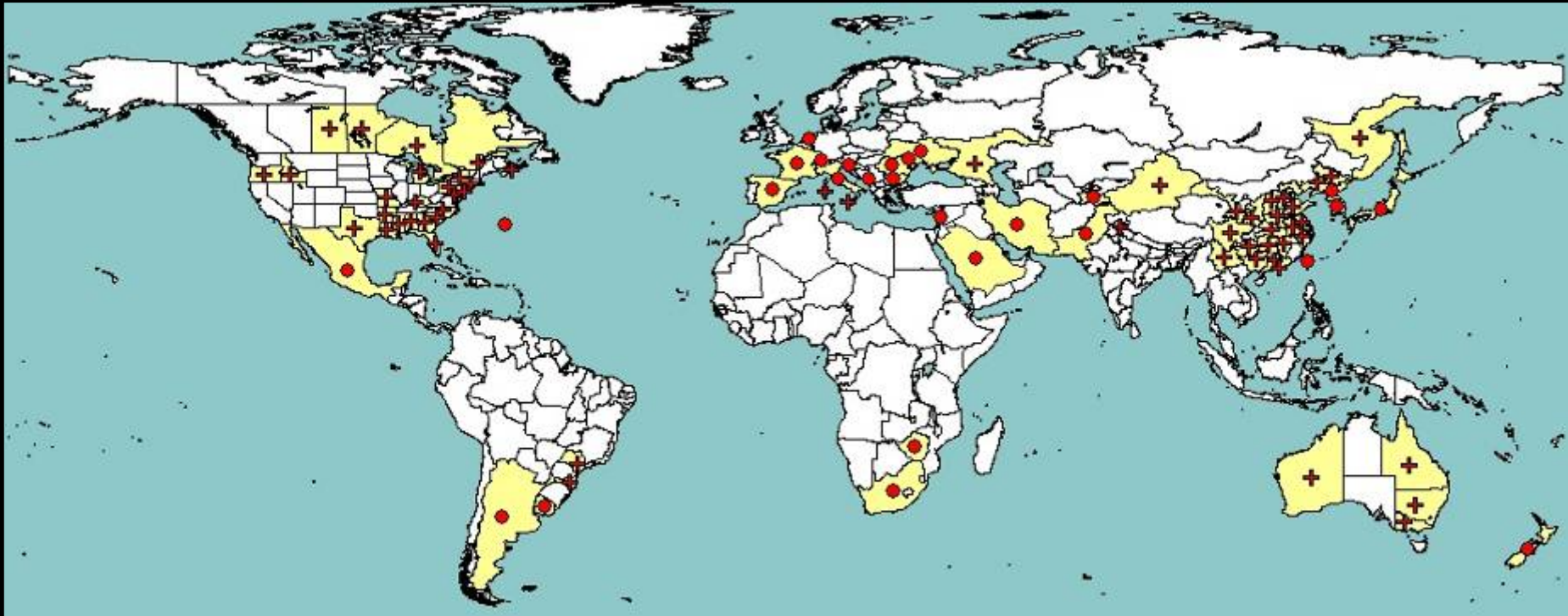
# Mancha bacteriana de frutales de hueso y almendro (*X. arboricola* pv. *pruni*)



- Detectada en España en 2002
- Patógeno de cuarentena en la UE
- Lesiones en frutos, hojas, brotes, ramas
- Seria defoliación (según huésped) y efecto en la producción
- Afecta a la calidad del fruto
- Enfermedad grave:
  - Difícil control
  - Fácil dispersión
  - Pérdidas económicas (campo y viveros)

# EPPO Plant Quarantine Retrieval System (2014)

<https://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>



- Presente (cita nacional)
- + Presente (cita subnacional)

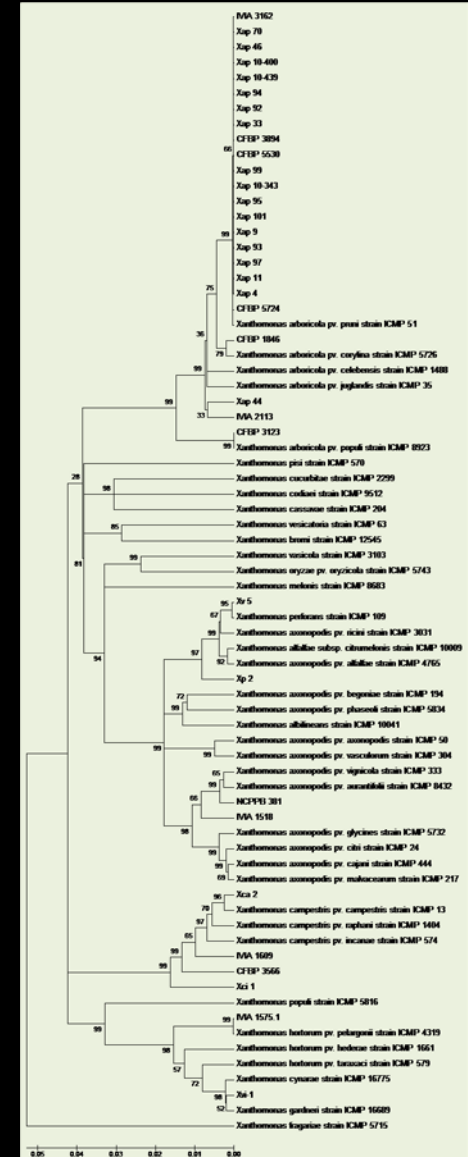
# Importancia de la enfermedad

- Frutos afectados carecen de valor comercial  
Debilitamiento del árbol y disminución de producción.  
Pérdidas material vegetal de reproducción (viveros)
- En **Estados Unidos** se ha citado que puede causar entre 25 y 75% de frutos no comercializables, en función del año (Dunegan, 1932)
- En **Italia** se ha estimado que las pérdidas pueden superar los 10.000 €/ha en ciruelo (Stefani, 2010)
- En **España (Aragón)** se han estimado pérdidas de cosecha de almendras (22,4%- 46,7%) y disminución del rendimiento (4,6%-11,3%) (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014)

# Mancha bacteriana de frutales de hueso y almendro: agente causal



- Causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*)
- Huéspedes: *Prunus* spp.
  - Melocotonero, albaricoquero, ciruelo, cerezo, almendro, *Prunus* ornamentales
- Existencia de cepas no clasificadas como *Xap* por técnicas moleculares  
*Xap* “look-a-like”  
*Xanthomonas arboricola*  
*Xanthomonas* spp.



# **Taxonomía de *X. arboricola* pv. *pruni***

- ***X. arboricola* pv. *pruni* (Smith 1903) Vauterin et al. 1995, es una Gammaproteobacteria perteneciente al orden *Xanthomonadales*, familia *Xanthomonadaceae* y género *Xanthomonas***
- **Las células presentan una forma bacilar, de tamaño 0,2-0,8  $\mu\text{m}$  de ancho y 0,8-1,7  $\mu\text{m}$  de largo, y móviles por un solo flagelo polar**
- **Gram negativa, aerobia estricta, con las características propias de su género (Bradbury, 1984)**

# Síntomas de la enfermedad



Hojas

Frutos

Brotes y ramas







**SÍNTOMAS  
EN  
HOJAS**

*Prunus ornamentales*  
*P. laurocerasus*



*Prunus laurocerasus*





## SÍNTOMAS EN FRUTOS



# CHANCROS (ciruelo japonés)



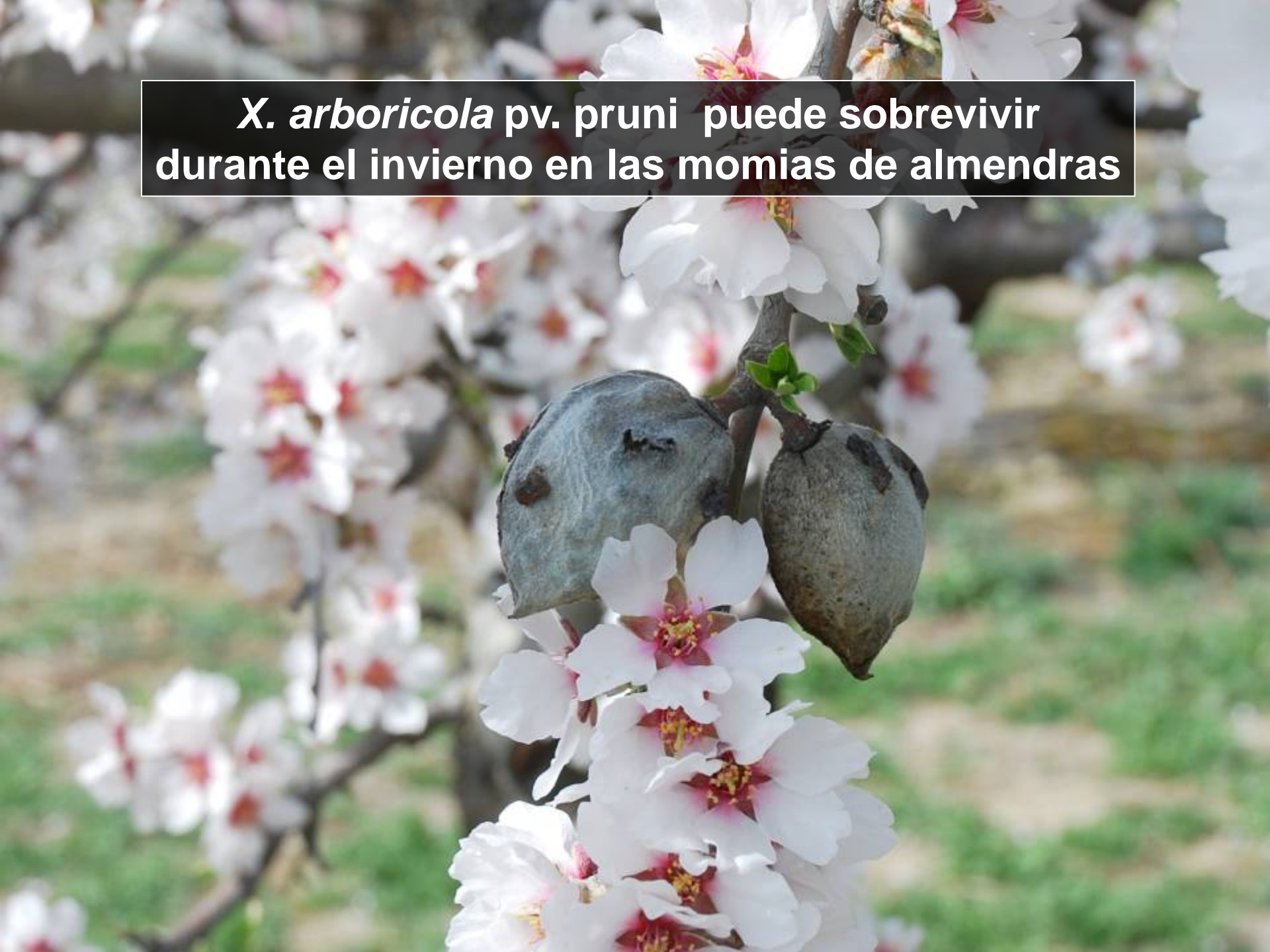
# CHANCROS



# Epidemiología de *X. arboricola* pv. *pruni*

- **Multiplicación** favorecida por temperaturas cálidas (19-28° C) y humedad elevada
- Bacteria epífita y endófito, que penetra por estomas o heridas en hojas, frutos y ramas
- **Transmisión:**
  - Corta distancia: lluvia, viento, prácticas culturales
  - Larga distancia: **material vegetal con o sin síntomas** (frecuentes infecciones latentes)
    - Por semilla en almendro (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014)
    - No hay vectores descritos

***X. arboricola* pv. *pruni* puede sobrevivir durante el invierno en las momias de almendras**





## *X. arboricola* pv. *pruni* en viveros en invernadero




# Plantas con síntomas



A photograph of a dense field of green plants, likely a crop, showing signs of asymptomatic infection. The plants are mostly green, but there are several clusters of leaves that are yellowed or chlorotic, indicating latent infections. The text is overlaid on a white box in the upper left quadrant.

**Plantas asintomáticas  
(infecciones latentes)**

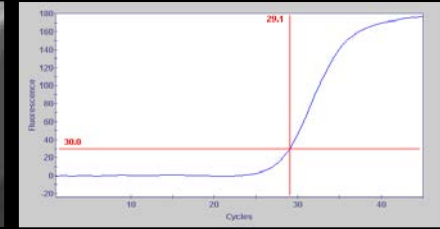
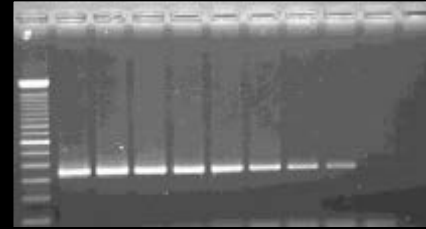


**Diagnóstico y detección en *Prunus* de  
*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni***

# Diagnóstico, detección e identificación

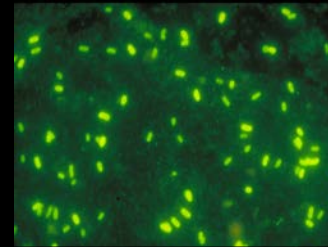
- **Diagnóstico y detección:**

- Aislamiento
- PCR convencional
- PCR en tiempo real
- *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*



- **Identificación:**

- Caracterización bioquímica
- API 20 NE, API 50 CH
- Perfil ácidos grasos y proteínas
- Inmunofluorescencia (IF), ELISA
- Tiras de flujo lateral
- ERIC y BOX PCR
- PCR convencional y en tiempo real
- Inoculación:



-HR (tabaco + 72h; tomate + 48h)

-Bioensayo hoja cortada o planta (ciruelo, melocotonero, almendro, GF-305)

# Diagnóstico y detección

## *X. arboricola* pv. *pruni*



# Aislamiento en medios de cultivo

**Medios generales:** LPGA, YDC, Wilbrink, SP

**Medios semiselectivos:** mXCP1, XPSM



**Medio LPGA**



PCR cultivos o material vegetal

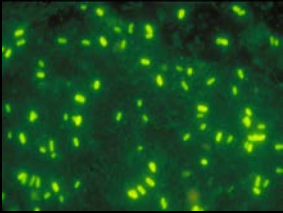
**Identificación**  
***X. arboricola* pv. *pruni***



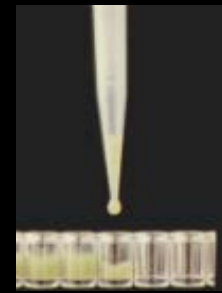


**PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y NUTRICIONALES****RESULTADO**

<b>Gram (KOH)</b>	<b>Gram negativa</b>
<b>Oxidasa</b>	<b>- (+d)</b>
<b>Catalasa</b>	<b>+</b>
<b>O/F de glucosa (Hugh-Leifson)</b>	<b>+/- (5 d)</b>
<b>Reducción nitratos</b>	<b>- (5 d)</b>
<b>Arginina dihidrolasa (medio de Thornley)</b>	<b>- (5 d)</b>
<b>Ureasa</b>	<b>- (5 d)</b>
<b>Indol</b>	<b>- (5 d)</b>
<b>Levano</b>	<b>+ (3 d)</b>
<b>Hidrólisis gelatina</b>	<b>+ (3 d)</b>
<b>Hidrólisis Tween 80</b>	<b>+ (3 d)</b>
<b>Hidrólisis esculina</b>	<b>+ (24 h)</b>
<b>Citrato de Simmons</b>	<b>+ (5 d)</b>
<b>Crecimiento NB a 37°C</b>	<b>- (5 d)</b>
<b>Almidón</b>	<b>+ (3 d)</b>
<b>API 20 NE (bioMérieux, Francia)</b> (Suspensiones bacterianas aprox. 10 <sup>6</sup> ufc/ml)	<b>+</b> : Hid. esculina, Hid. gelatina, betagalactosidasa, utilización glucosa en anaerobiosis, manosa, N-acetilglucosamina, malato, citrato, maltosa <b>(mayoría negativas)</b>
<b>API 50 CH (bioMérieux, Francia)</b> (Suspensiones bacterianas aprox. 10 <sup>6</sup> ufc/ml)	<b>+</b> : N-acetilglucosamina, esculina <b>V</b> : glicerol, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, celobiosa, sacarosa, tralosa, D-fucosa, L-fucosa, 2-cetogluconato y almidón



# SEROLOGÍA



<b>IF y ELISA (policlonales)</b>	<b>IF (ADGEN)</b>	<b>ELISA (SEDIAG)</b>	<b>ELISA (AGDIA)</b>
<b>Dilución</b>	1/8000 1/4000	1/100 1/100	1/200 1/200
<b>Precio</b>	549 €/ 500 análisis	206 €/ 500 análisis	306 €/ 1000 análisis
<b>Lecturas</b>	1 día	2 horas	1 hora
<b>Especificidad</b>	Género* <i>Xanthomonas</i>	Género* <i>Xanthomonas</i>	Género <i>Xanthomonas</i>

\**Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

## Tiras de flujo lateral

# Hipersensibilidad tabaco



# Verificación patogenicidad (inoculación *Prunus* spp.)

## Hoja cortada



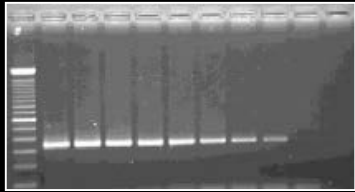
Impregnación con torunda de algodón



Infiltración con jeringuilla

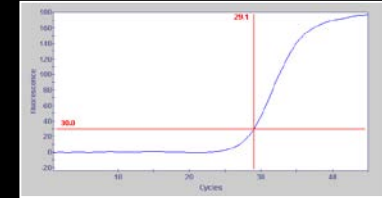
# Inoculación en plántula





# Técnicas moleculares

## PCR convencional y tiempo real



Iniciador	Secuencia (5'→3')	Diana	Tipo de PCR	Referencia
Y17CoF	GAC GTG GTG ATC AGC GAG TCA TTC	Transportador ABC	Convencional	Pagani <i>et al.</i> (2004)
Y17CoR	GAC GTG GTG ATG ATG ATC TGC			
XapF	GAA GCT CGA TGC CAC ATC GT	<i>Gen hrp</i> (respuesta hipersensibilidad)	Convencional	Park <i>et al.</i> (2010)
XapR	GTG CAG ATC CTC AGC ATG TC			
29F	GTA CCG CAT TTC AGG CCG TCA	Librería ADN ( <b>hibridación substractiva</b> )	Tiempo real (SYBRGreen)	Ballard <i>et al.</i> (2011)
29R	AAG TAG CCA ACG CCG AAT TT			
XapY17CoF	GAC GTG GTG ATC AGC GAG TCA TTC	Transportador ABC	Dúplex convencional	Pothier <i>et al.</i> (2011)
XapY17CoR	GAC GTG GTG ATG ATG ATC TGC			
XarbQ-F	GCG CGA GAT CAA TGC GAC CTC GTC	<i>qumA</i> (metabolismo de la quinasa)	Dúplex convencional	Pothier <i>et al.</i> (2011)
XarbQ-R	GGT GAC CAC ATC GAA CCG CGC A			
pXap41_repA1-F	GCG AGG ACA TGG CTT TCA C	Regiones replicación (plásmido pXap41) <i>Gen relaxase/mobilization proteins</i> (plásmido pXap41)	Múltiplex convencional	Pothier <i>et al.</i> (2011)
pXap41_repA1-R	GCG GCC AAG GCG TGC ATC TGC			
Xap41_repA2-F	TAC CAA GAG CCG CAA CAT CTG C			
Xap41_repA2-R	TTT GGC CTT GCT GTA GAG CGT			
Xap41_mob-F	GCC TAT CTG GCG AAG GTC GAG			
Xap41_mob-R	GCT TGT AGC TCG GCC AGG ATG	Transportador ABC	Tiempo real sondaTaqMan Sonda Xap-2P: FAM-TCA ATA TCT GTG CGT TGC TGT TCT CAC GA-TAMRA	Palacio-Bielsa <i>et al.</i> (2011)
Xap-2F	TGG CTT CCT GAC TGT TTG CA			
Xap-2R	TCG TGG GTT CGC TTG ATG A	<i>Gen pep</i> (propil endopeptidasa)	Tiempo real sonda TaqMan Sonda <i>Xaf-pep-P</i> : FAM-CCG GAA ACC GGC AAG AAG GCA-TAMRA	Weller <i>et al.</i> (2007)
Xaf-pep-F	GCG TGC CGC AGC CCG			
Xaf-pep-R	CCG GTG GGC TTG GCG CCG			

Otras técnicas: MLSA, Rep-PCR, análisis multilocus



# **Detección de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* mediante PCR**



**PCR convencional**  
***Xanthomonas arboricola* pv. *pruni***



# DetECCIÓN e IDENTIFICACIÓN RÁPIDAS MEDIANTE PCR

**OEPP, 2006: No incluye protocolos de PCR disponibles para detección ni para identificación de cultivos puros**

- Pagani (Tesis Doctoral, EE.UU., 2004) PCR convencional para detección específica de un fragmento de ADN (943 pb) de la secuencia de un gen putativo de una proteína relacionada con el sistema transportador ABC en *X. arboricola* pv. *pruni*

## **Laboratorios participantes optimización del protocolo:**

**Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, España**

(J. Peñalver, P. Llop, M.M. López)

**Área de Protección Agroalimentaria, Valencia, España**

(M. Roselló)

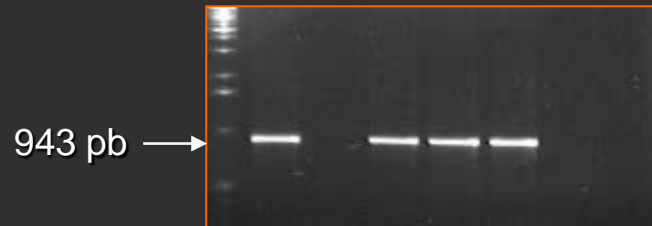
**Centro di Ricerca per la Frutticoltura C.R.A., Roma, Italia**

(P. Ferrante, M. Scortichini)

# PCR convencional (López *et al.*, 2012. JPP 94)

## Especificidad


- Banda esperada (943 pb) para *X. arboricola* pv. *pruni*
- No se obtiene la banda para otras 15 especies ensayadas



## Sensibilidad (“spiked samples” hojas y extracción ADN)

Concentración <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (IVIA 463)						
	10 <sup>6</sup> ufc/ml	10 <sup>5</sup> ufc/ml	10 <sup>4</sup> ufc/ml	10 <sup>3</sup> ufc/ml	10 <sup>2</sup> ufc/ml	10 ufc/ml
Almendro	+	+	+	+	d+	-
Albaricoquero	+	+	-	-	-	-
Ciruelo japonés	+	d+	-	-	-	-
Melocotonero	+	+	+	+	+	-
GF-677	+	d+	-	-	-	-

d+: banda débil del amplificado



**PCR en tiempo real con sonda TaqMan**  
**Detección de *X. arboricola* pv. *pruni* en material**  
**vegetal con o sin síntomas**

(Palacio-Bielsa *et al.*, 2011. *Appl. Environ. Microbiol.* 77)

# Evaluación de especificidad de PCR en tiempo real con cultivos bacterianos

- **50 cepas de otras 20 especies de bacterias fitopatógenas:** *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *fragariae*, *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. arboricola* pv. *populi*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. citri* subsp. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *mori*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. corrugata*, *Agrobacterium tumefaciens*, *A. vitis*, *Brenneria quercina*, *Erwinia amylovora*, *E. billingiae*, *E. pyrifoliae*, *E. tasmaniensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*
- **2 cepas de bacterias saprofitas:** *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans*
- **159 cepas de *X. arboricola* pv. *pruni*:** distintos huéspedes y orígenes geográficos (Italia, España, Argentina, Brasil, Canadá, EE. UU., Sudáfrica y Nueva Zelanda)

## Evaluación especificidad de PCR en tiempo real con material vegetal

- ✓ **Muestras sanas de *Prunus*** (melocotón, almendro, ciruelo japonés y patrón GF-677)
- ✓ **Muestras de *Prunus* inoculadas (“spiked”)** con *X. arboricola* pv. *pruni*

# Evaluación sensibilidad PCR en tiempo real

			Hervido	Extracción ADN (Llop et al., 1999)
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (ISPaVe-B4)*			10 <sup>3</sup> UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml
<i>Prunus</i> spp. con <i>Xap</i> (ISPaVe-B4)	Melocotonero (cv. Catherine)	Machacado	10 <sup>4</sup> UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml
		Lavado	10 <sup>2</sup> UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml
	Almendro (cv. Guara)	Machacado	10 <sup>3</sup> UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml
		Lavado	10 <sup>2</sup> UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml
	Ciruelo japonés (cv. Golden Japan)	Machacado	-	10 <sup>2</sup> UFC/ml
		Lavado	10 <sup>5</sup> UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml
	Patrón GF-677	Machacado	10 <sup>3</sup> UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml
		Lavado	10 <sup>2</sup> UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml

\* Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Roma, Italia

# Procesado de muestras PCR en tiempo real

- **Muestras con síntomas (excepto ciruelo):**

Lavado de tejidos en agua destilada estéril (hervidos)

Resultados en aprox. 2 horas

- **Muestras asintomáticas (incluyendo yemas):**

Machacado ligero de tejidos y extracción de ADN (Llop *et al.*, 1999)

# **MUESTRAS ASINTOMÁTICAS**

## **Plantaciones comerciales y viveros**

**Lavado (hojas)**

<b>Nº positivas PCR-tr /Total</b>
<b>33 / 280</b>

**Machacado con extracción ADN (yemas invierno)**

<b>Nº positivas PCR-tr /Total</b>
<b>26 / 285</b>

**Buena correlación entre muestras positivas por PCR tr y el aislamiento**



# **MUESTRAS ASINTOMÁTICAS**

## **Plantaciones comerciales y viveros**

### **Lavado / Machacado con extracción ADN**

<b>Nº positivas LAVADO / Total</b>	<b>Nº positivas EXTRACCIÓN / Total</b>
<b>0 /117</b>	<b>11 / 117</b>

**9,4% muestras positivas “recuperadas” mediante extracción de ADN**

#### **LAVADO:**

- **Menor sensibilidad**
  - **Permite el análisis de gran número de muestras**
- Utilizable para prospecciones masivas en viveros**

#### **MACHACADO Y EXTRACCIÓN ADN:**

- **Mayor sensibilidad**
- **Limitación del número de análisis**

# PCR convencional y PCR-tr (hojas síntomas sospechosos de Xap)

Almendro 127		PCR convencional	
		+	-
PCR-tr	+	38	5
	-	0	84
<b>Congruencia: 96,06%</b>			

Albaricoquero 30		PCR convencional	
		+	-
PCR-tr	+	8	2
	-	0	20
<b>Congruencia: 93,33%</b>			

Cerezo 44		PCR convencional	
		+	-
PCR-tr	+	0	2
	-	0	42
<b>Congruencia: 95,46%</b>			

Ciruelo japonés 54		PCR convencional	
		+	-
PCR-tr	+	11	5
	-	0	38
<b>Congruencia: 90,74%</b>			

Melocotonero 61		PCR convencional	
		+	-
PCR-tr	+	10	11
	-	0	40
<b>Congruencia: 81,97%</b>			

(López et al., 2012. JPP)

# PROTOCOLO PROPUESTO

**MUESTRAS**  
con o sin síntomas



**PCR-tr TaqMan lavados o extracción ADN machacados**  
("screening")



**Aislamiento**  
(LPGA+ cicloheximida)



**Colonias características**  
**PCR-tr TaqMan**  
("screening")



**Purificar para**  
**caracterización**  
**e inoculaciones**



**Muestra (-)**

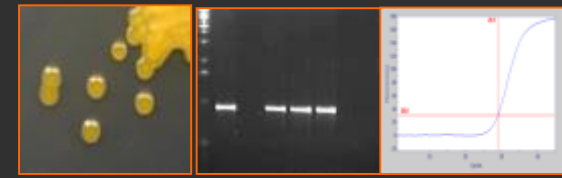


**Xap**





# CONCLUSIONES



- ✓ El protocolo de PCR en tiempo real con sonda TaqMan alcanza un nivel de sensibilidad de  $10^2$  ufc/ml con material vegetal.
- ✓ Detección de lavados del tejido sin extracción de ADN.
- ✓ Existe una buena correlación entre los resultados de los análisis de PCR -r y el aislamiento de la bacteria.
- ✓ Utilizado para diagnóstico y detección del patógeno en plantas de campo y viveros naturalmente infectadas con o sin síntomas.

# Diagnóstico y detección de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 7/64 (1)

2006 *Bulletin OEPP* 36, 129-133



**Nuevo protocolo que incluiría técnicas PCR (en preparación)**



**¡¡GRACIAS POR SU ATENCIÓN!!**