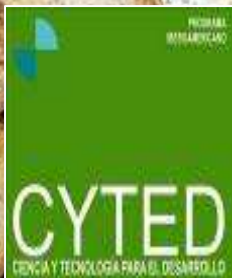




DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SUPERVIVENCIA Y TRANSMISIÓN POR SEMILLA DE *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* EN ALMENDRO

Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., Berruete, I. M., Collados, R., Palazón, M. L., Cubero, J., Garita, J., López, M. M.

(Proyecto INIA RTA 2011-00140-C03-03)



SEGUNDA REUNIÓN DE COORDINACIÓN DE LA RED CYTED
112RT0441-Taller sobre producción de plantas de alta
calidad genético-sanitaria
Pelotas, Brasil, 5 a 7 noviembre 2013

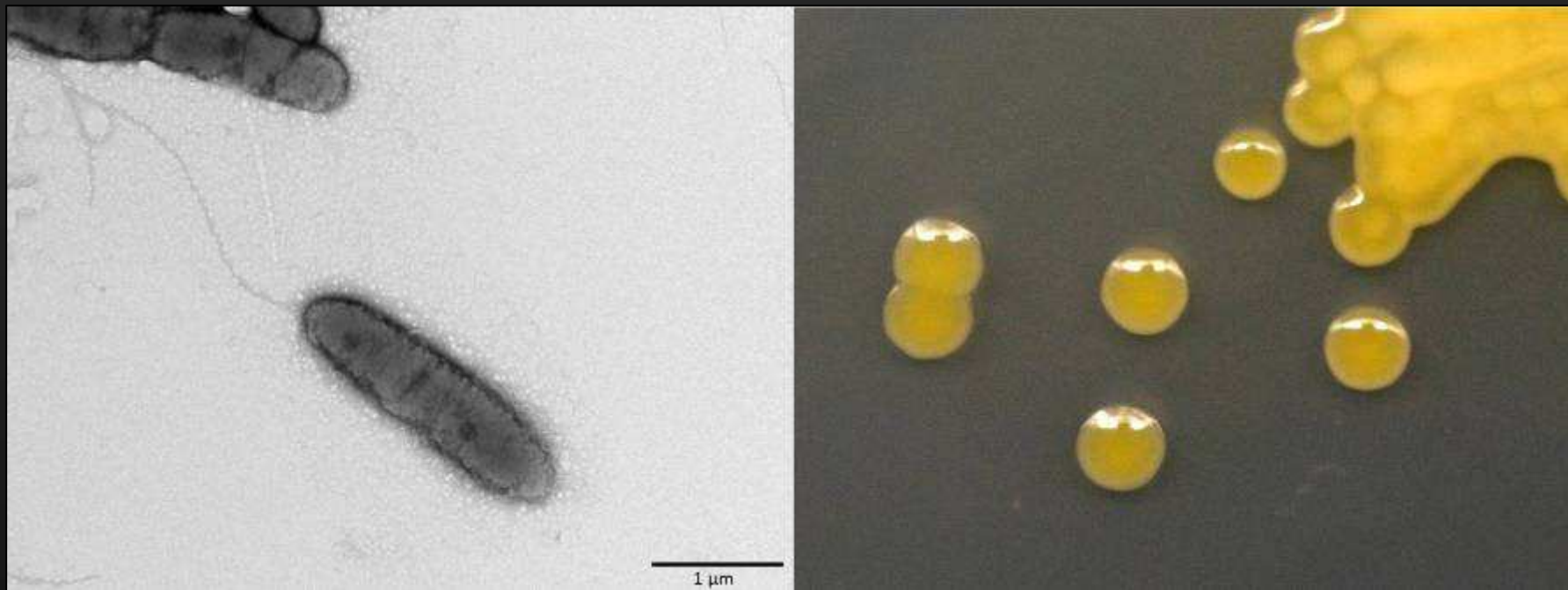
Xanthomonas arboricola* pv. *pruni
(Mancha bacteriana de frutales de hueso y del almendro)

**Organismo nocivo de cuarentena en la Unión Europea
que afecta a frutales y ornamentales del género *Prunus***

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 μm de ancho y 0,8-1,7 μm de largo, y móviles por un solo flagelo polar
- Gram negativa, aerobia estricta, con las características propias de su género (Bradbury, 1984)

Morfología de *X. arboricola* pv. *pruni*



J. Garita (INIA)

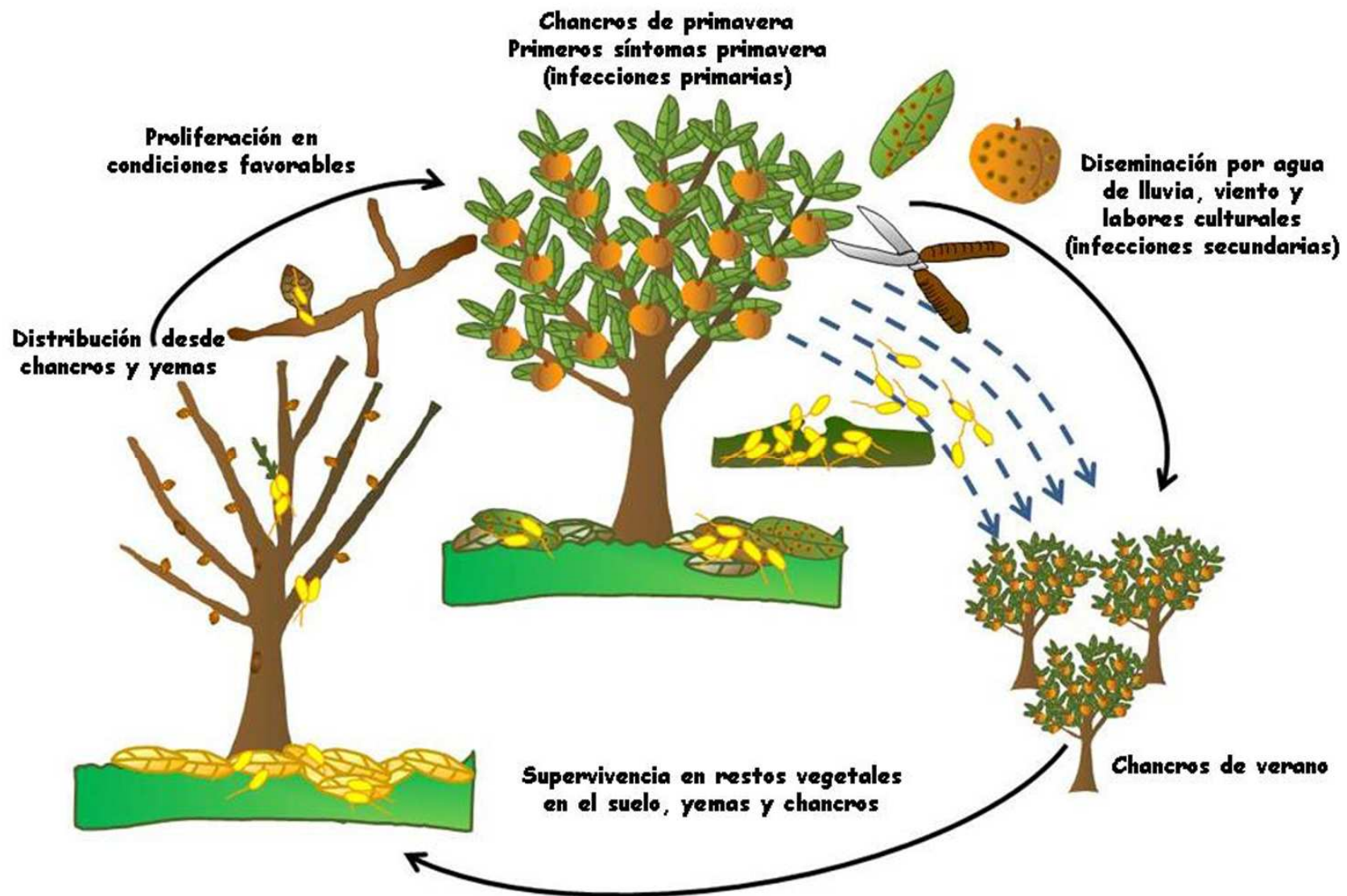
Epidemiología de *X. arboricola* pv. *pruni*

- 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: lluvia, viento, técnicas culturales. **Material vegetal, con o sin síntomas** (frecuentes infecciones latentes). Por semilla (estudios en almendro, no publicados)

Importancia de la enfermedad

- Frutos afectados carecen de valor comercial. Debilitamiento del árbol y disminución de producción
- No se dispone de información sobre los daños debidos a la enfermedad en España
- Sin embargo, 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)

Ciclo de la enfermedad



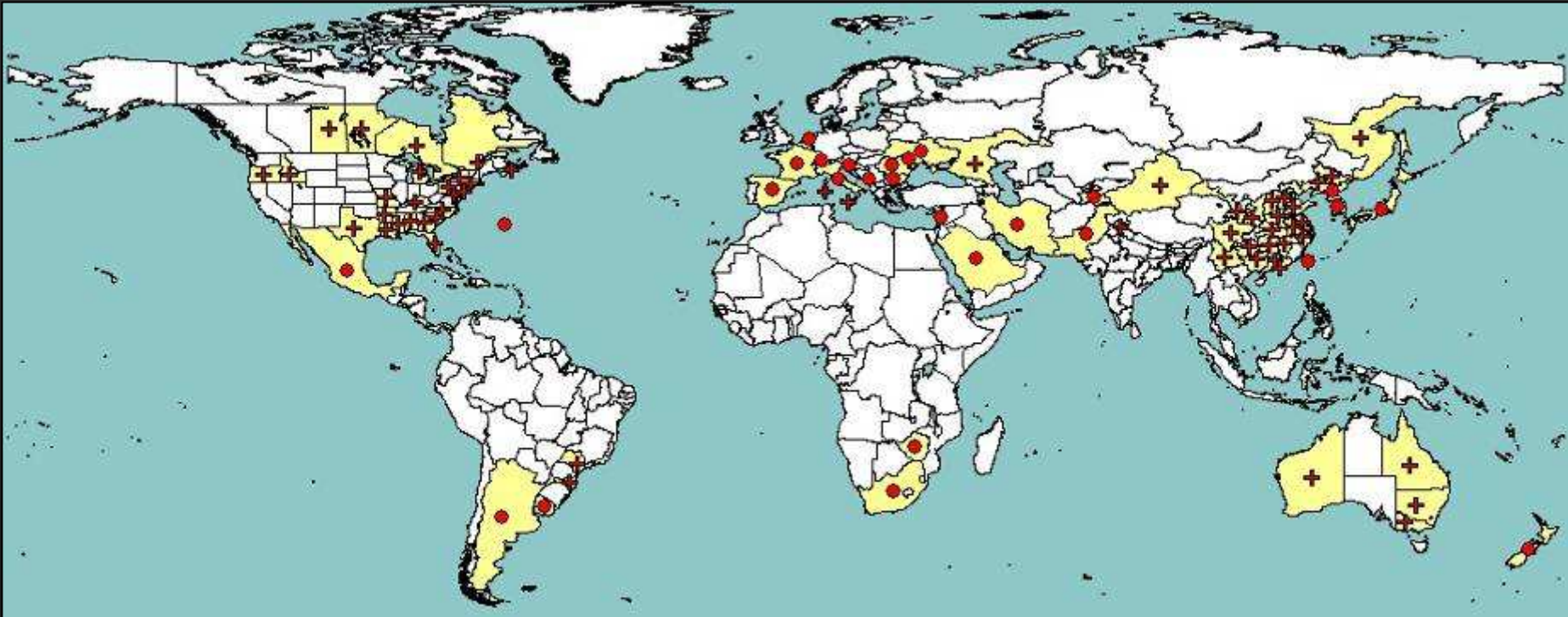
Presente en casi todos los países productores de frutales de hueso (EPPO, 2013)

- ✓ **África:** Sudáfrica y Zimbabwe
- ✓ **América:** Argentina, Bermudas, Brasil, Canadá, EE. UU., Méjico y Uruguay
- ✓ **Asia:** Arabia Saudí, República Popular Democrática de Corea (Corea del Norte), República de Corea (Corea del Sur), China, India, Japón, Líbano, Pakistán, Tayikistán y Taiwán
- ✓ **Europa:** Bulgaria, Eslovenia, España, Francia, Holanda, Italia, Moldavia, Montenegro, Rumanía, Rusia, Suiza y Ucrania
- ✓ **Oceanía:** Australia y Nueva Zelanda

No son correctas las citas de Japón y Sicilia (Italia) en almendro
(Ishiyama, 1923; Ciccarone, 1958, 1959)

EPPO Plant Quarantine Retrieval System (PQR), 2013

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



+ Presente (cita nacional)

• Presente (cita subnacional)

Situación actual en España

- ✓ Primera detección en Extremadura, en 2002 en ciruelo
- ✓ **DETECCIONES POSTERIORES (enfermedad emergente)**
 - Comunidad Valenciana
 - Aragón
 - Cataluña
 - Navarra
 - Baleares
 - Previsibles nuevas detecciones en otras CC. AA.
- ✓ Detectada en ciruelo, melocotonero, nectarino, almendro y, puntualmente, en albaricoquero y cerezo

Se están adoptado medidas de erradicación



Detección cronológica de brotes de *X. arboricola* pv. *pruni* en España


España tiene una extensión de 504.645 km²

Cultivo de frutales de hueso y almendro en España

Superficies cultivadas y producción (FAOSTAT, 2011; MAGRAMA, 2012)

- ❖ **Albaricoquero: 21.172 ha** (12º productor mundial)
- ❖ **Cerezo: 32.419 ha** (5º productor mundial)
- ❖ **Ciruelo: 15.097 ha** (8º productor mundial)
- ❖ **Melocotonero y nectarino: 79.617 ha** (3º productor mundial)

Almendro: 571.183 ha
2º productor mundial y 1º de la UE



**Estudio de la supervivencia y transmisión
de *X. arboricola* pv. *pruni* en los procesos de
multiplicación por semilla**

X. arboricola pv. *pruni* en hojas de almendro



***X. arboricola* pv. *pruni* en frutos de almendro**



Primeros estadíos



Evolución de los síntomas

Pérdidas de cosecha



Caída prematura de frutos



Frutos adheridos al árbol tras recolección



Disminución del rendimiento



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





**Almendras con síntomas
(4°C, 2 años) y sanas (control)**



**Estratificación (4°C, 9 semanas)
50% perlita y arena estéril (humedad)**



Germinación

**Siembra
vermiculita estéril
25°C día/21°C noche y 16 h luz**



**Plántulas sin
síntomas
(4 a 7 semanas)**

Técnicas de detección e identificación

- **PCR-tr** (transportador ABC) (Palacio-Bielsa y col., 2011). Poblaciones estimadas mediante rectas de calibración de muestras inoculadas
- **Aislamiento** (cultivabilidad/viables) LPGA+cicloheximida (250 mg/l)
- **Análisis de secuencias multilocus de genes conservados en *Xanthomonas* (*gyrB*, *dnaK*, *fyuA* y *rpoD*)** de una selección al azar de cepas aisladas de almendras para verificar la identidad de *X. arboricola* pv. *pruni* (J. Cubero y J. Garita, INIA, Madrid)
- **Poder patógeno** de una selección al azar de cepas aisladas de almendras y plántulas (inoculación en patrón de melocotonero GF-305)

ANÁLISIS PCR-tr: preparación de las muestras



Distintos compuestos fenólicos en las diferentes partes de la almendra (epicarpio, mesocarpio, endocarpio, semilla)



➤ **Lavado** (método no destructivo) y **extracción de ADN** (Llop y col., 1999) para minimizar riesgo de falsos negativos en PCR-tr



➤ **Machacado ligero** y **extracción de ADN** para minimizar riesgo de falsos negativos en PCR-tr

PCR-tr Y AISLAMIENTO

216 almendras con síntomas
50 almendras sanas (control) *

Estratificación

29 fallos de germinación

187 almendras germinadas
(101 analizadas por PCR-tr y aislamiento)

		Aislamiento	
		+	-
PCR-tr	+	211	5
	-	0	0
Congruencia: 97,7%			

		Aislamiento	
		+	-
PCR-tr	+	32	69
	-	0	0
Congruencia: 31,7%			

* No se detectó *X. arboricola* pv. *pruni* en los controles sanos

Siembra de 187 almendras

86 fallos de
nascencia

101 plántulas sin síntomas

Cotiledón		Aislamiento	
		+	-
PCR-tr	+	80	19
	-	1	1
Congruencia: 80,2%			

Parte aérea		Aislamiento	
		+	-
PCR-tr	+	75	25
	-	0	1
Congruencia: 75,2%			

No se detectó *X. arboricola* pv. *pruni* en los controles sanos

OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS

- ✓ Los **análisis de secuencias multilocus** de las cepas seleccionadas confirmaron su identidad como *X. arboricola* pv. *pruni*
- ✓ La inoculación en GF-305 confirmó la patogenicidad de la selección de cepas estudiadas. Las cepas aisladas de las plántulas **mantenían su poder patógeno en GF-305**

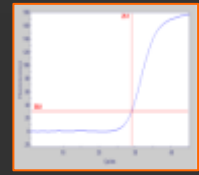
Poblaciones estimadas de *X. arboricola* pv. *pruni* (rectas de calibración PCR-tr)

Poblaciones (ufc/ml)	Preestratificación	Postestratificación	Plántulas	
			Cotiledón	Parte aérea
10 ⁷	39,35%	14,8%	12,87%	10,89%
10 ⁶	53,7%	63,4%	40,59%	32,67%
10 ⁵	5,55%	20,8%	31,76%	17,82%
10 ⁴	0,92%	1%	8,91%	16,83%
10 ³	0,46%	0	3,96%	11,88%
10 ²	0	0	0	4,95%
10 ¹	0	0	0	3,96%
1	0	0	1,98%	0,99%

✓ Las poblaciones de *X. arboricola* pv. *pruni* disminuyeron a lo largo de las distintas etapas del ensayo



CONCLUSIONES I



- ✓ Mediante PCR-tr se detectó *X. arboricola* pv. *pruni* prácticamente en todas las muestras (100% de almendras antes y después de la estratificación, 98% de cotiledones y 99% de partes aéreas de plántulas, respectivamente).
- ✓ El éxito del aislamiento de *X. arboricola* pv. *pruni* en las almendras antes de estratificar fue el 97,7%, disminuyó tras la estratificación (31,7% de muestras positivas), y se recuperó parcialmente en plántulas (80,2% de muestras de cotiledones positivas y 74,2% de partes aéreas, respectivamente).



CONCLUSIONES II



- ✓ La dificultad del aislamiento de *X. arboricola* pv. *pruni* en almendras estratificadas podría estar relacionada con la presencia de microbiota que interfiriera en su crecimiento, y no se debe descartar la posible inducción del estado VNC.
- ✓ Los resultados de este trabajo demuestran, por primera vez, la supervivencia y transmisión de *X. arboricola* pv. *pruni* a través de semilla en almendro. Su detección a lo largo del ensayo mediante PCR-tr y aislamiento, pone de manifiesto el riesgo de dispersión del patógeno en la multiplicación por semilla (estudios de variedades).



¡¡GRACIAS POR SU ATENCIÓN!!