

# Resistencia a cobre de cepas españolas de *Xanthomonas* spp.

Isabel M<sup>a</sup> Berruete<sup>1</sup>, José Luis Palomo<sup>2</sup>, Jorge Iribarren<sup>2</sup>, Jaime Cubero<sup>3</sup>, Ana Palacio-Bielsa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Sistemas Agrícolas, Forestales y Medio Ambiente, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es

<sup>2</sup>Centro Regional de Diagnóstico Junta de Castilla y León. Aldearrubia, Salamanca

<sup>3</sup>Dpto. Protección Vegetal, Laboratorio de Bacteriología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSCIC). Madrid



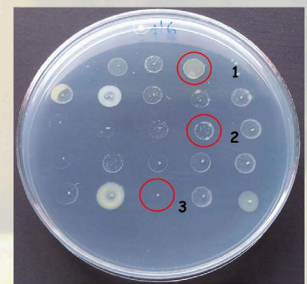
## INTRODUCCIÓN

El control de las bacteriosis de plantas se basa fundamentalmente en la aplicación de compuestos cúpricos. Sin embargo, es habitual la aparición de cepas resistentes, lo que compromete la eficacia de los tratamientos. Se ha evaluado la resistencia a cobre mediante ensayos *in vitro*, análisis de PCR y estudios del genoma de una colección de cepas españolas de especies bacterianas responsables de importantes daños en cultivos de relevancia económica, como son *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap) (mancha bacteriana de *Prunus* spp.); *X. arboricola* pv. *juglandis* (Xaj) (mancha negra del nogal); y *Xanthomonas* causantes de la sarna del pimiento y tomate (Xv): *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* y *X. vesicatoria*, que fueron aisladas en distintas áreas geográficas entre los años 1978 y 2022.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Se ha evaluado la resistencia a cobre *in vitro* de 42 cepas españolas de Xap, 16 cepas de Xaj y 34 cepas de Xv. Las suspensiones bacterianas (10 µl), con o sin un paso de preinducción (12 h en Agar Nutritivo suplementado con 0,8 µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), se depositaron por triplicado en medio MGY suplementado con 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6; 2,4 y 3,2 mM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, se incubaron a 25°C durante 96h y se observó su crecimiento. En los ensayos se incluyeron cepas conocidas resistentes a cobre (Cu<sup>R</sup>) y sensibles (Cu<sup>S</sup>) como controles.
- Las cepas se identificaron como Cu<sup>R</sup> cuando crecían a ≥0,8 mM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Behlau *et al.* 2013). El crecimiento de las cepas se clasificó como confluyente (uniforme), débil (irregular o incompleto) o negativo (ausencia de crecimiento) (Fig. 1).
- Se ha analizado mediante PCR la presencia del grupo de genes de resistencia a cobre *copLAB* (Behlau *et al.* 2012).
- La presencia de los genes *copL*, *copA*, *copB*, *copM*, *copG*, *copC*, *copD* y *copF* ha sido evaluada en cuatro genomas completos de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* y *X. vesicatoria*, así como en ocho secuencias preliminares (*drafts*) obtenidas durante el proyecto, y en cinco secuencias completas de *X. arboricola* cuyos genomas habían sido previamente secuenciados por el grupo. El mapeo de los genes se realizó mediante BLASTn y el software Geneious Prime, utilizando una base de datos de genes de resistencia a cobre creada específicamente para este análisis. Además, se incluyeron las secuencias de dos genomas de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* y *X. vesicatoria* de cepas identificadas por otros autores como resistentes al cobre, disponibles en bases de datos.

Figura 1. Crecimiento en medio MGY



1: confluyente; 2: débil; 3: negativo

Tabla 1. Resistencia a cobre *in vitro* y determinantes genéticos de cepas de Xap, Xaj y Xv

Especie	Nivel resistencia (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O mM)*	Cepas resistentes cobre (nº resistentes/nº totales)	Presencia de <i>copLAB</i> (nº cepas)
Xap	+0,8	1/42	0
	±1,2	1/42	0
	+1,2	13/42	0
	±1,6	18/42	0
	+1,6	9/42	0
Xaj	±1,2	4/16	0
	+1,2	2/16	0
	±1,6	4/16	0
	+1,6	6/16	0
Xv	±1,2	5/34	0
	+1,2	8/34	0
	±1,6	15/34	0
	+1,6	1/34	0
	+2,4	2/34	1
	+3,2	3/34	2

\*Mayor concentración de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a la que se obtiene crecimiento confluyente (+) o débil (±)

## RESULTADOS

- Se ha determinado la idoneidad de realizar un paso previo de preinducción, así como del análisis de una concentración bacteriana de 10<sup>8</sup> ufc/ml.
- Todas las cepas crecieron a una concentración ≥0,8 mM de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, por lo que se considerarían como resistentes a cobre (Tabla 1).
- Los análisis mediante PCR indicaron que solo tres de las cepas contienen el grupo de genes *copLAB* (Tabla 1).
- De las cepas analizadas, solo una de *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* contenía todos los genes de resistencia a cobre presentes en las cepas de referencia utilizadas. En el resto de las cepas, solo se detectaron secuencias parciales de los genes *copA* y *copB*.

## CONCLUSIONES

- Se ha puesto a punto la metodología para la evaluación *in vitro* de la resistencia a cobre considerando variables determinantes, como el efecto de un paso previo de preinducción para la expresión de posibles genes de resistencia, y la concentración óptima de las suspensiones bacterianas.
- Todas las cepas españolas analizadas *in vitro* serían resistentes a cobre, lo que podría comprometer la eficacia de los tratamientos cúpricos en nuestros cultivos contra Xap, Xaj y Xv.
- Únicamente tres de las cepas fueron positivas por PCR para el grupo de genes *copLAB*. La discrepancia entre los resultados obtenidos *in vitro* y mediante PCR podría ser debida a la existencia de otros genes de resistencia a cobre distintos. Está previsto el estudio mediante PCR de otros posibles determinantes de resistencia descritos en la bibliografía.
- Se ha estudiado la presencia del grupo de genes de resistencia a cobre *copLABMGCDF* en una selección de cepas, y solo una de ellas contenía todos los genes. Actualmente, se están realizando análisis genómicos adicionales con otros genes descritos que confieren resistencia en bacterias, y se están repitiendo los análisis a nivel de proteína.
- Los genes de resistencia a cobre están mayoritariamente asociados a plásmidos, cuya transferencia horizontal puede contribuir a la selección de poblaciones bacterianas resistentes a tratamientos cúpricos continuados en el tiempo (Behlau *et al.* 2012; Stall *et al.* 1986). Un mejor conocimiento de los mecanismos de resistencia y su evolución en cepas españolas de *Xanthomonas* spp. contribuirá a diseñar programas de control de enfermedades más sostenibles medioambientalmente a través de una aplicación de cobre más racional y eficiente.

Referencias: Behlau *et al.* 2012. Eur. J. Plant Pathol. 133: 949-963; Behlau *et al.* 2013. Phytopathology 103: 409-418; Stall *et al.* 1986. Phytopathology 76: 240-243.



Este trabajo forma parte del Proyecto PID2021-123600OR-C42, financiado por MCIU/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER, UE