

**Nº PROYECTO ERA-NET: 266505-FP7-ERANET EUPHRESCO II**  
“Rapid diagnostics of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*): development and validation of methodologies for discrimination between *Xap* isolates and look-a-likes”

**INVESTIGADOR RESPONSABLE ESPAÑOL:** Ana Palacio Bielsa

**ENTIDAD BENEFICIARIA ESPAÑOLA:** Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)

**COORDINADOR DEL PROYECTO:** Maria Bergsma-Vlami. Netherlands Food and Consumer Products Safety Authority (NVWA)

## Objetivos generales:

- Identificación y aspectos epidemiológicos de microbiota en *Prunus* spp.
- Análisis de métodos ya disponibles de identificación y detección de *Xap* basados en el ADN.
- Desarrollo y validación de una metodología de PCR altamente específica, que permita diferenciar aislados de *Xap* de otras *Xanthomonas* patógenas.
- Caracterización de la diversidad de cepas de *Xap* para el seguimiento de la dispersión del patógeno a corta y larga distancia, y la identificación de posibles fuentes de inóculo.
- Asistencia a Organismos Nacionales de Protección Vegetal para la optimización de estrategias fitosanitarias.
- Preparación de un protocolo EPPO para el diagnóstico de *Xap*.



## Work Packages (WP)

<b>WP 1</b>	Estudio de la microbiota en <i>Prunus</i> spp. con y sin infección por <i>Xap</i> y su posible interacción con <i>Xap</i>
<b>WP 2</b>	Desarrollo y evaluación de métodos de identificación y diferenciación de cepas de <i>Xanthomonas</i> patógenas y no patógenas de frutales de hueso, almendro y <i>P. laurocerasus</i>
<b>WP 3</b>	Métodos de seguimiento de fuentes de inóculo de <i>Xap</i>
<b>WP 4</b>	Comparación y validación de métodos de diagnóstico de <i>Xap</i> mediante un <i>ring-test</i> - Revisión protocolo EPPO diagnóstico <i>Xap</i>
<b>WP 5</b>	Dirección y coordinación del consorcio del proyecto

- **Socio 1. Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA, Holanda).** Maria Bergsma-Vlami (Coordinador proyecto)  
*-Otros investigadores participantes: Marcel Wenneker (Applied Plant Research, PPO, Holanda)*
- **Socio 2. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA, España).** Ana Palacio-Bielsa (Coordinador WP1. Colaboración en WP2, WP3 y WP4)  
*-Otros investigadores participantes: María M. López (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA, España); Jaime Cubero (Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria, INIA, España)*
- **Socio 3. Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES, Austria).** Richard Gottsberger (Colaboración en WP1, WP2 y WP4)

# **WP1 (CITA-ES): Microbiota en *Prunus* spp. con y sin infección por *Xap* y su posible interacción con *Xap***

**Ana Palacio-Bielsa (CITA-ES)**

**María M. López (IVIA-ES)**

**Jaime Cubero (INIA-ES)**



NOTA INTERIOR

DE: Ricardo Sánchez Luengo  
A: Ana Palacio Bielsa – Unidad Sanidad Vegetal  
Asunto: Apertura Proyecto

Fecha: 17.12.2013

Le comunico que con esta fecha queda abierto el proyecto que se relaciona a continuación y del que es Vd. responsable

Nº Proyecto	Referencia	Título	Importe
371-UE	XAPDIAG-EUPHRES	Rapid diagnostics of <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>Pruni</i> (Xap): development and validation on methodologies .....	55.000,00
<b>Costes indirectos .....</b>			<b>9.166,67</b>
<b>5% adicional Costes Indirectos según reunión de la Comisión de Dirección del CITA de fecha 18 de junio de 2013.....</b>			<b>2.294,67</b>
<b>Disponible Investigador.....</b>			<b>43.541,66</b>

De acuerdo con el procedimiento establecido, incrementamos con esta misma fecha la dotación del proyecto 000-5(2013) "Gastos Generales de la Unidad", en la cantidad de 833,33 €, que corresponden al 20% de la cantidad establecida como aportación por "Costes Indirectos" de la primera anualidad.

El Director de Gestión del CITA,



Fdo.: Ricardo Sánchez Luengo

(Fecha apertura proyecto: 17-12-2013)



**Trabajos realizados:** Aislamiento, caracterización y secuenciación de 69 colonias bacterianas epifitas y endofitas de distintos órganos (frutos con síntomas, hojas asintomáticas y yemas) de *Prunus* spp. sanos e infectados (almendro, melocotonero e híbridos)

## Conclusiones:

- ✓ Se han secuenciado 42 de ellas, identificando 14 géneros bacterianos: *Pantoea*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Pseudoclavibacter*, *Sphingomonas*, *Terrabacter*, *Sanguibacter*, *Roseomonas*, *Xanthomonas*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Frigobacterium*.
- ✓ Validación de una metodología para el estudio de la microbiota en *Prunus* spp. con o sin infección por *Xap*.
- ✓ Colección de cepas bacterianas saprofitas de *Prunus*, que podrán ser utilizadas para la evaluación de técnicas de identificación y diferenciación de *Xap* en el WP2.
- ✓ Prevista publicación.

**WP2 – Desarrollo y evaluación de métodos para la identificación y diferenciación de cepas de *Xanthomonas* patógenas y no patógenas de aisladas de frutales de hueso, almendro y *P. laurocerasus***

**(Participación: CITA, INIA)**



**Trabajos realizados:** “Ring-test” en 4 laboratorios (España, Holanda y Suiza) para evaluación de técnicas PCR-tr y *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) para análisis rutinarios en laboratorios de diagnóstico (coeficiente Kappa, sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud y probabilidad post-test). Muestras de hojas de almendro con síntomas y sanas (lavados *versus* extractos ADN, y diluciones 1:10 y 1:100)

## Conclusiones:

- ✓ PCR-tr usando lavados fue más preciso que LAMP.
- ✓ LAMP sería también adecuado para este tipo de muestras (ventaja práctica: sencillez y rapidez)
- ✓ Ambos métodos son adecuados para el diagnóstico. Su elección dependería de máxima sensibilidad requerida, tiempo, coste, etc.)
- ✓ Palacio-Bielsa A., López-Soriano, P., Bühlmann, A., van Doorn, J., Pham K., Cambra, M.A., Berruete I.M., Pothier J.F., Duffy B., Olmos, A., López M.M. (*J. Microbiol. Methods*, enviado)



# WP 3 – Métodos para el estudio de diversidad genética y seguimiento de fuentes de inóculo de *Xap*

(Participación: IVIA, CITA, INIA)

## Trabajos realizados:

- Técnica *Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis* (MLVA) para el estudio de la diversidad genética de cepas de *Xap* y de la epidemiología molecular en España. Se seleccionaron 255 cepas (10 provincias) y 12 cepas de referencia de colecciones internacionales.
- Evaluación de 22 microsátélites ya descritos, y de 5 minisátélites diseñados en este estudio.

## Conclusiones:

- ✓ MLVA ha demostrado ser rápida, fiable y con elevado poder diferenciador para el análisis genético de *Xap*.
- ✓ Se ha identificado un elevado número de haplotipos, agrupando algunas cepas según su origen geográfico (diversas introducciones del patógeno)
- ✓ Primer estudio de la diversidad de cepas españolas de *Xap* y posibles fuentes de inóculo para su dispersión a corta y larga distancia. El análisis integrado de los resultados obtenidos contribuirá a plantear hipótesis de la epidemiología de los brotes identificados en España.

# WP 4 – Comparación y validación de métodos de diagnóstico de *Xap* mediante un *ring-test* (Revisión protocolo EPPO para diagnóstico de *Xap*)

R. Gottsber, AGES; M. Bergsma-Vlami, MVWA; E. Stefani, Università di Modena e Reggio Emilia; M.M. López, IVIA; J. Cubero, INIA; A. Palacio-Bielsa, CITA

(TRABAJO EN CURSO)





# Actividades de difusión (I): Cursos y reuniones científicas

- **Curso:** “Integrated protocols for diagnostic of quarantine bacteria” (M.M. López, IVIA). Pontevedra, 2013
- **Curso:** “Advanced Course on Plant Health” (M.M. López, IVIA). Córdoba, 2014
- **EPPO Meeting of the Panel of Bacteriology** (M. Bergsma-Vlami, NVWA; M.M. López, IVIA; J. Cubero, INIA; A. Palacio-Bielsa, CITA; AGES). Wageningen (Holanda), marzo 2014
- **11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology (EFPP)-Healthy plants-healthy people.** “Molecular tools allow the description of new taxons at species and infra-specific levels among plant pathogenic bacteria” (M.M. López, IVIA; J. Cubero, INIA; A. Palacio-Bielsa, CITA). Cracovia (Polonia), septiembre 2014



## Actividades de difusión (II): congresos

- **Garita-Cambronero J. et al.** Detección de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* mediante inmunocaptura magnética y PCR en tiempo real. *XVII Congreso SEF*. Lérida, 7-10 octubre 2014.
- **Garita-Cambronero J. et al.** Secuenciación del genoma de una cepa española de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, aislada de almendro. *XVII Congreso SEF*. Lérida, 7-10 octubre 2014.
- **López-Soriano P. et al.** Diversidad genética y epidemiología molecular de cepas españolas de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro. *XVII Congreso SEF*. Lérida, 7-10 octubre 2014.
- **Palacio-Bielsa A. et al.** Capacidad de supervivencia y transmisión por semilla de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en almendro. *XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF)*. Lérida, 7-10 octubre 2014.
- **Palacio-Bielsa A. et al.** Evaluación de pérdidas debidas a *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en plantaciones comerciales de almendro en Aragón. *XVII Congreso SEF*. Lérida, 7-10 octubre 2014.

# 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology

Healthy plants  
– healthy people

Book of abstracts



11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology

mlopez@ivia.es



S.1

## Molecular tools allow the description of new taxons at species and infra-specific levels among plant pathogenic bacteria

**María M. López<sup>1</sup>**, Pablo López-Soriano<sup>1</sup>, Silvia Barbel<sup>1</sup>, Javier Peñalver<sup>1</sup>,  
Pablo Llop<sup>1</sup>, Ester Marco-Núñez<sup>1</sup>, Jerson Gorita-Cambronero<sup>2</sup>,  
Aitana Ares-Yebra<sup>1</sup>, Aela Abelleira<sup>2</sup>, Olga Aguin<sup>3</sup>, Jaime Cubero<sup>1</sup>,  
Ana Palacios-Bielsa<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia, Spain

<sup>2</sup> Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Protección Vegetal,  
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Estación Fitopatológica do Areeiro, Diputación de Pontevedra, Pontevedra, Spain

<sup>4</sup> Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza, Spain

Diagnostic of plant diseases is evolving and improving day by day. Molecular-based tools such as real-time PCR, LAMP, microarrays, barcoding and Next Generation Sequencing are enhancing the accuracy of the detection and identification of plant pathogenic bacteria. These technologies are currently based on the use of available nucleic acid sequences and information about the molecular interactions bacterial pathogen-plant host. The target DNA sequences selected for these techniques must be distinctive and based on conserved regions, in order to identify only one species, subspecies, pathovar or a particular set of genes. However, the currently available databases contain only a small portion of the sequences of the microbes present in complex environments. The use of integrated approaches for detection and identification of plant pathogenic bacteria has allowed the discovery of differences among strains classified to date in the same species but showing distinct characteristics in molecular identification tests. Three examples are presented: 1) *Erwinia piri/nigrans*, a new pathogenic species described in Spain as causal agent of necrosis of pear blossoms that is closely related to *E. amylovora*, 2) a new *Xanthomonas* sp., also isolated in Spain and responsible of symptoms similar to those of *Xanthomonas arborescens* pv. *pruni*, but classified as different to this species according to multi-locus sequencing analysis as well as to serological and PCR identification, 3) the new group of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains described from New Zealand, France and Spain, that show low virulence and different molecular characteristics. The description of new species or infra-specific groups leads to a more comprehensive knowledge of the complex pathosystems in agricultural industry and nature. Moreover, the partial or complete genomes of new taxons that are being determined will offer new omics-based tools for improving the detection, identification and taxonomy of bacterial plant pathogens.









XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología  
Palau de Congressos de Lleida, La Llotja  
7-10 de octubre de 2014

Libro de  
Resúmenes

#### RESÚMENES DE COMUNICACIONES ORALES

Edición simplificada (Fitopatología II)



SM9-3-014-42

### DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS ESPAÑOLAS DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*; AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA BACTERIANA DE LOS FRUTALES DE HUESO Y DEL ALMENDRO

López-Soriano P.<sup>1</sup>, Boyer K.<sup>2</sup>, Crygier P.<sup>3</sup>, Palacio-Bielva A.<sup>3</sup>, Marco-Noales E.<sup>1</sup>, Vernière C.<sup>2</sup>, López M.M.<sup>1</sup>, Pruvost D.<sup>3</sup>

- 1) Centro de Protección Oficial, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, E-mail: 201pac@ivias.es
- 2) UMRI Peuplements Végétaux et Biogéochimie NRIEE, Topical (PVNT), CIRAD, Pôle de Protection des plantes 7, chemin de l'État, 91410 Saint Pierre, La Réunion, France
- 3) Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (ITA), Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap) es el agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso, almendra y diversas especies ornamentales del género *Prunus*. Desde que en el año 2002 se detectara Xap por primera vez en España, se han identificado brotes de la enfermedad en diferentes regiones productoras afectando a varios huéspedes (melocotonero, ciruelo japonés, albarcoquero y almendra), tanto en plantaciones como en viveros.

En este trabajo se pretende evaluar la diversidad genética de una selección de 255 cepas españolas de Xap, procedentes de 10 provincias y aisladas de diversos huéspedes, y 12 cepas de referencia obtenidas de colecciones internacionales, para conocer la epidemiología molecular de los brotes de la enfermedad en España. Para ello, se ha seleccionado la técnica de análisis "multilocus variable-number tandem repeat analysis" (MLVA), por ser rápida, reproducible, con un elevado poder diferenciador y haberse revelado como un método adecuado para la tipificación y el estudio de relaciones epidemiológicas de cepas de *X. arboricola*. Para llevar a cabo el análisis se han utilizado 22 microsatélites previamente descritos y 5 misatélites diseñados para este estudio.

La técnica ha permitido identificar un elevado número de haplotipos entre las 267 cepas de Xap estudiadas, pudiendo agrupar algunas de ellas en función de su origen geográfico, lo que sugiere distintas introducciones de la bacteria. El análisis integrado de los resultados obtenidos con las distintas secuencias contribuirá a establecer hipótesis sobre la epidemiología de la mancha bacteriana en España.

Trabajo financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), proyecto RTA2011-00140-C05-01.

Colaboración con CIRAD financiada por INIA



## ACCIONES PREVISTAS:

- **Secuenciación de cepas de muestras de ciruelos con síntomas (cv. Freedom) y asintomáticos (cv. Angeleno) de una misma parcela.**
- **Análisis del microbioma (bacterias cultivables y no cultivables) en muestras de *Prunus* spp. con y sin síntomas mediante *next-generation sequencing*** (realizadas extracciones ADN hojas de melocotonero).
- **Estudio de cepas de *Xap* de Uruguay y Argentina** (Red 112RT0441 FRUT-SAN: “Fortalecimiento de las estrategias de control integrado de plagas y enfermedades en frutales de hueso o carozo”. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo-CYTED).
- **Preparación de publicaciones.**







¡¡ GRACIAS POR  
SU ATENCIÓN !!

