



## Estratègies de lluita contra *Xanthomonas* spp. per a una agricultura sostenible

El gènere *Xanthomonas* comprén espècies responsables de malalties com la taca bacteriana dels fruiters d'os i l'ametler, i la sarna de la tomaca i del pimentó, considerades entre les més greus d'estos cultius. En este article es descriuen les malalties i es presenten els primers resultats obtinguts dins del projecte nacional d'investigació XANTHERWO.

### XANTHOMONAS SPP.: LES MALALTIES QUE PRODUÏXEN I ELS HOSTES ALS QUALS AFECTEN

El gènere *Xanthomonas* inclou bacteris fitopatògens importants que infecten cultius clau, com cítrics, fruiters d'os, arròs, o espècies hortícoles. Són responsables de grans pèrdues de producció i posen en risc la sostenibilitat de l'agricultura a escala mundial.

A nivell fitopatològic i microbiològic, el gènere *Xanthomonas* presenta un gran interès per la seua elevada especialització cap a l'hoste, la qual cosa provoca que dins d'una mateixa espècie de *Xanthomonas* existisquen ceps que infecten de manera selectiva.

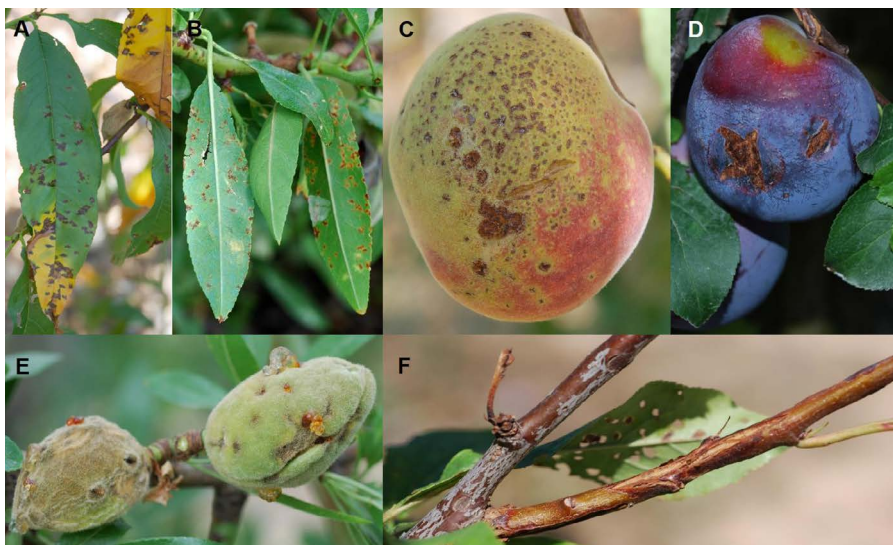
La classificació de ceps dins d'una espècie segons l'especificitat de l'hoste al qual ataquen ha donat lloc a la creació dels patovars.

*X. arboricola* comprén múltiples patovars (pv.), destacant entre ells *pruni*, *juglandis* i *corylina*, responsables de malalties en *Prunus* spp., noguera i avellaner, respectivament. *X. arboricola* pv. *pruni* (Xap) causa la taca bacteriana de *Prunus*, que afecta ametler, prunera, bresquillera, albercoquer, cirerer i espècies ornamentals (EFSA, 2014a). sta malaltia està distribuïda a nivell mundial, havent-se identificat a Espanya en di-

verses comunitats autònomes (CC. AA.) (EPPO, 2024; Palacio-Bielsa i col., 2014). Es caracteritza per taques i lesions necròtiques en fulles i fruits i, a vegades, xancren en les branques i el tronc (Figura 1). En els casos més severos, i només en alguns hostes, pot ocasionar defoliació i caiguda prematura de fruits. Es considera la bacteriosi més greu de *Prunus*, havent-se descrit a Espanya una disminució de la producció en ametler fins del 46% (Palacio-Bielsa i col., 2014).

## FIGURA 1. SÍMPTOMES DE TACA BACTERIANA

- A. Taques en fulles de bresquillera.
- B. Taques en fulles d'ametler.
- C. Lesions en bresquilla.
- D. Lesions en pruna.
- E. Lesions i exsudats de goma en ametles.
- F. Xancres en prunera (M.A. Cambra, Centre de sanitat i Certificació Vegetal. Govern d'Aragó).



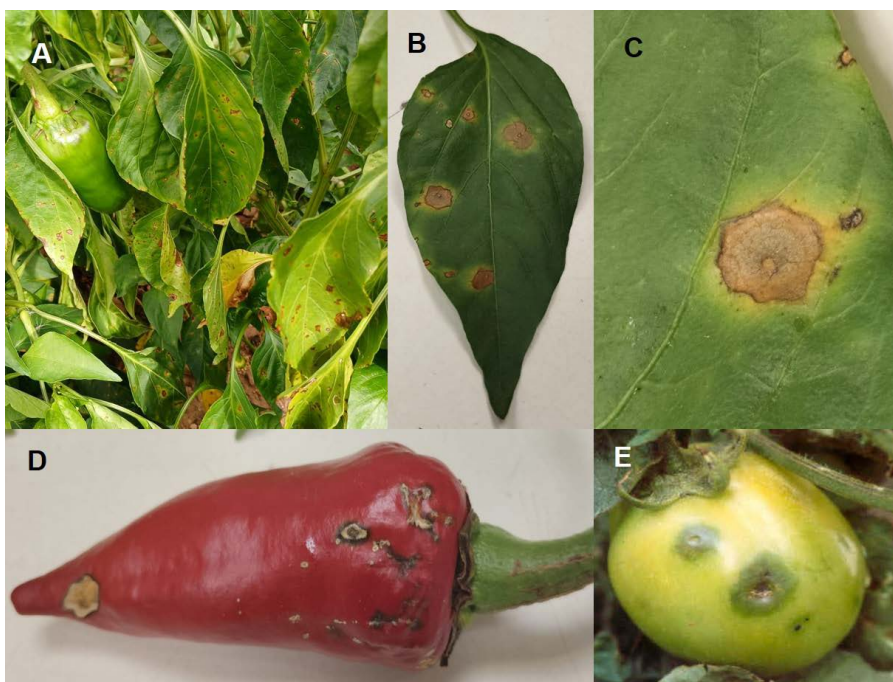
Els objectius són la generació de coneixement per a entendre millor els mecanismes d'infecció dels bacteris i de defensa de les plantes, i proposar estratègies de biocontrol basades en l'ús de molècules naturals i microorganismes.

D'altra banda, la sarna bacteriana de la tomaca i del pimentó, distribuïda mundialment (EPPO, 2024), és causada per almenys tres espècies: *X. vesicatoria* (Xv), *X. euvesicatoria* (Xe) i *X. hortorum* (Xh). A Espanya s'ha trobat en CC. AA. productores de pimentó i tomaca (Palacio-Biel-sa i col., 2023). En les fulles, estos bacteris produïxen taques aquoses, angulars, de color verd fosc, que posteriorment es necrosen i adquireixen un aspecte apergaminat i de vegades amb un halo groguenc. En fruits de tomaca s'observen xicotetes bombolles irregulars que evolucionen a taques suroses amb el centre negre i afonat; mentre que en el pimentó les lesions formen

una crosta que s'eleva i necrosa (Figura 2). Estos patògens poden causar pèrdues significatives per la reducció del rendiment i les lesions en els fruits que ne dificulten la comercialització. A la Unió Europea (UE) s'han descrit pèrdues de fins a un 30% (EFSA, 2014b). Les llavors i plàntules contaminades produïdes en planters són les principals fonts d'inòcul i responsables de la disseminació a llarga distància dels bacteris. El maneig de la malaltia requereix el control sistemàtic de les llavors i del material de sembra, la qual cosa suposa un desafiament donada l'eficàcia limitada de les estratègies actuals.

## FIGURA 2. SÍMPTOMES DE SARNA BACTERIANA

- A. Taques necròtiques en fulles de pimentó.
- B i C. Detalls de les lesions.
- D. Crostes necrosades en fruit de pimentó.
- E. Lesions suroses amb centre fosc i afonat en fruit de tomaca (M. Betrán, Centre de Sanitat i Certificació Vegetal. Govern d'Aragó; R. Santiago, Laboratori de Sanitat Vegetal. Junta d'Extremadura).



## ESTRATÈGIES DE CONTROL DE LES MALALTIES

Cal ressenyar que tant Xap com les espècies de *Xanthomonas* causants de la sarna bacteriana són considerats organismes regulats no quarantenaris a la UE, l'anàlisi en material de la qual vegetal de reproducció és necessari segons la legislació vigent (DOUE, 2019), i fins i tot són quarantenaris per a alguns països fora de la UE.

Les mesures de control de les infeccions causades per estes *Xanthomonas* es basen, en primer lloc, en la prevenció. En fallar esta, cal adoptar mesures de control directes. Estes mesures consisteixen en l'erradicació de plantes afectades, l'ús de varietats resistents, la utilització d'algunes pràctiques culturals i l'aplicació de tractaments químics,

---

El control de les infeccions causades per estes *Xanthomonas* es basa en la prevenció. Quan esta falla, és necessari adoptar mesures directes.

fonamentalment compostos cúprics. No obstant això, estes mesures no sempre funcionen. En primer lloc, és difícil obtenir varietats resistents. A més, poden sorgir resistències als tractaments cúprics, la qual cosa compromet la seua eficàcia. Això se suma la constant restricció en l'ús de fitosanitaris a la UE a causa dels riscos que representen per a la salut humana i mediambiental.

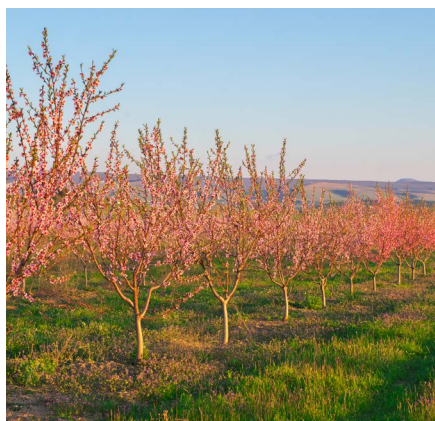
La gravetat d'estes malalties i la dificultat del seu control han impulsat la creació d'un consorci d'investigadors de centres d'investigació i universitats de diferents punts d'Espanya i amb experiència en diferents camps, que s'ha traduït en el projecte d'investigació nacional **XANTHERWO**, iniciat en 2022. Els objectius principals d'este projecte són la generació de coneixement per a entendre millor tant els mecanismes d'infecció d'estos bacteris com aquells associats amb la defensa de les plantes, i proposar diferents estratègies de biocontrol basades en l'ús de molècules naturals i microorganismes (Palacio-Bielsa i col., 2023).

Els estudis sobre la identificació i caracterització de *Xanthomonas* i de la interacció planta-patogen s'estan abordant mitjançant estratègies de genòmica i transcriptòmica. S'estan investigant i desenvolupant metodologies per a controlar les infeccions i evitar la disseminació dels patògens. Amb un enfocament preventiu, s'estan desenvolupant nous mètodes per a detectar els bacteris. A més, s'estan avaluant diferents mètodes de control directe, com l'ús de molècules naturals procedents o presents en les plantes que funcionen com a inductors de les defenses vegetals, o bé que presenten capacitat antimicrobiana. Així mateix, s'estan enllestit tractaments basats en l'ús de bacteriòfags, virus que ataquen de manera específica a estes *Xanthomonas* patògenes. També s'estan analitzant diferents aïllats bacterians i fúngics que podrien actuar com a antagonistes d'estes *Xanthomonas*.

A continuació, es presenten alguns dels prometedors resultats que s'estan obtenint.

1

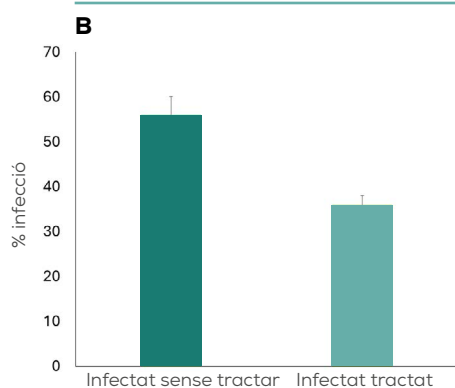
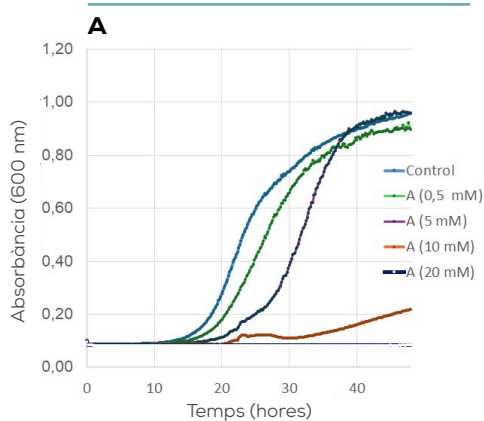
### *Xanthomonas* spp. presents a Espanya causants de la taca bacteriana dels fruiters d'os i l'ametler i de la sarna bacteriana del pimentó i de la tomaca



En el grup de l'INIA/CSIC s'ha aconseguit obtenir mitjançant seqüenciació massiva les seqüències completes dels genomes de les *Xanthomonas* objecte del projecte que es troben a Espanya, la qual cosa ha obert noves possibilitats per a comprendre la seua biologia i desenvolupar eines de control efectives. En el cas de Xap, les anàlisis detallades de genòmica comparativa han permès identificar elements genètics clau associats amb el seu caràcter patogen, i que estan relacionats amb els mecanismes de virulència utilitzats per a evadir les defenses de l'hoste i infectar teixits. La identificació d'estos mecanismes també ha servit com a base per a desenvolupar, en col·laboració amb el grup del CITA, estratègies de detecció més ràpides, sensibles i específiques. A més, estos estudis moleculars s'han complementat amb investigacions funcionals que validen el paper de determinats gens en els processos d'infecció, la qual cosa reforça la seua rellevància biològica i aplicada.

### FIGURA 3. EFECTE DE BIOMOLÈCULES ENFRONT DE XANTHOMONAS.

- A. Efecte de diferents concentracions de la molècula en el creixement de *Xanthomonas* enmig de cultiu líquid.  
B. Reducció del percentatge d'infecció.  
C i D. Reducció dels símptomes de la sarna bacteriana en plantes de tomaca sense tractar (C) i tractades (D) 48 h abans de la inoculació.



En el cas de *Xanthomonas* que afecten el pimentó i a la tomaca, les anàlisis genòmiques han permès una caracterització exhaustiva dels ceps actualment responsables de les infeccions a Espanya, així com la identificació de variacions genètiques relacionades amb la virulència. S'ha determinat la presència de *Xe* infectant únicament pimentó i, molt minoritàriament, de *Xv* afectant la tomaca. S'han realitzat estudis *in vitro* de resistència al coure amb una col·lecció de ceps espanyols de diferents orígens geogràfics i aïllades entre 1978 i 2024. A més, s'han dut a terme investigacions orientades a identificar gens que conferixen esta resistència. Com a resultat preliminar, s'han detectat ceps de sarna bacteriana resistents, i s'han revelat els mecanismes moleculars que medien esta resistència. En el cas de *Xap*, fins al moment no s'han detectat ceps resistents al coure. A més, està previst el mateix estudi en ceps de *Xanthomonas* no patògenes que coexistixen amb *Xap* i que podrien suposar un risc de transmissió de resistència a ceps de *Xap*. Totes estes troballes, realitzades dins d'una col·laboració liderada pel grup del CITA amb el grup de Sanitat Vegetal de la Junta de Castella i Lleó i l'INIA/CSIC, proporcionen una informació crítica per al disseny de noves estratègies de maneig integrat, essencials en un context d'agricultura sostenible.

## 2

### Ús de molècules d'efecte antimicrobià o inductores de les defenses naturals en plantes

La inducció de defenses en plantes implica la seua preparació perquè, en cas d'atacs de patògens, la resposta defensiva siga més ràpida i eficaç. El grup de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Jaume I (BB-UJI) està assajant enfront de *Xanthomonas* diferents molècules d'origen natural que han mostrat un clar efecte antimicrobià *in vitro* i un efecte en la inducció de defenses de les plantes enfront d'altres bacteris. A manera d'exemple, en la Figura 3 A se mostra la corba de creixement de *Xv* en un medi de cultiu sol (control) i amb diferents concentracions d'una de les molècules provades. En el cultiu lliure d'estes molècules s'observa clarament un creixement exponencial fins a la fase estacionària, mentre que en les concentracions més altes s'observa un creixement menor, i fins i tot inactivació del creixement, la qual cosa indica un efecte antimicrobià. Estos resultats apunten la possibilitat d'usar estes molècules com a mètode curatiu, una vegada detectats els símptomes. A més, s'està enllestit una aplicació preventiva en planta en concentracions menors a les antimicrobianes amb l'objectiu d'induir-ne les defenses abans de la infecció.

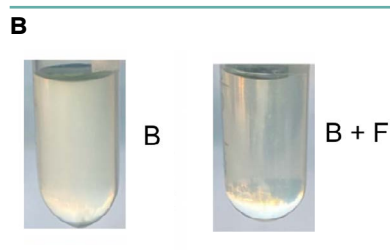
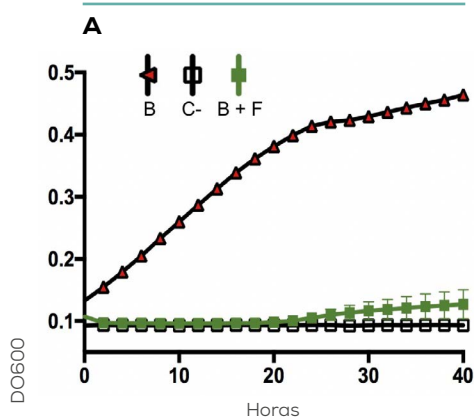
Estudis preliminars han mostrat que l'ús preventiu d'estes molècules pot arribar a reduir significativament tant la infecció com els símptomes de la sarna bacteriana en tomaca (Figura 3 B, C i D). Amb això s'aconsegueix reduir la dosi i, per tant, minorar els costos. A més, en treballs previs hem demostrat que estos inductors poden actuar contra un ampli rang de patògens, per la qual cosa podrien preparar la planta enfront de diferents malalties.



**FIGURA 4. BIOCONTROL DE XANTHOMONAS MEDIANTE FAGOTERAPIA.**

A. Crecimiento bacteriano en ausencia (B) y presencia de un fago lítico representativo (B + F) en medio de cultivo líquido, incluyendo como control negativo (C-) medio sin inocular. La reducción del crecimiento bacteriano se observa como una disminución de la  $DO_{600nm}$ .

B. Efecto bacteriolítico del fago sobre la bacteria (B + F) (abajo) con respecto al crecimiento de esta sin el fago (B) (arriba).



### 3

## Ús d'agents de biocontrol: fagoteràpia

Els bacteriòfags (o fags) són virus que només infecten bacteris. Alguns d'ells són lítics i poden causar la mort per lisi de determinades espècies bacterianes sense danyar altres organismes (Álvarez i col., 2023). Esta activitat bactericida natural s'utilitza com una estratègia terapèutica, denominada fagoteràpia, per al control selectiu i eficaç d'infeccions bacterianes en humans, animals i plantes (Biosca i Álvarez, 2024). La fagoteràpia és especialment prometedora en agricultura per a combatre els bacteris fitopatògens i ha demostrat ser efectiva fins i tot amb bacteris resistents a productes agroquímics. A més, pot combinar-se amb altres agents fitosanitaris per a augmentar-ne l'eficàcia i avançar cap a una agricultura més sostenible (Álvarez i col., 2023).

El grup BACPLANT de la Universitat de València (UV) ha aïllat fags lítics enfront de ceps espanyols de *Xanthomonas* patògens de plantes herbàcies i llenyoses, i està realitzant una caracterització biològica per a obtenir candidats a agents de biocontrol d'estos patògens. Després d'una selecció inicial dels fags aïllats, i en col·laboració amb el grup del CITA, s'està avaluant la seua capacitat de biocontrol *in vitro* mitjançant el monitoratge del creixement dels patògens diana en presència i absència de fags. En la Figura 4 es mostra un exemple d'un fag lític capaç de reduir el creixement d'un cep patògen de *Xanthomonas* respecte al control sense fag, així com el seu efecte bacteriolític. Prèviament a l'assaig en plantes, s'està avaluant l'eficàcia dels fags per a controlar la malaltia utilitzant fulles tallades. Els primers resultats han revelat una gran reducció dels símptomes de malaltia, la qual cosa demostra el potencial d'estos fags com a agents de biocontrol.

### 4

## Ús d'agents de biocontrol: microorganismes antagonistes

Un altre dels enfocaments que es pretén desenvolupar com a estratègia de control d'estes malalties en el projecte XANTHERWO és trobar bacteris que puguen tindre un efecte antagonista enfront de *Xanthomonas*. Els assajos que s'estan realitzant actualment es basen en l'estudi d'aïllats procedents de microbiota de diferents sòls i aigües, així com aïllats procedents de la microbiota epífita i endòfita de les plantes hostes. En este estudi estan implicats grups del consorci, com són UJI, CITA, UV i INIA/CSIC.

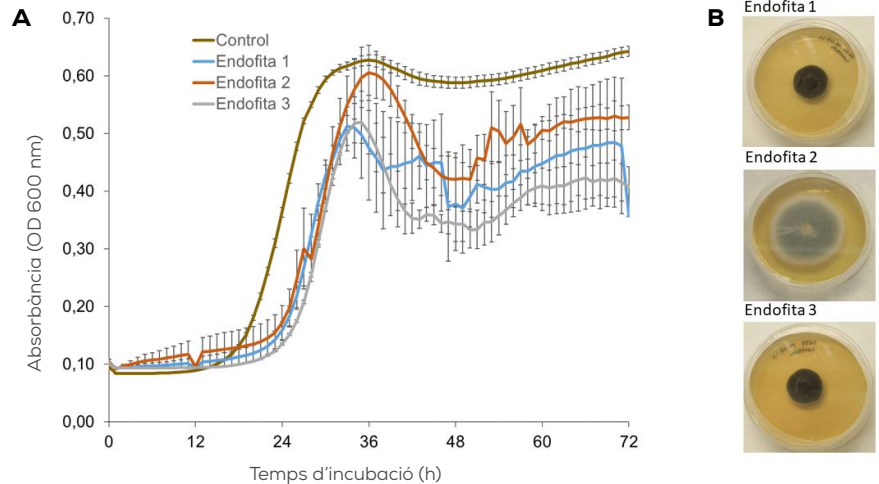
Actualment comptem amb una col·lecció d'aïllats que han mostrat un efecte d'inhibició del creixement dels bacteris patògens *in vitro*. En este moment s'estan posant a punt assajos de biocontrol per a demostrar el seu efecte en planta.

D'altra banda, l'aïllament i estudi de fongs endòfits, capaços de produir compostos que alteren el creixement de microorganismes patògens, i fins i tot induir les defenses de les plantes, és un camp que està obrint moltes possibilitats en el control de malalties de plantes (Liu-Xu i col., 2022).

Actualment, en el grup BB-UJI, s'està treballant amb exsudats de fongs endòfits que han mostrat un clar efecte antimicrobià enfront de *Xanthomonas* (Figura 5). S'ha optimitzat l'obtenció dels extractes i es pretén realitzar un estudi del seu efecte en planta.

### FIGURA 5. ANÀLISI DE L'EFECTE D'EXTRACTES DE DIFERENTS FONGS ENDÒFITS ENFRONT DE XANTHOMONAS.

- A. Corbes de creixement de *Xanthomonas* enmig de cultiu líquid (control) i enmig de cultiu líquid amb els filtrats dels tres cepes de fongs endòfits procedents de plantes de tomaca.
- B. Creixement d'estos tres cepes al mig PDA (Potato Dextrose Agar).



### AGRAÏMENTS

El present treball s'està realitzant gràcies al projecte coordinat PID2021-123600OR «Models de *Xanthomonas* causants de malalties en importants cultius de plantes herbàcies i llenyoses a Espanya, estudis comparatius i noves estratègies de control (XANTHERWO)», finançat per MICIU/AEI/10.13039/501100011033/ i per FEDER, UE.

Els autors agraïxen als Serveis de Sanitat Vegetal de les CC. AA. la informació facilitada sobre la situació de la sarna bacteriana a Espanya, així com la cessió de ceps i mostres vegetals que estan sent utilitzades en este projecte. El nostre agraïment especial a C. Arribas i R. Santiago (Junta d'Extremadura), T. Urrutia (Junta d'Andalusia), M. Betrán (Govern d'Aragó) i E. Marc-Noales (Generalitat Valenciana).



### CONCLUSIONS

Els resultats presentats, tot i ser encara preliminars, apunten a la possibilitat de la posada a punt de tractaments i bioinòculs, utilitzats sols o combinats, per al control de les malalties provocades per estes espècies de *Xanthomonas*. Els grups implicats continuen col·laborant i treballant amb l'objectiu d'aconseguir estratègies de control que permeten actuar en el context dels Objectius de Desenvolupament Sostenible i l'estratègia europea «Una sola salut». Els seus resultats pretenen oferir una alternativa o complement sostenible a les pràctiques agrícoles convencionals, per a reduir la dependència dels agroquímics i promoure la salut global.

#### >Autors de l'article:

Gemma Camañes<sup>1</sup>, Ana Palacio-Bielsa<sup>2</sup>, Jaime Cubero<sup>3</sup>, Elena G. Biosca<sup>4</sup>, Luisa Liu Xu<sup>1</sup>, Lorena Sánchez Jiménez<sup>1</sup>, Loredana Scalschi<sup>1</sup>, Atefeh Favardin<sup>1</sup>, Eugenio Llorens<sup>1</sup>, Isabel M<sup>a</sup> Berruete<sup>2</sup>, Sara Cuesta-Morrondo<sup>3</sup>, Leticia Martín<sup>3</sup>, Salvador Sastre<sup>3</sup>, Pilar Sauquillo<sup>3</sup>, Cristina Redondo<sup>3</sup>, Jan Mutke<sup>3</sup>, Jerson Garita-Cambronero<sup>5</sup>, José Luis Palomo<sup>6</sup>, Jorge Iribarren<sup>6</sup>, Montserrat Roselló<sup>7</sup>, Ana Patricia Fernández-Getino<sup>8</sup>, Sergi Maicas<sup>4</sup>, Belén Álvarez<sup>4,9</sup>, Rosa Vázquez<sup>4</sup>, Isabel Salas<sup>4</sup>, José F. Català-Senent<sup>4</sup> i Begonya Vicedo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Grup de Bioquímica i Biotecnologia, Departament de Biologia, Bioquímica i Ciències Naturals. Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals, Universitat Jaume I (UJI), Castelló de la Plana. <sup>2</sup> Departament de Sistemes Agrícoles, Forestals i Medio Ambiente. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza. <sup>3</sup> Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria/Consejo Superior de Investigaciones Científicas (INIA/CSIC), Madrid. <sup>4</sup> Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universitat de València (UV), Burjassot, València. <sup>5</sup> Laboratorio de Biología Molecular y Secuenciación. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Valladolid. <sup>6</sup> Centro Regional de Diagnóstico. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Junta de Castilla y León, Aldearrubia, Salamanca. <sup>7</sup> Laboratorio de Diagnóstico Fitopatológico del Servicio de Análisis Agroalimentario. Generalitat Valenciana, Silla, València. <sup>8</sup> Estación de Ensayos de Semillas y Plantas de Vivero. INIA/CSIC, Madrid. <sup>9</sup> Departamento de Investigación Aplicada y Extensión Agraria. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Alcalá de Henares, Madrid.

bvicedo@uji.es