

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Programa de doctorado en Recursos y Tecnologías Agrícolas

## INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**ivia**  
instituto valenciano  
de investigaciones agrarias

### Tesis doctoral

**Especies de *Xanthomonas* causantes de enfermedades en  
frutales de hueso y almendro: diagnóstico, diversidad genética  
y taxonomía**

**PABLO LÓPEZ SORIANO**

Directoras:

Dra. María Milagros López

Dra. Ester Marco Noales

Tutor:

Dr. Josep Armengol Fortí

Valencia, mayo de 2017



Dra. María Milagros López González, Profesora de Investigación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Dra. Ester Marco Noales, colaboradora científica adjunta del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y Dr. Josep Armengol Fortí, Catedrático del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Universitat Politècnica de València

CERTIFICAN:

Que D. Pablo López Soriano ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Bacteriología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, el trabajo que con el título “Especies de *Xanthomonas* causantes de enfermedades en frutales de hueso y almendro: diagnóstico, diversidad genética y taxonomía”, presenta para optar al grado de Doctor.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en

Valencia, a 15 de mayo de 2017.

Dra. María M. López González

Dra. Ester Marco Noales

Dr. Josep Armengol Fortí



## **Agradecimientos**

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mis dos directoras, por aceptar la dirección de esta tesis y por haberme dado la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Bacteriología del IVIA. A María Milagros López, Chiqui, muchas gracias por haber confiado en mí desde el primer momento, por tu gran profesionalidad y enorme dedicación a esta tesis, y por haberme transmitido una pequeña parte de tu amplio conocimiento científico, que ya es mucho. A Ester Marco, muchas gracias por tu enorme esfuerzo y apoyo todos estos años, por tus sabios consejos y por transmitirme tu alegría y serenidad incluso en los momentos más difíciles, que ha sido de gran ayuda.

Gracias a Josep Armengol por haber aceptado ser mi tutor en la Universidad y por su gran apoyo y ayuda durante todos estos años. Con él empecé en el mundo de la patología vegetal y en gran parte gracias a él tomé la decisión de realizar la tesis.

A todos los compañeros del laboratorio de Bacteriología del IVIA con los que he coincidido estos años, Clara, Javi, Adela, Inma, Carmina, Mari, Tere, Belén y Ramón, porque ha sido un lujo trabajar a vuestro lado. Muchas gracias por habérmelo puesto tan fácil desde el primer día, por vuestra agradable compañía y por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Ha sido un privilegio formar parte de este laboratorio.

A los vecinos del laboratorio de Virología, a Mariano por su gran alegría y optimismo y por preocuparse siempre por mí, a Mari Carmen por mostrarme siempre su apoyo y especialmente al gran Edson Bertolini, porque siempre ha estado dispuesto a ayudarme, por sus buenos consejos y su amistad.

A Rosa Peiró, por su energía, su paciencia y por ofrecerme su ayuda desinteresada en todo momento.

A todos los becarios con los que he coincidido en el IVIA, Silvia, Bego, Dani, Gabi, Josep, Marta, Vidal, Ana, Félix, José F., Joaquín, Elena y Khaled, por su amistad, apoyo, comprensión, por todas las risas y todos los buenos ratos que hemos compartido tanto dentro como fuera del laboratorio. Nadie mejor que nosotros sabe por lo que hemos pasado.

A Jaime Cubero, por permitirme hacer pequeñas estancias en su laboratorio del INIA en Madrid y a todo su equipo, que me acogieron y me hicieron sentir como uno más. Quiero agradecer especialmente a Jerson Garita, por su amistad, su paciencia y su inestimable ayuda en todo momento.

A Ana Palacio, por su gran ayuda y aportación a este trabajo, desde el envío de numerosas cepas y material vegetal, hasta sus rápidas y minuciosas correcciones que han hecho posible que esta tesis salga adelante. A Miguel Cambra, posiblemente la persona que más sepa de *X. arboricola* pv. *pruni* de España, por todo el material que nos ha pasado, como su impresionante material fotográfico, por sus consejos y por estar siempre dispuesto a echar una mano.

A Olivier Pruvost y Christian Vernière, por permitirme hacer dos estancias en su laboratorio del CIRAD en Isla Reunión, por haberme enseñado tanto durante esos meses, pero también por su simpatía, su amabilidad y por hacerme sentir como en casa estando tan lejos de ella. A todo el personal y técnicos del CIRAD, que me facilitaron muchísimo el trabajo, sobre todo Karine. Y a todos los amigos que hice allí, Borja, Lensa, Maeva, Isabelle, Morguen, Noura y especialmente Gilles y Jeremy, que me acogieron en su casa sin apenas conocerme. A todos ellos

muchísimas gracias por hacerme vivir una de las mejores experiencias de mi vida en esa maravillosa isla.

A mis amigos de Rocafort, que sois como mis hermanos, muchísimas gracias por todas las quedadas, todas las cenas, todos los partidos, todos los viajes y por todos vuestros ánimos y ayuda durante todo este tiempo. Es imposible no pasárselo bien con vosotros. A mis amigos de Guadalaviar, porque aunque nos veamos menos de lo que me gustaría, habéis sido un apoyo muy importante durante estos años. Las quedadas con vosotros en el pueblo son uno de los mejores momentos del año. También quería agradecer a mis amigos de la universidad por sus constantes muestras de apoyo.

A mi familia, mi madre Gloria y mis hermanos María José, Reyes y Fernando, porque sois mis pilares, es imposible expresar con palabras todo mi agradecimiento, por haber confiado siempre en mí, por todo vuestro apoyo, vuestro cariño, vuestros sabios consejos y, en definitiva, por estar siempre ahí. A mis cuñados Santi, Manolo y Raquel, y a mis sobrinos Alejandro, Raúl, Elisa, Mario, Carla, Sofía y Raquel, que son la alegría de la familia.

A Neus, que apareció en mi vida durante el transcurso de esta tesis, muchas gracias por tu apoyo constante, por tu comprensión y por estar a mi lado de forma incondicional. Gracias a ti este trayecto ha sido mucho más fácil de recorrer.





# Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>IX</b>
<b>Resum.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>XV</b>
<b>Capítulo 1: Introducción general .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 El género <i>Xanthomonas</i>.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Descripción general .....	4
1.1.2 Clasificación taxonómica .....	5
<b>1.2 <i>Xanthomonas arboricola</i> .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Descripción general .....	10
1.2.2 Diversidad genética de <i>X. arboricola</i> .....	11
1.2.3 Principales enfermedades asociadas a <i>X. arboricola</i> .....	13
<b>1.3 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>.....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Descripción de <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> .....	15
1.3.2 Distribución geográfica de <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> .....	17
1.3.3 Impacto económico causado por <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> .....	20
1.3.4 Gama de huéspedes de <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> .....	21
1.3.5 Sintomatología asociada a la mancha bacteriana .....	25
1.3.6 Diagnóstico, detección e identificación de <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> .....	31
1.3.7 Epidemiología de la mancha bacteriana.....	45
1.3.8 Diversidad genética de <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> .....	52
1.3.9 Control de <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> .....	55

<b>Capítulo 2: Justificación y objetivos.....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 3: Inmunoensayo de flujo lateral para la detección <i>in situ</i> de <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> en muestras de campo sintomáticas .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Abstract .....</b>	<b>70</b>
<b>3.2 Introduction.....</b>	<b>71</b>
<b>3.3 Material and methods.....</b>	<b>74</b>
3.3.1 Bacterial strains and growth conditions .....	74
3.3.2 Production and characterization of the antisera against <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> .....	75
3.3.3 Lateral flow immunoassay .....	76
3.3.4 Specificity assays.....	78
3.3.5 Sensitivity assays.....	79
3.3.6 Comparison of LFIA with plate isolation and real time PCR for detection of <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> in naturally infected samples	80
<b>3.4 Results .....</b>	<b>82</b>
3.4.1 Specificity assays.....	82
3.4.2 Sensitivity assays.....	83
3.4.3 Comparison of LFIA with plate isolation and real time PCR for detection of <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> in naturally infected samples	84
<b>3.5 Discussion .....</b>	<b>89</b>
<b>3.6 Acknowledgments.....</b>	<b>93</b>
<b>3.7 Supporting information .....</b>	<b>95</b>

**Capítulo 4: El análisis mediante “Multilocus variable number of tandem repeat” revela múltiples introducciones en España de *X. arboricola* pv. *pruni*, agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y el almendro ..... 107**

<b>4.1 Abstract .....</b>	<b>110</b>
<b>4.2 Introduction.....</b>	<b>111</b>
<b>4.3 Material and methods.....</b>	<b>114</b>
4.3.1 Bacterial strains and DNA extraction.....	114
4.3.2 Genomic DNA isolation, sequencing and annotation.....	116
4.3.3 TR selection.....	117
4.3.4 MLVA scheme .....	118
4.3.5 Data scoring and analysis.....	122
4.3.6 Genetic diversity of Spanish strains.....	122
<b>4.4 Results .....</b>	<b>123</b>
4.4.1 Selection of TR markers .....	123
4.4.2 MLVA genotyping of the Spanish strains .....	125
4.4.3 MLVA genotyping of a worldwide collection .....	131
<b>4.5 Discussion .....</b>	<b>133</b>
<b>4.6 Acknowledgments.....</b>	<b>138</b>
<b>4.7 Supporting information .....</b>	<b>139</b>

**Capítulo 5: *Xanthomonas prunicola* sp. nov., un nuevo patógeno que afecta a nectarino..... 155**

<b>5.1 Abstract .....</b>	<b>158</b>
<b>5.2 Introduction.....</b>	<b>159</b>

<b>5.3 Material and methods</b> .....	<b>161</b>
5.3.1 Bacterial strains and growth conditions .....	161
5.3.2 Pathogenicity tests.....	162
5.3.3 Serological tests and PCR analysis .....	163
5.3.4 Sequence analysis of the 16S rRNA gene .....	164
5.3.5 Multilocus sequence analysis .....	164
5.3.6 Comparative whole genome analysis based on average nucleotide sequence.....	165
5.3.7 Phenotypic characterization .....	166
<b>5.4 Results and discussion</b> .....	<b>168</b>
5.4.1 Pathogenicity tests.....	168
5.4.2 Serological tests and PCR analysis .....	169
5.4.3 Sequence analysis of the 16S rRNA gene .....	170
5.4.4 Multilocus sequence analysis .....	172
5.4.5 Comparative whole genome analysis based on average nucleotide sequence.....	174
5.4.6 Phenotypic characterization .....	175
<b>5.5 Description of <i>Xanthomonas prunicola</i> sp. nov</b> .....	<b>179</b>
<b>5.6 Acknowledgments</b> .....	<b>181</b>
<b>5.7 Supporting information</b> .....	<b>183</b>
 <b>Capítulo 6: Discusión general</b> .....	 <b>187</b>
 <b>Capítulo 7: Conclusiones</b> .....	 <b>199</b>
 <b>Bibliografía general</b> .....	 <b>203</b>

## Resumen

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* es el agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso, el almendro y especies ornamentales del género *Prunus*. Este patógeno constituye una de las mayores amenazas para estas especies debido a las pérdidas económicas que genera, por lo que está considerado como un organismo de cuarentena en la Unión Europea (UE). Se han descrito numerosos brotes en países miembros de la UE en los últimos años y entre ellos en España, donde ha sido detectada la bacteria en siete Comunidades Autónomas.

Ante la importancia de esta enfermedad emergente y la carencia de información sobre la misma, en este trabajo se han abordado aspectos relacionados con su diagnóstico y epidemiología que permitirán ampliar nuestro conocimiento sobre ella. Además, también se ha realizado la caracterización taxonómica de tres cepas atípicas de *Xanthomonas* aisladas de nectarino, que causan síntomas similares a los producidos por *X. arboricola* pv. *pruni*.

En primer lugar, se ha desarrollado un prototipo de tiras inmunológicas de flujo lateral para el diagnóstico de la mancha bacteriana. Para su diseño, se partió de dos anticuerpos policlonales que se combinaron con nanopartículas de carbono y se ensamblaron en membranas de nitrocelulosa. Se analizó la especificidad de las tiras, obteniendo resultado positivo con todas las cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* ensayadas. El límite de detección obtenido con las tiras de flujo lateral fue de  $10^4$  UFC/ml, que es suficiente para la detección de esta bacteria en muestras sintomáticas. Para comprobar su fiabilidad y precisión, el prototipo desarrollado se utilizó en el análisis de muestras de campo naturalmente infectadas y muestras sanas, y los resultados se compararon con los obtenidos en el aislamiento en

medio de cultivo y los de PCR en tiempo real, observándose una elevada correlación entre las tres técnicas.

En segundo lugar, como *X. arboricola* pv. *pruni* se detectó por primera vez en España en 2002, y desde entonces se han producido brotes de la enfermedad en 11 provincias, se consideró de interés estudiar las relaciones existentes entre una colección de 239 cepas españolas de esta bacteria procedentes de viveros, plantaciones e intercepciones, con la técnica del “Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis” (MLVA). Se demostró su gran poder de resolución ya que permitió clasificar las cepas en 18 grupos genéticos. Los resultados obtenidos sugieren que en España se han producido múltiples introducciones de la bacteria, y que los viveros han jugado un papel importante en la introducción y diseminación del patógeno a través de la comercialización de material vegetal contaminado.

Por último, se analizaron fenotípicamente y molecularmente tres cepas aisladas en nectarinos de la provincia de Murcia, que mostraban síntomas similares a los causados por *X. arboricola* pv. *pruni*. Los primeros análisis basados en test bioquímicos y PCR resultaron negativos para este patógeno. Por tanto, se ha llevado a cabo la caracterización taxonómica de dichos aislados a través de un estudio polifásico, comparándolos con cepas de referencia de otras especies de *Xanthomonas*. Además, se realizaron inoculaciones que confirmaron la patogenicidad de las cepas. Los resultados obtenidos han permitido clasificar estas cepas como una nueva especie del género *Xanthomonas*, para la que se ha propuesto el nombre de *Xanthomonas prunicola* y para la que se han definido sus características diferenciales de las otras especies de este género.

Los trabajos presentados en esta memoria han aportado un nuevo método rápido de diagnóstico in situ de la mancha bacteriana, el desarrollo una nueva

metodología para la evaluación de la diversidad genética de una selección de cepas españolas de *X. arboricola* pv. *pruni*, así como la descripción de una nueva especie de *Xanthomonas* que afecta a nectarino.





## Resum

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* és l'agent causal de la taca bacteriana dels fruiters d'os, l'ametler i espècies ornamentals del gènere *Prunus*. Aquest patògen constitueix una de les majors amenaces per a aquestes espècies a causa de les pèrdues econòmiques que genera, per la qual cosa està considerat com un organisme de quarantena en la Unió Europea (UE). S'han descrit nombrosos brots en països membres de la UE en els últims anys i entre ells a Espanya, on ha sigut detectat el bacteri en set Comunitats Autònomes.

Davant la importància d'aquesta malaltia emergent i la manca d'informació sobre aquest tema, en aquest treball s'han abordat aspectes relacionats amb el seu diagnòstic i epidemiologia que permetran ampliar el nostre coneixement sobre ella. A més, també s'ha realitzat la caracterització taxonòmica de tres ceps atípics de *Xanthomonas* aïllats de nectariner, que causen símptomes similars als produïts per *X. arboricola* pv. *pruni*.

En primer lloc, s'ha desenvolupat un prototip de tires immunològiques de flux lateral per al diagnòstic de la taca bacteriana. Per al seu disseny, es va partir de dos anticossos policlonals que es van combinar amb nanopartícules de carboni i es van assemblar en membranes de nitrocel·lulosa. Es va analitzar l'especificitat de les tires obtenint resultat positiu amb tots els ceps de *X. arboricola* pv. *pruni* assajats. El límit de detecció obtingut amb les tires de flux lateral va ser de  $10^4$  UFC/ml, que és suficient per a la detecció d'aquest bacteri en mostres amb símptomes de la malaltia. Per a comprovar la seua fiabilitat i precisió, el prototip desenvolupat es va utilitzar en l'anàlisi de mostres de camp naturalment infectades i mostres sanes, i els resultats es van comparar amb els obtinguts en l'aïllament en medi de cultiu i els de PCR en temps real, observant-se una elevada correlació entre les tres tècniques.

En segon lloc, com que *X. arboricola* pv. *pruni* es va detectar per primera vegada a Espanya en 2002, i des de llavors s'han produït brots de la malaltia en 11 províncies, es va considerar d'interès estudiar les relacions existents entre una col·lecció de 239 ceps espanyols d'aquest bacteri procedents de vivers, plantacions i intercepcions amb la tècnica del "Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis" (MLVA). Es va demostrar el seu gran poder de resolució ja que va permetre classificar els ceps en 18 grups genètics. Els resultats obtinguts suggereixen que a Espanya s'han produït múltiples introduccions del bacteri, i que els vivers han jugat un paper important en la introducció i disseminació del patogen a través de material vegetal contaminat.

Finalment, es van analitzar fenotípicament i molecularment tres ceps aïllats en nectariners de la província de Múrcia, que mostraven símptomes similars als causats per *X. arboricola* pv. *pruni*. Les primeres anàlisis basades en test bioquímics i PCR van resultar negatius per a aquest patogen. Per tant, s'ha dut a terme la caracterització taxonòmica de dits aïllats a través d'un estudi polifàsic, comparant aquests amb ceps de referència d'altres espècies de *Xanthomonas*. A més, es van realitzar inoculacions que van confirmar la patogenicitat dels ceps. Els resultats obtinguts han permès classificar aquests ceps com una nova espècie del gènere *Xanthomonas*, per a la qual s'ha proposat el nom de *Xanthomonas prunicola*, i per a la que s'han definit les seues característiques diferencials de les altres espècies d'aquest gènere.

Els treballs presentats en aquesta memòria han aportat un nou mètode ràpid de diagnòstic in situ de la taca bacteriana, el desenvolupament d'una nova metodologia per a l'avaluació de la diversitat genètica d'una selecció de ceps espanyols de *X. arboricola* pv. *pruni*, així com la descripció d'una nova espècie de *Xanthomonas* que afecta al nectariner.

## Abstract

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* is the causal agent of the bacterial spot disease of stone fruits, almond and ornamental species of *Prunus*. This pathogen constitutes one of the major threats to this group of species due to the economic losses it generates, and it is therefore considered as a quarantine organism in the European Union (EU). Recently, several outbreaks of the disease have been described in EU countries including Spain, where this pathogen has been detected in seven regions.

Given the importance of this emerging disease and the lack of information about it, several aspects related to its diagnosis and epidemiology have been addressed in this work. Additionally, taxonomic characterization of three atypical *Xanthomonas* strains isolated from nectarines, causing similar symptoms to those produced by *X. arboricola* pv. *pruni*, have also been performed.

First, a prototype of lateral flow immunoassay has been designed for the diagnosis of bacterial spot disease. It was developed by producing two polyclonal antibodies which were then combined with carbon nanoparticles and assembled on nitrocellulose strips. The specificity of the immunoassay was tested, obtaining a positive result with all the strains of *X. arboricola* pv. *pruni* analyzed. The limit of detection observed was  $10^4$  CFU/ml, which is sufficient for the detection of this pathogen in symptomatic samples. To demonstrate the accuracy and the reliability of the immunoassay, the prototype developed was used in the analysis of naturally infected field samples and healthy samples. Results were compared to those obtained by plate isolation and real time PCR, and a high correlation among techniques was observed.

In a second step, as *X. arboricola* pv. *pruni* was first detected in Spain in 2002, and in subsequent years several outbreaks have occurred in 11 provinces, it was considered of interest to study the relationships between a collection of 239 Spanish strains of this pathogen originated from nurseries, orchards and interceptions with the technique of the Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA). This method confirmed its high discriminatory power and the strains were grouped in 18 genetic clusters. The results obtained suggest multiple introductions of *X. arboricola* pv. *pruni* in Spain, and the leading role of the nurseries in the introduction and dissemination of this pathogen through the commercialization of contaminated plant propagation material.

Finally, three strains isolated from nectarines in Murcia showing similar symptoms to those produced by *X. arboricola* pv. *pruni*, were analyzed using both phenotypic and molecular methods. The first results of biochemical tests and PCR were negative for this pathogen. Therefore, these isolates have been subjected to a taxonomic characterization through a polyphasic approach, comparing them with reference strains of other *Xanthomonas* species. Additionally, inoculations on peach plants demonstrated the pathogenicity of the three strains. The results obtained confirmed that these strains constitute a new species of the genus *Xanthomonas*, for which the name *Xanthomonas prunicola* has been proposed, and its main differential characteristics from the other species of this genus have been defined.

Overall, the studies collected in this thesis provide a rapid method for on-site diagnosis of the bacterial spot disease, a deeper knowledge of the genetic diversity of the Spanish strains of *X. arboricola* pv. *pruni* and the development of a new methodology for its evaluation, as well as the description of a new *Xanthomonas* species that affects nectarine.

# **Capítulo 1**

## **Introducción general**



## **1.1 El género *Xanthomonas***

El género *Xanthomonas* (Dominio *Bacteria*, Phylum *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Lysobacterales*, Familia *Lysobacteraceae*) (Dowson, 1939; Williams y Kelly, 2013; Tindall, 2014; Naushad *et al.*, 2015), comprende un extenso grupo de patógenos de plantas que pueden causar enfermedades en un gran número de especies vegetales, tanto cultivables como silvestres. Distintas especies de este género bacteriano se han encontrado en al menos 124 especies de monocotiledóneas y 268 de dicotiledóneas (Jacques *et al.*, 2016), incluyendo cultivos de gran interés económico a nivel mundial como el arroz, los cítricos, los frutales de hueso, el algodón, el tomate, las judías o la yuca (Van den Mooter y Swings, 1990). Por ejemplo, tres especies de este género, *X. axonopodis*, *X. campestris* y *X. oryzae* pv. *oryzae* están considerados entre los 10 patógenos de plantas más importantes, en términos económicos, a nivel mundial (Mansfield *et al.*, 2012).

En general, las especies del género *Xanthomonas* son capaces de colonizar prácticamente todos los tejidos de la planta, principalmente los órganos aéreos como el tallo, tronco, hojas, flores, yemas, frutos y semillas en los que causan una gran variedad de síntomas en sus respectivos huéspedes, incluyendo manchas necróticas, pústulas, chancros, podredumbres, marchitez, hipertrofia e hiperplasia que pueden derivar en la muerte de la planta (Rudolph, 1993; Ryan *et al.*, 2011; Jacques *et al.*, 2016). Además, algunas especies son capaces de penetrar en la planta a través de las raíces, como en el caso de *X. campestris* pv. *musacearum*, agente causal de la marchitez del plátano (Mwangi *et al.*, 2007), mientras que algunas colonizan e infectan los tejidos vasculares, como es el caso de *X. oryzae* pv. *oryzae*, que coloniza el xilema. Otras especies como *X. albilineans* pueden

encontrarse tanto en el tejido vascular como en el mesófilo de las hojas de la planta de la caña de azúcar (Mensi *et al.*, 2014).

### **1.1.1 Descripción general**

Las bacterias del género *Xanthomonas* son Gram-negativas, con forma de bacilos y con un tamaño de entre 0.4-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho por 1.0-2.9  $\mu\text{m}$  de largo, que suelen aparecer en solitario o por parejas, son móviles y tienen un único flagelo polar. Las colonias de este género se caracterizan por ser de color amarillo, tener el borde liso y una consistencia mucosa. El color amarillo se debe a la secreción de unos pigmentos llamados xanthomonadinas, que son característicos del género, mientras que la mucosidad viene determinada por la presencia del exopolisacárido xantano, que rodea las células (Swings *et al.*, 1993; Vauterin *et al.*, 1995).

De acuerdo a la descripción realizada por Vauterin *et al.* (1995), las bacterias de este género tienen actividad catalasa, pero no ureasa ni oxidasa. No son capaces de producir indol ni acetoina y no reducen nitratos a nitritos. Estas bacterias no pueden crecer con un pH menor de 4.5 y su rango de crecimiento se encuentra entre los 4 y los 37°C. Su crecimiento es inhibido a concentraciones de NaCl superiores al 6%, así como de glucosa al 30%, verde de metilo al 0.01%, tionina al 0.01%, acetato al 0.01% o cloruro de trifeniltetrazolio al 0.1%. Las cepas son normalmente sensibles a la eritromicina y a la tetraciclina. Contienen espermidina en cantidades detectables, mientras que no hay presencia de 2-hidroxipturescina, 1,3-diaminopropano y putrescina. Algunas cepas contienen cadaverina.



Son organismos quimioorganótrofos, y utilizan distintas fuentes de carbono y nitrógeno, entre las que no se encuentran adonitol, L-asparagina, meso-eritritol, glicina, meso-inositol, L-glutamina, L-ramnosa, D-sorbitol y sorbosa (Vauterin *et al.*, 1995). Según el sistema de microplaca BIOLOG GN, al menos el 94% de las cepas de *Xanthomonas* son capaces de oxidar los siguientes compuestos de carbono: ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, D-fructosa,  $\alpha$ -D-glucosa, D-manosa y metilpiruvato. Por el contrario, no son oxidados por más de 94% de las cepas el ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido D-glucosamínico, ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico, ácido itacónico, ácido L-piroglutámico, ácido sebásico, adonitol, 2-aminoetanol, D-arabitol, 2,3 butanodiol, DL-carnitina,  $\alpha$ -ciclodextrina, meso-eritritol, feniletilamina, meso-inositol, L-ornitina, putrescina, D-serina y xilitol (Vauterin *et al.*, 1995).

Las cepas de *Xanthomonas* contienen los siguientes ácidos grasos: 11:0 iso, 11:0 iso 3OH, 12:0 3OH, 13:0 iso 3OH, 15:0 iso, 16:1 cis-9, 16:0, 17:1 iso F y 17:0 iso. Entre ellos, el 11:0 iso, el 11:0 iso OH y el 13:0 iso 3OH son característicos del género y se usan como criterio de diferenciación de otros géneros bacterianos (Vauterin *et al.*, 1995).

Por último, el contenido en G+C de los miembros de este género se sitúa entre el 63.3 y el 69.7 mol%. La especie tipo es *Xanthomonas campestris* (Vauterin *et al.*, 1995).

### 1.1.2 Clasificación taxonómica

El género *Xanthomonas* ha sido objeto de numerosas revisiones taxonómicas y ha generado muchas discusiones acerca de su clasificación y la nomenclatura de sus

miembros durante el último medio siglo. Hasta el año 1974, prevalecía el concepto “nuevo huésped-nueva especie”, por el que cada miembro de este género se definía en función del huésped en el que se aislaba, o de los síntomas que producía, dando lugar a un género muy complejo formado por más de 100 especies (Burkholder y Starr, 1948; Vauterin *et al.*, 2000). Sin embargo, el hecho de que éstas fueran muy similares fenotípicamente hizo que Dye y Lelliot (1974), redujeran a solo cinco el número de especies (*X. albilineans*, *X. ampelina*, *X. axonopodis*, *X. campestris* y *X. fragariae*) agrupando a las más de 100 especies restantes dentro de *X. campestris*, por su gran parecido a ésta y por no poder diferenciarlas entre ellas. Años más tarde, Young *et al.* (1978) propusieron reclasificar todas estas especies pertenecientes a *X. campestris*, (que eran indistinguibles excepto por el huésped del que se habían aislado), como patovares de esta especie. Sin embargo, esta clasificación basada en la especificidad de huésped no cumplía los requisitos taxonómicos requeridos por el “Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias” (Lapage *et al.*, 1975). Además, estudios posteriores basados en test bioquímicos convencionales (Van den Mooter y Swings, 1990), perfiles de proteínas (Vauterin *et al.*, 1991), análisis de ácidos grasos (Yang *et al.*, 1993) y técnicas serológicas (Bragard y Verhoyen, 1993; Álvarez *et al.*, 1994) confirmaron que ese grupo de patovares era mucho más heterogéneo de lo que inicialmente se pensaba.

Aún así, debido al escaso poder de resolución de las técnicas previamente citadas, hubo que recurrir a técnicas moleculares para obtener una clasificación mucho más precisa del género *Xanthomonas*, la mayoría de ellas basadas en técnicas de amplificación de ADN, como “Amplified Fragment Length Polymorphism” (AFLP) (Janssen *et al.*, 1996; Restrepo *et al.*, 1999) o “repetitive sequence-based PCR” (rep-PCR) (Rademaker *et al.*, 1998; 2000). Más recientemente, el avance en las

técnicas de secuenciación ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas moleculares basadas en la secuenciación de regiones específicas del genoma bien conservadas, (“housekeeping genes”) como por ejemplo los genes *gyrB* (Parkinson *et al.*, 2009) o *rpoD* (Ferreira-Tonin *et al.*, 2012). Estas técnicas permiten la creación de una base de datos con las secuencias de estas regiones que facilitan la identificación de cepas de origen desconocido por comparación con las previamente clasificadas.

Por otro lado, hay que diferenciar entre técnicas usadas para identificar especies y técnicas utilizadas para definir nuevas especies. En ese sentido, la hibridación ADN-ADN es la herramienta que más se ha usado en estudios taxonómicos para determinar el grado de similitud entre especies. Según esta técnica, valores superiores al 70% de homología entre cepas son suficientes para considerar que pertenecen a la misma especie (Wayne *et al.*, 1987). A pesar de su eficiencia a la hora de clasificar especies bacterianas, los experimentos que conlleva esta técnica no son sencillos, requieren de mucho tiempo, especialmente cuando se analiza una gran cantidad de cepas, y no permiten la creación de bases de datos. Todos estos inconvenientes limitan su uso en laboratorio de forma rutinaria, y han propiciado la búsqueda de nuevas alternativas.

En los últimos años, el método más utilizado en estudios taxonómicos dentro del género *Xanthomonas*, y que ha sustituido a la hibridación ADN-ADN como técnica de referencia a la hora de definir nuevas especies, es el análisis de secuencias multilocus (MLSA). Esta técnica está basada en el análisis de las secuencias parciales de cuatro genes de mantenimiento celular asociados a la proteína chaperona *dnaK* (*dnaK*), al receptor tipo tonB (*fyuA*), a la subunidad beta de la girasa (*gyrB*) y al factor sigma de la ARN polimerasa (*rpoD*) (Young *et al.*, 2008). Este método ha mostrado una gran capacidad de discriminación entre especies,

similar a la obtenida con las hibridaciones ADN-ADN. Además es una técnica relativamente sencilla de realizar en el laboratorio y que ha permitido la descripción de nuevas especies de *Xanthomonas* (Young *et al.*, 2010).

Recientemente, debido a la disponibilidad de un mayor número de genomas completos de especies de este género, se están realizando análisis mucho más complejos que permiten una mayor precisión a la hora de definir las especies. Por ejemplo, hoy en día es posible obtener parámetros como el promedio de identidad nucleotídica (ANI, del inglés “Average Nucleotide Identity”) entre los genomas de dos cepas. Este parámetro es un indicador muy preciso del grado de similitud entre especies, ya que los valores de ANI por encima del 95-96% entre dos cepas serían equivalentes al 70% o más de homología obtenido con las hibridaciones ADN-ADN y por tanto se podría considerar que esas dos cepas pertenecen a la misma especie (Goris *et al.*, 2007; Richter y Rosselló-Mora, 2009).

La mayor reclasificación del género *Xanthomonas* la llevaron a cabo Vauterin *et al.* (1995), en base a los resultados obtenidos con las hibridaciones ADN-ADN realizados con 183 cepas representativas de distintos *Xanthomonas*. Estos resultados mostraron que el género estaba formado por 20 especies: *X. albilineans*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. codiaei*, *X. cucurbitae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens*, *X. vasicola* y *X. vesicatoria*. En esta clasificación es cuando se definió por primera vez la especie *X. arboricola*, incluyendo seis patovares (*celebensis*, *corylina*, *juglandis*, *poinsettiicola*, *populi* y *pruni*). Desde entonces, se ha producido la descripción de nueve nuevas especies de *Xanthomonas*, como *X. cynarae* (Trébaol *et al.*, 2000), *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* (Jones *et al.*, 2004, 2006), *X. alfalfae*, *X. citri*, *X. fuscans* (Schaad *et al.*, 2005; 2006; 2007), *X. dyei* (Young *et al.*, 2010) y *X. maliensis*

(Triplett *et al.*, 2015), lo que suma un total de 29 especies (Jacques *et al.*, 2016). A lo largo de esta tesis se ha llevado a cabo la descripción de una nueva especie de *Xanthomonas*, como veremos detalladamente en el capítulo 5 de esta memoria.

Además del elevado número de especies descritas, existe una clasificación sub-infraespecífica determinada por los patovares. Según “The Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria” el término patovar se refiere a una cepa o un grupo de cepas con características similares y diferentes a nivel sub-infraespecífico de otras cepas de la misma especie o subespecie, que presentan una patogenicidad distinta en una o más plantas huésped. Actualmente, en el género *Xanthomonas* hay descritos más de 140 patovares (Jacques *et al.*, 2016) repartidos entre todas las especies. Algunas de éstas no tienen ningún patovar, otras solo tienen dos patovares, como es el caso de *X. alfalfae*, *X. gardneri*, *X. melonis* o *X. sacchari*. Sin embargo hay especies como *X. axonopodis* que incluye 56 patovares (Jacques *et al.*, 2016). Hay otras especies que incluyen patovares que afectan a huéspedes de diferentes familias, como por ejemplo *X. campestris* que tiene patovares que afectan a brasicáceas, solanáceas y plantas de otras familias (Lu *et al.*, 2008). Y por el contrario, hay especies que tienen patovares que afectan al mismo huésped, diferenciándose en el tejido vegetal que colonizan, como es el caso del patógeno del arroz *X. oryzae*, en el que *X. oryzae* pv. *oryzae* penetra a través del tejido vascular, mientras que *X. oryzae* pv. *oryzicola* coloniza los espacios intercelulares del parénquima de las hojas (Niño-Liu *et al.*, 2006).

Este sistema de clasificación en forma de patovares ha recibido críticas por muchos taxónomos ya que no forma parte de la clasificación taxonómica de otros organismos. Además presenta una serie de inconvenientes, como el hecho de que en muchos casos, la gama de huéspedes potenciales de un grupo de cepas pertenecientes a un patovar no sea conocida (Vauterin *et al.*, 2000). Además,

existen cepas no patógenas de *Xanthomonas* que se han aislado tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas que no pueden clasificarse en ninguna de las categorías taxonómicas de este género, lo que conduce a una subestimación de la diversidad del género (Vauterin *et al.*, 2000; Fischer Le-Saux *et al.*, 2015; Jacques *et al.*, 2016).

## **1.2 *Xanthomonas arboricola***

### **1.2.1 Descripción general**

La especie *X. arboricola* incluye bacterias fitopatógenas responsables de graves enfermedades en frutales de hueso y frutos secos. Actualmente, los patógenos pertenecientes a esta especie están clasificados en 10 patovares. A los seis previamente descritos por Vauterin *et al.* (1995) (*celebensis*, *corylina*, *juglandis*, *poinsettiicola*, *populi* y *pruni*) hay que sumarles el patovar *fragariae*, descrito por Janse *et al.* (2001) y los últimos tres en entrar a formar parte de esta especie: *arracaciae*, *guizotiae* y *zantedeschiae* (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015). Además, en esta especie también se incluyen cepas que no están clasificadas en ningún patovar y que son patógenas de *Zizyphus jujuba* (Myung *et al.*, 2010a), *Capsicum annum* (Myung *et al.*, 2010b) y *Vitis vinifera* (Sawada *et al.*, 2011). Por último, existen cepas aisladas en diversos huéspedes (*Euphorbia pulcherrima*, *Magnolia* spp., *Allium cepa*, *Chrysanthemum morifolium* y *Syzygium aromaticum*) cuya patogenicidad es desconocida, y otras cepas no patógenas aisladas en *Juglans regia* y *Prunus domestica*, también se incluyen en esta especie (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015).

Se han identificado cepas no patógenas o de escasa virulencia en distintos huéspedes del género *Prunus*. En un primer momento fueron clasificadas como *X. arboricola* pv. *pruni*, pero posteriormente y gracias principalmente al análisis MLSA se comprobó que esas cepas se englobaban dentro de *X. arboricola*, pero no pertenecían al patovar *pruni*, por lo que se les denominó inicialmente *X. arboricola* pv. *pruni*-look-a-like. Se han secuenciado tres de esas cepas de escasa virulencia y sus genomas se han comparado con los genomas disponibles de cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* (Garita-Cambronero *et al.*, 2014; 2016a; 2016b). El estudio de genómica comparativa ha revelado factores que podrían estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad. De esta forma, se ha comprobado que las cepas no patógenas no contienen varios genes asociados a la virulencia, como son los relacionados con el sistema de secreción tipo III (T3SS), efectores tipo III (T3Es) y además no contienen el plásmido pXap41, también asociado a la virulencia de *X. arboricola* pv. *pruni*. Además, el análisis pangenómico realizado entre cepas de *X. arboricola* ha confirmado que las cepas no patógenas forman un grupo filogenético diferente al del patovar *pruni*, en el que se sitúan también otras cepas de baja virulencia o no patógenas aisladas de diferentes huéspedes (Garita-Cambronero *et al.*, 2017).

### **1.2.2 Diversidad genética de *X. arboricola***

Al igual que el género *Xanthomonas*, la especie *X. arboricola* engloba un grupo muy heterogéneo de cepas clasificadas en patovares que abarca una amplia gama de huéspedes. Además, en esta especie nos podemos encontrar desde cepas muy virulentas, hasta cepas que apenas tienen relevancia fitopatológica. Por tanto es interesante conocer la estructura genética de la especie así como las relaciones

filogenéticas entre sus miembros, y las técnicas con gran capacidad de resolución como el MLSA y el “Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis” (MLVA) han permitido ampliar el conocimiento de la especie.

El análisis MLSA reveló que los patovares responsables de las tres enfermedades más importantes económicamente (*corylina*, *juglandis* y *pruni*), que además son los más virulentos, son los que están más relacionados filogenéticamente, formando cada uno de ellos un complejo clonal. Por el contrario, las cepas menos agresivas pertenecientes a los patovares *celebensis*, *fragariae* y *populi* son los que más variabilidad presentan, repartiéndose en varios clusters poco relacionados entre ellos. Por tanto, parece que el potencial patogénico es inversamente proporcional a la diversidad genética en esta especie. El hecho de que los patovares *corylina*, *juglandis* y *pruni* estén tan relacionados filogenéticamente, junto con el hecho de que tienen un origen geográfico común (todos fueron descritos en Estados Unidos al principio del siglo XX), producen unos síntomas parecidos en sus respectivos huéspedes y tienen un repertorio de efectores tipo III semejante, sugiere que los tres podrían tener un origen común (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015).

En cuanto a los estudios realizados con MLVA, Cesbron *et al.* (2014) obtuvieron 26 números variables de secuencias en tándem (VNTRs) polimórficos en todos los patovares de la especie y la estructura poblacional obtenida concuerda con los resultados del MLSA. En otro estudio realizado con esta técnica pero con cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis*, se observó que las cepas virulentas y no virulentas se agrupaban en distintos *clusters*, confirmando que pertenecen a linajes claramente separados (Essakhi *et al.*, 2015).



### 1.2.3 Principales enfermedades asociadas a *X. arboricola*

Las enfermedades más importantes a nivel económico, producidas por patógenos de esta especie son las causadas por los patovares *corylina*, *juglandis* y *pruni*, que son responsables de graves bacteriosis en frutales de hueso y frutos secos en todo el mundo (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015).

*X. arboricola* pv. *corylina* es el agente causal de la mancha y la necrosis bacteriana del avellano (*Corylus avellana*), que está considerada como la enfermedad más importante de este cultivo (EPPO, 2004) y clasificada como organismo de cuarentena por la EPPO (EPPO A2 list). Está distribuida por todo el mundo, incluyendo los principales países productores de avellana que son España, Estados Unidos, Italia y Turquía. La bacteria afecta a los principales órganos de la planta, dado que en las hojas se observan manchas necróticas poligonales principalmente en la zona apical y en los frutos se producen manchas necróticas superficiales que no afectan gravemente a la avellana. Pero los daños más importantes se producen en los brotes y ramas en los que es frecuente observar chancros que pueden producir el decaimiento y muerte de estos órganos (EPPO, 2004; Lamichhane y Varvaro, 2014). Las pérdidas más importantes se producen en vivero y en plantaciones de árboles de entre 1-4 años, en los que se alcanza una mortalidad de hasta el 10% (Lamichhane y Varvaro, 2014).

Por otro lado, *X. arboricola* pv. *juglandis* es el agente causal de la mancha bacteriana, la necrosis apical y el chancro del nogal (*Juglans regia*), que es la enfermedad más importante del cultivo del nogal y que está ampliamente distribuida por todo el mundo. Esta bacteria presenta dos linajes claramente diferenciados, uno de ellos asociados a la necrosis apical y el otro relacionado con el chancro del nogal (Hajri *et al.*, 2010; Fischer-Le Saux *et al.*, 2015). Los

principales síntomas de la enfermedad son manchas y chancros necróticos en las hojas y ramas, respectivamente, que pueden ocasionar pérdidas de hasta el 70% de la cosecha (Lamichhane, 2014).

Finalmente, respecto a *X. arboricola* pv. *pruni*, de este patovar se tratará en mayor profundidad en el punto 1.3 y a lo largo de esta memoria.

En cuanto al resto de patovares, el impacto económico que producen es mucho menor que el ocasionado por los tres patovares anteriores. De *X. arboricola* pv. *celebensis* apenas hay información publicada y su incidencia sobre el cultivo de banana es muy baja, en comparación con *X. campestris* pv. *musacearum* (Bradbury, 1986). A su vez, los daños producidos por las cepas de *X. arboricola* pv. *fragariae* son muy poco importantes comparados con los producidos por *X. fragariae* (Vandroemme *et al.*, 2013), mientras que *X. arboricola* pv. *populi* es el agente causal de la necrosis del chopo, que no está considerada como una enfermedad grave en esta especie, y está calificado más bien como un patógeno oportunista (Haworth y Spiers, 1992). Respecto a los últimos tres patovares incluidos en la especie (*arracaciae*, *guizotiae* y *zantedeschiae*), apenas hay información y también hay muy pocas cepas disponibles de cada uno de ellos (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015).

### **1.3 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni***

La mancha bacteriana de los frutales de hueso, del almendro y otras especies del género *Prunus* es una de las enfermedades más graves que afectan a este grupo de plantas. Está causada por la bacteria *X. arboricola* pv. *pruni* (Vauterin *et al.*, 1995) (sinónimo, *X. campestris* pv. *pruni*; *X. pruni*), patógeno que está considerado

como organismo de cuarentena según la legislación fitosanitaria de la Unión Europea (Directiva Europea 2009/29/CE) y aparece en la lista A2 de la EPPO como uno de los organismos para los cuales se recomienda especial regulación. La enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1903 en Michigan (Estados Unidos) en ciruelo japonés (Smith, 1903) y actualmente está presente en las principales regiones productoras de frutales de hueso del mundo. En los últimos años se han producido muchos brotes, especialmente en Europa, por lo que se considera una enfermedad emergente en este continente.

### **1.3.1 Descripción de *X. arboricola* pv. *pruni***

Las células de *X. arboricola* pv. *pruni* tienen forma de bacilo con un tamaño de 0.2-0.8 µm de ancho y 0.8-1.7 µm de largo, son Gram negativas, aerobias estrictas, no esporulan y son móviles por un solo flagelo polar (Bradbury, 1984). Además presentan el resto de características propias de su género, que ya hemos visto en el apartado 1.1.1.

Esta bacteria fue clasificada como *X. campestris* pv. *pruni* (Young *et al.*, 1978), nombre que aún se mantiene en la legislación europea, en base a sus propiedades fenotípicas y patogénicas. Posteriormente, y tras la reclasificación del género llevada a cabo por Vauterin *et al.* (1995), las cepas de *X. campestris* pv. *pruni* se asignaron a la nueva especie *Xanthomonas arboricola*.

Las cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa, metabolismo oxidativo de la glucosa (Hugh-Leifson) lento, no reducen los nitratos a nitritos, dan resultado negativo para la hidrólisis de la arginina, la ureasa y el indol, no crecen en NaCl al 5% ni en Nutrient Broth a 37°C. Por el

contrario, dan resultado positivo para la digestión de la caseína, para el citrato de Simmons, para la hidrólisis de la esculina, de la gelatina y del Tween 80 y pueden crecer en NaCl al 2% y en Nutrient Broth a 35°C (Roselló, 2007).

Según los test API 20 NE (bioMérieux, Francia), empleados siguiendo las instrucciones del fabricante excepto un cambio en la temperatura y tiempo de incubación (25°C durante 48 horas), las cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* proporcionan una reacción positiva para la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la hidrólisis de la esculina y de la gelatina, y para la utilización en anaerobiosis del citrato, glucosa, malato, manosa y N-acetilglucosamina. Con las tiras API 50 CH (bioMérieux, Francia), usando el medio C de Dye (Dye, 1968) con azul de bromotimol al 0.08‰ y tras un periodo de incubación a 25°C durante 72 horas, se observa reacción positiva para la hidrólisis de la esculina y de la N-acetilglucosamina en el 100% de las cepas analizadas, y una reacción variable (reacción positiva en más del 85% de las cepas analizadas) en la acidificación de la celobiosa, D-fructosa, D-fucosa, L-fucosa, galactosa, D-glucosa, D-manosa, sacarosa y trehalosa, y en la alcalinización del 2-ceto-gluconato (Roselló, 2007).

Según el sistema BIOLOG GN, las cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* se diferencian del resto de especies de *Xanthomonas* por su capacidad para metabolizar las siguientes fuentes de carbono: ácido acético, ácido bromosuccínico, ácido-glicil-L-glutámico, ácido L-glutámico, DL-ácido láctico, ácido succinámico, ácido succínico, celobiosa, dextrina, L-fucosa, D-galactosa, gentiobiosa, glicerol, glicógeno, maltosa, monometilsuccinato, N-acetil-D-glucosamina, D-psicosa, D-trealosa y Tween 80. Además, por la incapacidad de metabolizar los siguientes compuestos de carbono: N-acetil-D-galactosamina, ácido  $\alpha$ -cetovalérico, ácido fórmico, ácido D-galacturónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucorónico, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido quínico, ácido D-sacárico, L-arabinosa, L-fenilalanina,

glucosa 6 fosfato,  $\beta$ -metil-D-glucósido, glucuronamida, lactona del ácido D-galactónico, D-manitol, D-rafinosa, L-ramnosa y timidina (Vauterin *et al.*, 1995).

### **1.3.2 Distribución geográfica de *X. arboricola* pv. *pruni***

*X. arboricola* pv. *pruni* está distribuida a nivel mundial en las principales regiones productoras de frutales del género *Prunus* (Figura 1). Se ha citado la presencia de este patógeno en países de los cinco continentes: África (Sudáfrica y Zimbaue), América (Argentina, Bermudas, Brasil, Canadá, Estados Unidos, México y Uruguay), Asia (Arabia Saudí, China, Corea del Norte, Corea del Sur, India, Irán, Japón, Líbano, Pakistán, Taiwán y Tayikistán), Europa (Alemania, Bélgica, Eslovenia, España, Francia, Holanda, Italia, Moldavia, Montenegro, Rumania, Rusia, Suiza y Ucrania) y Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) (Young, 1977; Jindal *et al.*, 1989; Akthar *et al.*, 1995; Panič *et al.*, 1998; EPPO 2006, 2009, 2017; Roselló, 2007; Roselló *et al.*, 2007, 2012; Palacio-Bielsa *et al.*, 2010a,b; Pothier *et al.*, 2010; Marchi *et al.*, 2011).

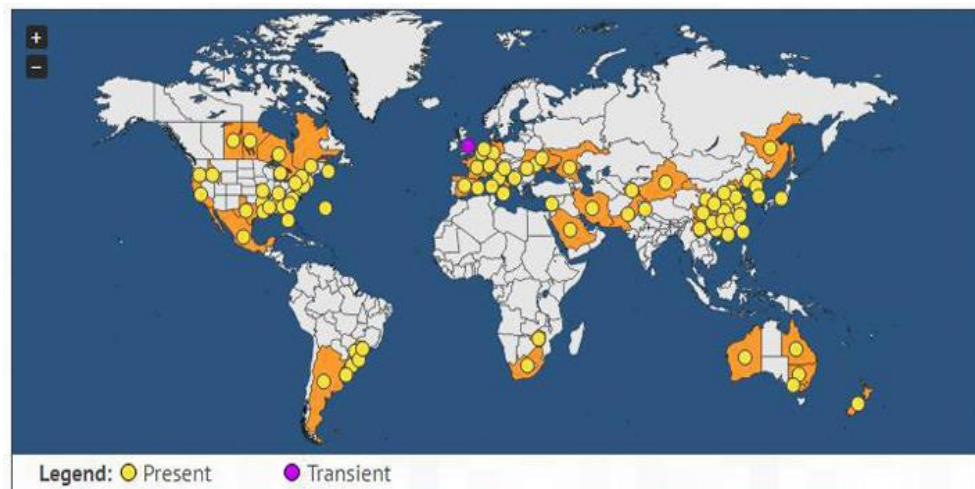


Figura 1. Mapa de distribución mundial de *X. arboricola* pv. *pruni* (EPPO, 2017).

La distribución de la mancha bacteriana no es homogénea, estando ampliamente extendida en algunos países, mientras que en otros solo se han registrado brotes locales y esporádicos, de los que no se ha vuelto a tener noticia. En Europa, los brotes más severos se han producido en países de la cuenca mediterránea, como el sudeste de Francia y en el valle del río Po, en Italia (EFSA, 2014).

### 1.3.2.1 Distribución de *X. arboricola* pv. *pruni* en España

En España, *X. arboricola* pv. *pruni* fue detectada por primera vez en la provincia de Badajoz en 2002, en ciruelo japonés. Aunque se tomaron las medidas de erradicación pertinentes de acuerdo con la legislación europea, se detectaron nuevos brotes en los años 2003 y 2007. Además, desde entonces se han producido nuevos brotes de la enfermedad en otras 10 provincias españolas:

Valencia, Alicante, Zaragoza, Huesca, Lérida, Teruel, Navarra, Mallorca, Tarragona y Huelva, por lo que se considera una enfermedad emergente. Estas detecciones se han producido tanto en plantaciones de campo como en viveros comerciales, afectando a distintos huéspedes, incluyendo melocotonero, nectarino, ciruelo, albaricoquero, almendro y varios patrones de frutales de hueso (Roselló *et al.*, 2012; Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). Es destacable que la detección en almendro es la primera cita en este huésped en Europa (Palacio-Bielsa *et al.*, 2010b). Del mismo modo que ocurrió con la primera detección en Badajoz, en el resto de provincias se aplicaron las medidas de erradicación oportunas, por lo que a esta enfermedad aún se le considera como no establecida en España.

De todas formas, hay un riesgo elevado de nuevas introducciones de la bacteria, principalmente a través de los viveros, debido a la importación y/o multiplicación de material vegetal contaminado. En varios viveros españoles se han producido detecciones de *X. arboricola* pv. *pruni* en plantones de nectarino, ciruelo japonés y patrones de frutales como Barrier (*P. davidiana* x *P. persica*), Garnem (*P. dulcis* x *P. persica*), Cadaman (*P. persica* x *P. davidiana*) y Santa Lucía SL-64 (*P. mahaleb*) (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). Muchas de las detecciones se hicieron en plantas asintomáticas con infecciones latentes, algunas procedentes de otros países como Italia, donde la enfermedad es endémica (Battilani *et al.*, 1999). Además de las nuevas introducciones, existe también un grave riesgo de diseminación de la bacteria a nivel local como consecuencia del intercambio de material vegetal contaminado entre viveros españoles, como veremos más detalladamente en el capítulo 4 de esta tesis.

### **1.3.3 Impacto económico causado por *X. arboricola* pv. *pruni***

La mancha bacteriana de los frutales del género *Prunus* está considerada como la bacteriosis más importante en este grupo de especies debido al importante impacto económico que genera. Los síntomas asociados a este patógeno, como la defoliación o la formación de chancros en el tronco se traducen en pérdida de productividad y disminución de la calidad de los frutos, pudiendo incluso provocar la muerte del árbol. Además, las manchas y lesiones que se producen en la superficie de los frutos dificultan su comercialización (Stefani, 2010; EFSA, 2014).

No existe mucha información disponible acerca de las pérdidas asociadas a la enfermedad. En Estados Unidos se estimó en 1932 que las pérdidas ocasionadas por la mancha bacteriana en una plantación de ciruelo japonés se situaba entre el 25 y el 75% de la fruta producida (Dunegan, 1932). En Italia se realizó una estimación de las pérdidas que se generarían por un brote de la enfermedad que afectara a ciruelo japonés en la región de Emilia Romagna, determinándose que éstas serían de 11.200 euros por ha en el caso de la variedad “Golden Plum” o de 9.500 euros por ha en el de la variedad “Angelino” (Stefani, 2010). En Uruguay, las pérdidas en variedades susceptibles de melocotonero pueden llegar a superar el 50% en años con condiciones ambientales favorables para la enfermedad. Además, si tenemos en cuenta las pérdidas generadas por la depreciación comercial de frutos sintomáticos, éstas pueden ser superiores al 80% en variedades susceptibles de nectarina, como “Big Top” (Soria y Pisano, 2014). En España, solo se dispone de datos de pérdidas en almendro en Aragón, las cuales oscilaron entre el 23 y el 47% en 2013, dependiendo de las condiciones ambientales y de la sensibilidad varietal (Palacio-Bielsa *et al.*, 2015a).



### 1.3.4 Gama de huéspedes de *X. arboricola* pv. *pruni*

Los huéspedes naturales de este patógeno son las especies de frutales, ornamentales y de plantas silvestres del género *Prunus*. En cuanto a las especies cultivadas, los mayores daños se producen principalmente en albaricoquero (*P. armeniaca*), almendro (*P. amygdalus*, syn. *P. dulcis*), ciruelo japonés (*P. salicina*), melocotonero (*P. persica*) y los correspondientes híbridos derivados de estas especies. Otras especies afectadas de menor importancia son el cerezo (*P. avium*), el ciruelo europeo (*P. domestica*) y el guindo (*P. cerasus*). Además, esta bacteria también se ha descrito en especies ornamentales y silvestres, como el albaricoquero japonés (*P. mume*) el ciruelo mirabolano (*P. cerasifera*), el lauroceraso o laurel cerezo (*P. laurocerasus*), y cuatro especies de *Prunus* silvestres como *P. davidiana*, *P. buergeriana*, *P. crassipes* y *P. donarium* (EPPO, 2006; EFSA, 2014).

#### 1.3.4.1 Importancia económica de los frutales de hueso y el almendro

Hoy en día, los frutales del género *Prunus* ocupan un área de alrededor de 35 millones de hectáreas, con una producción mundial estimada de 43 millones de toneladas, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (FAO, 2013). Aunque la gran mayoría de especies de este género se encuentran en las regiones templadas del hemisferio norte, en Europa la producción se centra principalmente en la región mediterránea.

En España, el área ocupada por los frutales de hueso y el almendro es de 765.119 ha (231.062 y 534.057 ha, respectivamente), con una producción de  $1,8 \cdot 10^6$  t, situándose entre los mayores productores del mundo después de China ( $18 \cdot 10^6$  t),

Estados Unidos ( $3,3 \cdot 10^6$  t), Turquía ( $2,5 \cdot 10^6$  t) e Italia ( $2 \cdot 10^6$  t). La producción está principalmente localizada en las regiones mediterráneas (Cataluña, Comunidad Valenciana y Murcia) junto con Aragón y Extremadura, que es un importante productor de ciruela y cereza.

Dentro de los frutales de hueso, el melocotonero es el más importante, seguido por el nectarino (*P. persica* var. *nectarina*) y, ya a distancia, por el ciruelo japonés, el albaricoquero y el cerezo. A continuación, se presentan datos oficiales del área y la producción de estos frutales en España a fecha de 2013, según la información del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente (MAGRAMA) (MAGRAMA, 2015a) y la FAO (FAO, 2013).

El melocotonero es la tercera especie frutal más cultivada a nivel mundial, y el principal frutal de hueso en España (Martínez-Calvo *et al.*, 2011). Su cultivo ocupa un área de 51.511 ha, mientras que las variedades de nectarino ocupan 32.867 ha, con una producción de 820.139 y 509.713 t, respectivamente, lo que convierten a España en el tercer productor mundial. Aragón, Cataluña y Murcia son las comunidades autónomas con la mayor producción, con alrededor del 73% de la producción nacional.

Respecto al ciruelo, el europeo junto con el japonés, ocupan una superficie de 16.614 ha con una producción de 172.352 t, lo que sitúa a España en el puesto duodécimo en la lista de productores mundiales. Las regiones con mayor producción son Extremadura con 73.843 t, seguidas a distancia por Andalucía con 36.051 t y Murcia con 25.216 t. En estas regiones, se ha incrementado la superficie cultivada del ciruelo japonés respecto del europeo, que está más extendido por regiones más frías.

En cuanto al albaricoquero, ocupa un área de 20.334 ha, siendo España el noveno productor mundial con 131.800 t. La gran mayoría de la producción se encuentra en Murcia con 79.240 t, seguida de lejos por Aragón con 15.844 t y la Comunidad Valenciana con 14.342 t.

El cerezo y el guindo alcanzan un área de 25.358 ha y su producción, que se ha duplicado en los últimos 20 años, es de alrededor de 100.000 t, siendo el sexto productor mundial. Extremadura con 36.019 t y Aragón con 25.375 t son los principales productores tanto de cereza como de guinda.

Finalmente, el almendro ocupa un área cultivada de 534.000 ha, con una producción que supera las 149.000 t. España ha sido históricamente el segundo productor mundial de almendra, solo por detrás de Estados Unidos, pero recientemente Australia ha relegado a España a la tercera posición. En España, la producción se concentra en la Comunidad Valenciana con 28.177 t, Murcia con 25.519 t, Andalucía con 25.208 t y Aragón con 23.525 t, que suman el 71,5% de la producción doméstica.

#### **1.3.4.2 Sensibilidad varietal**

Existe mucha información disponible acerca de la sensibilidad varietal a *X. arboricola* pv. *pruni*, especialmente en el caso del albaricoquero, el ciruelo y el melocotonero (Ritchie, 1999; Garcin *et al.*, 2008). Es necesario señalar que el criterio empleado por las diferentes fuentes bibliográficas para esta clasificación varietal no siempre es homogéneo, ya que se usan generalmente datos de sensibilidad observada en campo y no de inoculaciones estandarizadas, que permitirían evaluar la sensibilidad intrínseca del material vegetal. En el caso del

albaricoquero, se consideran variedades muy susceptibles “Goldbar”, “Lady Cot”, “Lilly Cot”, “Royal Rousillon”, “Solimar”, “Tardif de Tain” y “Tom Cot”, mientras que se consideran variedades poco sensibles “Canino”, “Flavorcot”, “Primaya”, “Robada” y “Vertige” (Ritchie, 1999; López, 2000; Garcin y Herreman, 2014). Respecto al ciruelo, algunas de las variedades que se consideran muy sensibles son “Frontier”, “Methley”, “Santa Rosa” y “Tc Sun”, mientras que otras variedades como “Bellerosa”, “Explorer”, “Fortune”, “President” o “Robusta” se consideran de menor sensibilidad (Ritchie, 1999; Garcin *et al.*, 2008). Por último, en melocotonero variedades como “Big Sun”, “Big Top”, “Crispdelice Sun”, “Honey Blaze”, “Garcica”, “Garofa” o “Monicop” se consideran muy sensibles y otras como “Honey Bright”, “Nectaperle”, “Newhaven”, “Sentinel”, “September Bright”, “White Red” o “Zephyr”, están consideradas como poco sensibles a la enfermedad (Ritchie, 1999; Garcin y Herreman, 2014).

A diferencia del albaricoquero, el ciruelo y el melocotonero, no hay apenas información disponible acerca de la sensibilidad varietal en el almendro. Sólo algunas fuentes citan datos sobre variedades cultivadas principalmente en Australia y Estados Unidos, destacando a “Fritz”, “Mission”, “Monterey” y “Ne Plus Ultra” como muy susceptibles, mientras que “Nonpareil” y “Price” son consideradas como sensibles (Edstrom, 2007; Holtz *et al.*, 2013). En España, solo se dispone de datos preliminares de observaciones realizadas en Aragón y la Comunidad Valenciana que sugieren que las variedades “Antoñeta”, “Guara”, “Marta”, “Masbovera” y “Vayro” pueden ser muy sensibles a la enfermedad (Palacio-Bielsa *et al.*, 2010a).

### 1.3.5 Sintomatología asociada a la mancha bacteriana

Los síntomas de esta enfermedad afectan prácticamente a todos los órganos de la planta, principalmente a las hojas, frutos, yemas, ramas y tronco, pero sin embargo, nunca se han observado síntomas en flores. De manera general, los síntomas son muy similares en todas las especies de *Prunus*, aunque puede observarse cierta variación en función de la especie, especialmente en el almendro, la sensibilidad varietal o las condiciones climáticas. Los síntomas causados por este patógeno son en muchos casos similares a los producidos por otras bacterias como *Pseudomonas syringae* pv. *mors-prunorum*, *P. syringae* pv. *persicae*, *P. syringae* pv. *syringae* o *P. viridiflava*, hongos como *Wilsonomyces carpophilus* o *Venturia carpophila*, e incluso factores abióticos, por lo que es necesaria la correcta identificación del patógeno para un diagnóstico preciso y fiable (López *et al.*, 2012; Palacio-Bielsa *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2012).

En las hojas, los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en forma de pequeñas manchas de color verde pálido, que evolucionan a necrosis. Las manchas tienen forma poligonal, suelen estar rodeadas por un halo amarillento y están delimitadas por las nervaduras de las hojas (Figura 2).

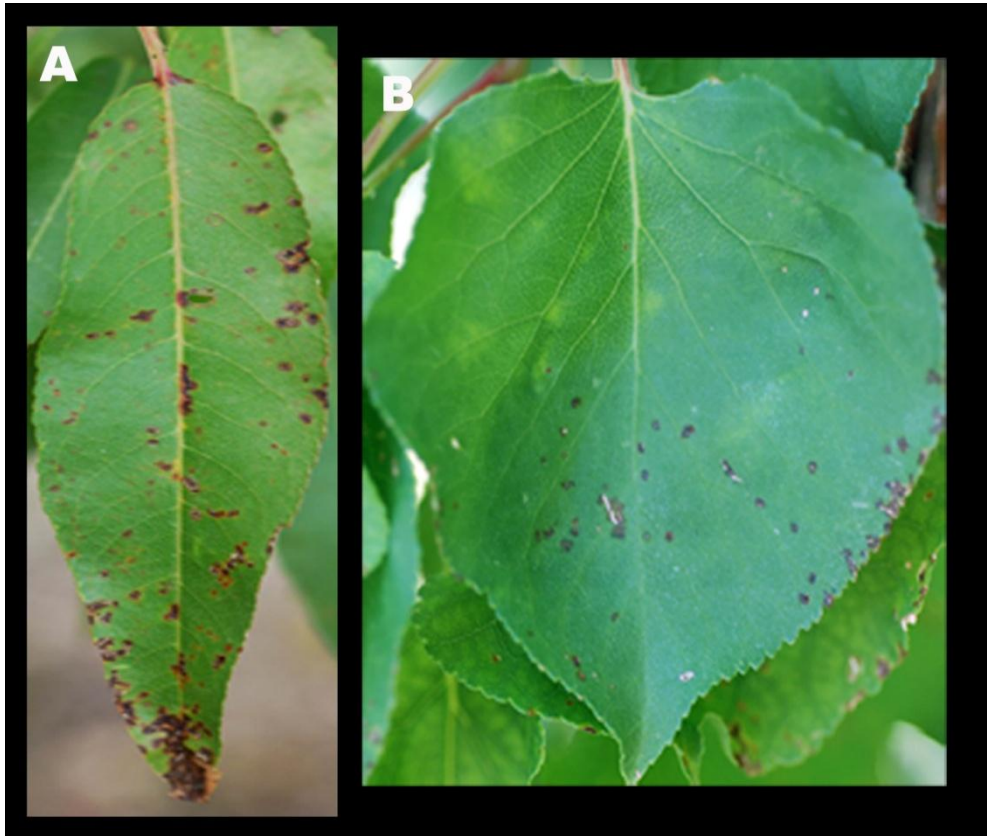


Figura 2. Síntomas causados por *X. arboricola* pv. *pruni* en hojas de almendro (A) y albaricoquero (B). (Fotos de Miguel A. Cambra).

Normalmente, las manchas suelen aparecer a lo largo del nervio central y en el extremo apical del limbo foliar (punto de goteo), que son las zonas donde las hojas suelen acumular más agua. Además, son visibles tanto por el haz como por el envés (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). En melocotonero y nectarino es frecuente observar en la parte apical del limbo un gradiente de color marrón-amarillo-verde muy característico (hojas tricolores) (Figura 3A). En caso de infecciones severas puede producirse una importante defoliación. En almendro, por el contrario, es

raro observar amarilleamiento y defoliación (Palacio-Bielsa *et al.*, 2010a). En el caso del ciruelo, es particularmente frecuente en ciertas variedades el cribado, producido por la caída de los tejidos foliares necrosados lo que da a las hojas un aspecto de “perdigonado” (Figura 3B) (Roselló *et al.*, 2012).

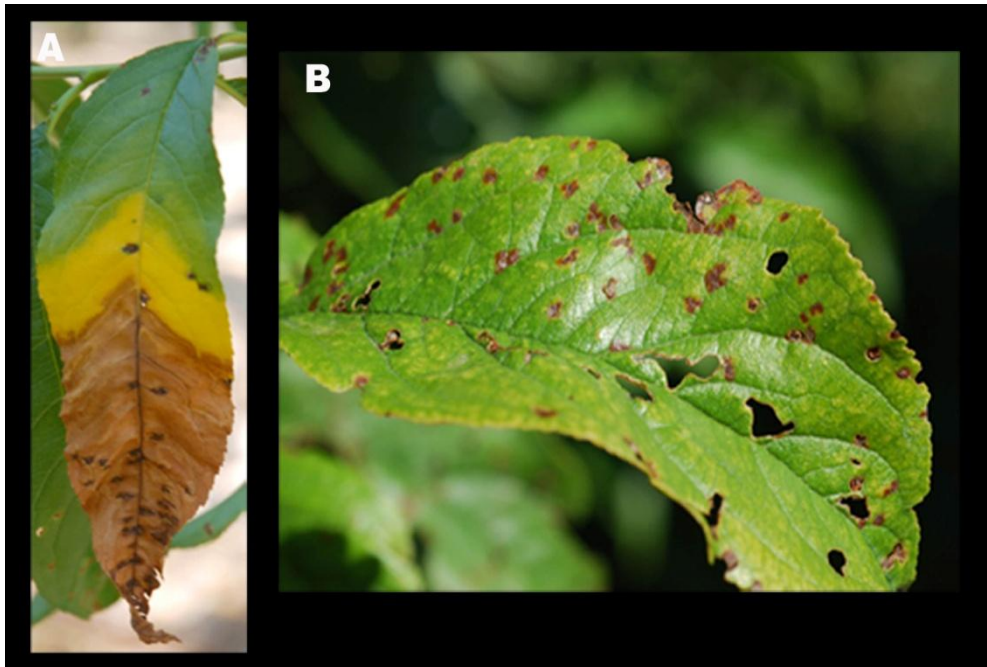


Figura 3. Hoja tricolor característica de melocotonero (A) y hoja de ciruelo con cribado (B) (Fotos de Miguel A. Cambra).

En frutos, los primeros síntomas pueden aparecer entre tres y cinco semanas después de la caída de pétalos. En albaricoquero, ciruelo y melocotonero los síntomas más comunes son pequeñas manchas de color pardo rodeadas por un halo clorótico que aparecen en la superficie de los frutos. A medida que éstos van creciendo, las manchas se necrosan y pueden agruparse tomando una forma irregular (Figura 4). Además, es frecuente la aparición de exudados de goma.

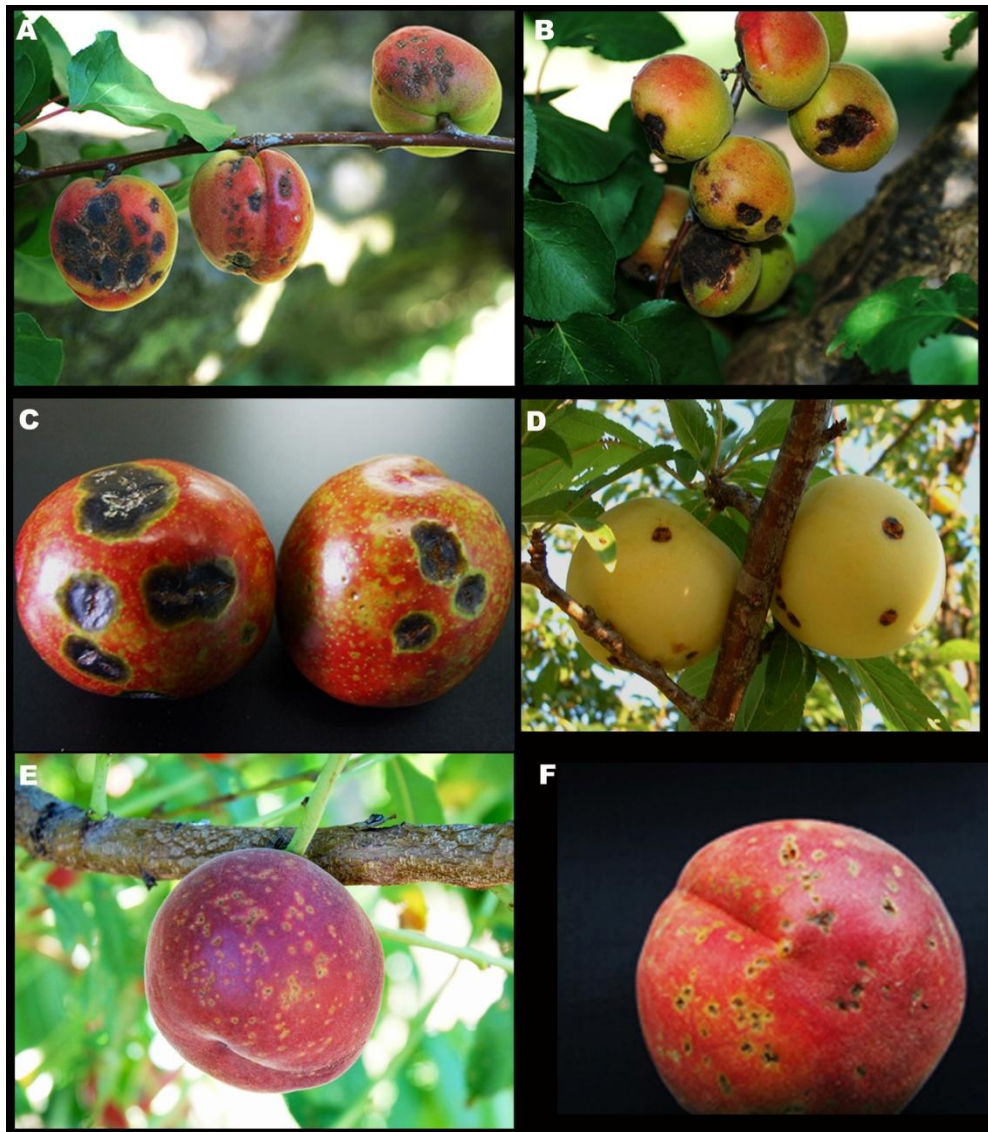


Figura 4. Síntomas causados por *X. arboricola* pv. *pruni* en frutos de albaricoquero (A y B), ciruelo japonés (C y D) y melocotonero (E y F) (Fotos de Miguel A. Cambra).

Los síntomas en frutos de almendro son muy característicos. Durante la primavera, se producen lesiones oscuras y hundidas en el mesocarpio,



acompañadas de exudados de goma (Figuras 5A y 5B). En verano, cuando el mesocarpio se deshidrata, esas lesiones sobresalen de la superficie del fruto y quedan adheridas al endocarpio, impidiendo su pelado natural, pudiendo incluso afectar a la semilla (Figura 5C). Gran parte de los frutos caen de forma prematura y otros permanecen en el árbol hasta después de la recolección en forma de fruto momificado (Figura 5D), albergando gran cantidad de bacterias y convirtiéndose en potenciales fuentes de inóculo (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2012).



Figura 5. Síntomas causados por *X. arboricola* pv. *pruni* en frutos de almendro. Lesiones necróticas en el mesocarpio con exudado de goma (A y B). Semilla de almendra afectada (C) y fruto momificado que permanece en el árbol (D). Fotos de Miguel A. Cambra (B y C) y Pablo López (A y D).

Los síntomas en ramas y troncos aparecen en forma de chancros. En Europa son poco frecuentes en almendro y melocotonero, apareciendo en ramas jóvenes en forma de chancros pequeños, oscuros y alargados que pueden llegar a rodear el brote y acabar secándolo. Sin embargo, los chancros son muy importantes en ciruelo japonés ya que pueden afectar a las ramas principales y al tronco (Figura 6) (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014; Roselló *et al.*, 2012).



Figura 6. Chancros causados por *X. arboricola* pv. *pruni* ciruelo japonés, que pueden afectar tanto a brotes (A y B) como a ramas principales (C y D) (Fotos de Miguel A. Cambra).

### **1.3.6 Diagnóstico, detección e identificación de *X. arboricola* pv. *pruni***

El diagnóstico y la detección son aspectos fundamentales para la prevención y el mantenimiento del estatus sanitario de las plantas. El término “diagnosis” hace referencia a la identificación de la causa de una enfermedad en plantas sintomáticas, mientras que el término “detección” se refiere a la localización de la presencia de un determinado patógeno. Por último, la “identificación” consiste en dar un nombre taxonómicamente correcto al organismo detectado en función de sus características (López *et al.*, 2006).

Como se ha indicado anteriormente, *X. arboricola* pv. *pruni* está considerado como un organismo de cuarentena por la UE y la EPPO. Es por tanto necesario el uso de métodos de diagnóstico y detección rápidos, sensibles y eficientes que permitan localizar este patógeno tanto en material vegetal sintomático como asintomático. Ello es debido a que hay que tener en cuenta que, además de su fase epífita, *X. arboricola* pv. *pruni* es capaz de sobrevivir en las plantas en estado latente, lo que facilita su diseminación a través de material vegetal asintomático.

Actualmente, el único protocolo oficial publicado para el diagnóstico de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro, es el EPPO Standard PM 7/64 (EPPO, 2006), que incluye el aislamiento en medio de cultivo, la inmunofluorescencia (IF), y la identificación mediante test bioquímicos, perfil de proteínas (SDS-PAGE) y de ácidos grasos (FAME), amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR) y ensayos de patogenicidad, pero que no incluye métodos moleculares como la detección por PCR, que son más sensibles y específicos.

Recientemente se ha publicado una evaluación realizada en Italia de distintas técnicas empleadas para la detección de esta bacteria, que incluye una PCR convencional para la detección e identificación de *X. arboricola* pv. *pruni* in material vegetal asintomático (Loreti *et al.*, 2015), pero todavía no ha sido incluido en el protocolo oficial de la EPPO.

Aunque en los últimos años ha aumentado exponencialmente el número de protocolos publicados basados en técnicas moleculares, todavía no han conseguido sustituir completamente a los métodos tradicionales, por lo que es recomendable la combinación de métodos convencionales, serológicos y moleculares para una eficaz detección e identificación de bacterias fitopatógenas en general (Álvarez, 2004) y de *X. arboricola* pv. *pruni* en particular.

#### **1.3.6.1 Aislamiento en medio de cultivo**

El aislamiento en medio de cultivo es imprescindible para poder realizar la caracterización fenotípica de una bacteria. Es relativamente fácil el aislamiento de *X. arboricola* pv. *pruni* a partir de lesiones recientes, sin embargo es más complicado a partir de lesiones más antiguas, frutos maduros o yemas. Existen dos medios generales que son los más usados y que están incluidos en el protocolo de la EPPO (EPPO, 2006), como son el LPGA y el YDC. En LPGA (Ridé, 1969; Lelliot y Stead, 1987), tras un periodo de incubación de 3-4 días a 25°C, se obtienen colonias de unos 3 mm de diámetro, circulares, cóncavas, lisas, mucosas y de color amarillo pálido que se va volviendo más intenso con el paso de los días (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012) (Figura 7A). En YDC (Stolp y Starr, 1964), tras la incubación a 27°C durante 2-3 días, se obtienen colonias circulares, mucosas y de forma cóncava de color amarillo pálido (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012) (Figura 7B). En

el caso de muestras procedentes de material vegetal es aconsejable la adición de cicloheximida ( $250 \text{ mg l}^{-1}$ ) para prevenir el crecimiento de hongos que dificulten el crecimiento de las colonias (López *et al.*, 2010).

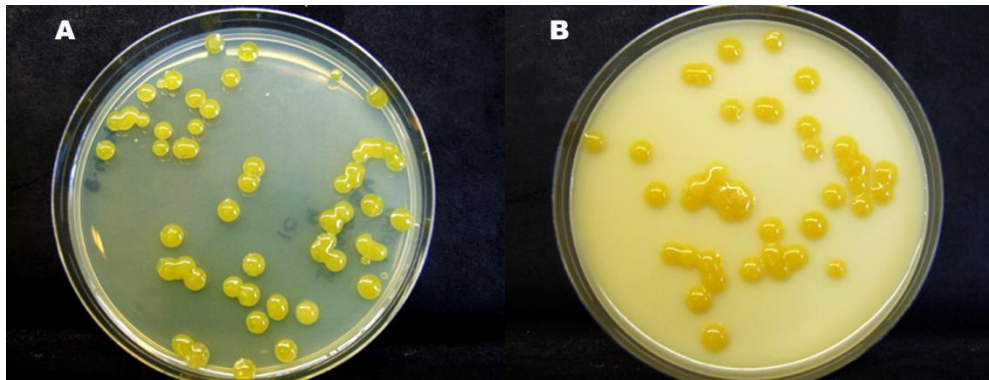


Figura7. Colonias de *X. arboricola* pv. *pruni* en LPGA (A) y en YDC (B) (Fotos de Javier Peñalver).

Otros medios generales recomendados son el Wilbrink agar (Koike, 1964) y el SP (Hayward, 1960), que ha sido utilizado por Zaccardelli *et al.* (1995) para el aislamiento de yemas y heridas foliares procedentes de ramas asintomáticas, y que también ha sido validado según la EPPO (EPPO, 2006) para su uso con muestras de ciruelo y melocotonero, pero no de albaricoquero, almendro o cerezo (López *et al.*, 2010).

También existen medios semiselectivos para el aislamiento de *X. arboricola* pv. *pruni*, como el medio mXCP1 que se ha usado para el aislamiento de este patógeno a partir de hojas sintomáticas de *P. laurocerasus* en Holanda (Bergsma-Vlami *et al.*, 2012). Tras un periodo de incubación de 3-5 días a  $28^{\circ}\text{C}$  se observan

colonias de color amarillo, de aspecto mucoso y rodeadas de un halo translúcido a consecuencia de la degradación del Tween 80 (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012). Otro medio semiselectivo es el XPSM (Civerolo *et al.*, 1982), que está recomendado por Schaad *et al.* (2001) y también lo han usado con éxito Shepard y Zehr (1994) y Ballard *et al.* (2011) para el aislamiento de poblaciones epífitas de *X. arboricola* pv. *pruni* procedentes de material asintomático. Sin embargo, Civerolo *et al.* (1982) sugirieron que este medio podría no ser apropiado para todas las cepas de este patógeno. Tras incubación durante 6-7 días a 27°C se observan colonias de color blanco grisáceo, brillantes, opacas y de forma convexa (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012).

### 1.3.6.2 Test bioquímicos convencionales

Para la correcta identificación de cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* es necesario realizar su caracterización bioquímica, que debe llevarse a cabo a partir de cultivos puros. Los test bioquímicos pueden realizarse de manera convencional o utilizando galerías comerciales como las tiras API 20 NE o las tiras API 50 CH. Además, hay test que están considerados como universales para la identificación de esta bacteria (Schaad y Stall, 1988; Schaad *et al.*, 2001), que son los que hemos descrito previamente en el apartado 1.3.1.

Por otro lado, el sistema BIOLOG GN permite diferenciar las cepas de *X. arboricola* del resto de especies de *Xanthomonas* en función de su capacidad para metabolizar distintas fuentes de carbono (Vernière *et al.*, 1993; Vauterin *et al.*, 1995).

### 1.3.6.3 Perfil de ácidos grasos y espectrometría de masas

El perfil de ácidos grasos (FAME, del inglés “fatty acids methyl ester profile analysis”) permite la identificación de cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* cuando al comparar el perfil de la cepa sospechosa con los perfiles disponibles en una base de datos se obtiene un índice de similitud de 0.500 o superior (Sasser, 1990; Stead *et al.*, 1992). Según Scortichini *et al.* (1996) los ácidos grasos más abundantes en *X. arboricola* pv. *pruni* son 15:0 ISO, 15:0 ANTEISO y el ácido graso insaturado 16:1 w7c.

Más recientemente se ha descrito que la espectrometría de masas con el sistema MALDI-TOF (“matrix assisted laser desorption ionization-time of flight”) permite una identificación rápida y fiable tanto a nivel de especie como a nivel de patovar, por lo que ha sido aplicado con éxito con cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* (Pothier *et al.*, 2011b).

### 1.3.6.4 Test de patogenicidad

Las colonias sospechosas de ser *X. arboricola* pv. *pruni* se deben inocular en planta para confirmar que son patógenas. Además, la reacción de hipersensibilidad en tabaco o tomate, permite en pocos días tener una información previa sobre el posible poder patógeno de un aislado.

- **Reacción de hipersensibilidad**

Esta prueba consiste en la inoculación de una suspensión bacteriana de la cepa ensayada en hojas de tabaco o de tomate (Klement *et al.*, 1964). Una reacción positiva en la prueba es un indicador de la presencia de los genes *hrp*

(“hypersensitive reaction and pathogenicity”) y por tanto del poder patógeno de la cepa. Una típica reacción de hipersensibilidad de *X. arboricola* pv. *pruni* en tomate se suele observar tras 24-48 horas, mientras que en tabaco normalmente ocurre a los 3 días (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012). No todos los síntomas aparecidos tras la inoculación implican que la prueba sea positiva, por ejemplo, una reacción atípica en tabaco es la pérdida de turgencia en la zona infiltrada 24 horas después de la inoculación. A los 5 días, esa zona se acaba necrosando y aparece un halo clorótico alrededor (Roselló, 2007).

- **Inoculación en huéspedes del género *Prunus***

Para confirmar la patogenicidad de un cultivo de *X. arboricola* pv. *pruni* sospechoso, es necesaria su inoculación en un huésped del género *Prunus*, y su posterior reaislamiento a partir de las lesiones producidas, cumpliendo con los postulados de Koch. Según el protocolo de la EPPO (EPPO, 2006) se pueden realizar dos tipos de inoculación: en hoja cortada o en planta entera.

- **Inoculación en hoja cortada**

Según el método de Randhawa y Civerolo (1985) se usan hojas jóvenes de melocotonero de una variedad sensible a *X. arboricola* pv. *pruni*. Si la cepa se ha aislado de ciruelo, es conveniente que el ensayo de patogenicidad se haga en una variedad de ciruelo susceptible (Bazzi *et al.*, 1990; Simeone, 1990). Para que la prueba sea positiva, después de 6-9 días, en los puntos donde se ha producido la inoculación deben aparecer los síntomas característicos como manchas necróticas rodeadas por un halo clorótico y es frecuente la aparición de exudado en lesiones más viejas.



### - Inoculación en planta entera

Es también conveniente el uso de plantas de melocotonero, ciruelo o patrones de variedades susceptibles. La EPPO recomienda dos protocolos de inoculación. Según Randhawa y Civerolo (1985) se infiltran hojas jóvenes usando una jeringuilla sin aguja, presionando suavemente hasta que el tejido foliar esté empapado. Por otro lado, según Du Plessis (1988) la inoculación se realiza en forma de aerosol sobre el envés de hojas jóvenes. Las plantas deben mantenerse en condiciones de alta humedad y a una temperatura de 25°C. Las lesiones aparecen entre 1-4 semanas después de la inoculación.

#### 1.3.6.5 Técnicas serológicas

- **IF y ELISA**

Según el protocolo de la EPPO (EPPO, 2006) es posible analizar muestras tanto sintomáticas como asintomáticas mediante IF, y su uso ha sido validado tanto para melocotonero como para ciruelo. En la actualidad, existen varios kits comerciales tanto de IF como de “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” (ELISA) para la detección de *X. arboricola* pv. *pruni* (ADGEN, Reino Unido; SEDIAG, Francia; AGDIA, Estados Unidos). Sin embargo, el hecho de que los anticuerpos disponibles en dichos kits sean policlonales, no permite una detección específica de este patógeno, obteniéndose reacciones cruzadas con otras especies de *Xanthomonas* como *X. campestris* pv. *campestris*, *X. hortorum* pv. *pelargonii*, *X. axonopodis* pv. *vitians*, *X. vesicatoria*, *X. cynarae* y también probablemente con otras especies de *Xanthomonas*. Por tanto, el uso de estas técnicas solo se

recomienda para detectar de una manera rápida la presencia de alguna bacteria del género *Xanthomonas*, pero no para una identificación precisa de *X. arboricola* pv. *pruni* (López *et al.*, 2010; Palacio-Bielsa *et al.*, 2012).

- **Inmunoensayos de flujo lateral**

Esta técnica consiste en el uso de tiras fabricadas con un material polimérico, generalmente nitrocelulosa, que llevan adheridos una serie de reactivos que se activan al entrar en contacto con las muestras en estado líquido. Este tipo de ensayos, que se han aplicado con éxito en distintos campos, se están usando cada vez más en el diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas ya que presenta una serie de ventajas respecto a otras metodologías como su facilidad de uso, su bajo coste, su robustez y su prolongada vida útil. Además, pueden usarse directamente en campo, obteniéndose resultados fiables en menos de 15 minutos (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; Noguera *et al.*, 2011).

Las tiras utilizadas en los inmunoensayos de flujo lateral están formadas por diferentes membranas que se solapan y sobre las que se depositan los reactivos, y aunque generalmente se usan anticuerpos específicos del patógeno diana, también pueden usarse ácidos nucleicos (Noguera *et al.*, 2011). Los anticuerpos se depositan en dos puntos concretos de las tiras, uno es la línea de ensayo, en la que se fijan anticuerpos de captura específicos para el analito de interés, y el otro es la línea de control, en la que se fija un anticuerpo secundario y cuya única función es confirmar que la tira ha funcionado correctamente (Figura 8). El funcionamiento de las tiras es sencillo: la muestra líquida se mezcla junto con un conjugado (formado por reactivos que permitirán la detección visual y un anticuerpo específico) y se añade sobre la tira. El conjugado es arrastrado por capilaridad y pasa por las líneas de ensayo y de control. Si la muestra es positiva,

se producirá un reconocimiento anticuerpo-antígeno en las dos líneas y la acumulación de partículas en ese punto hará que ambas sean visibles, mientras que si la muestra es negativa solo se producirá reconocimiento en la línea control y solo ésta será visible (De Boer y López, 2012).

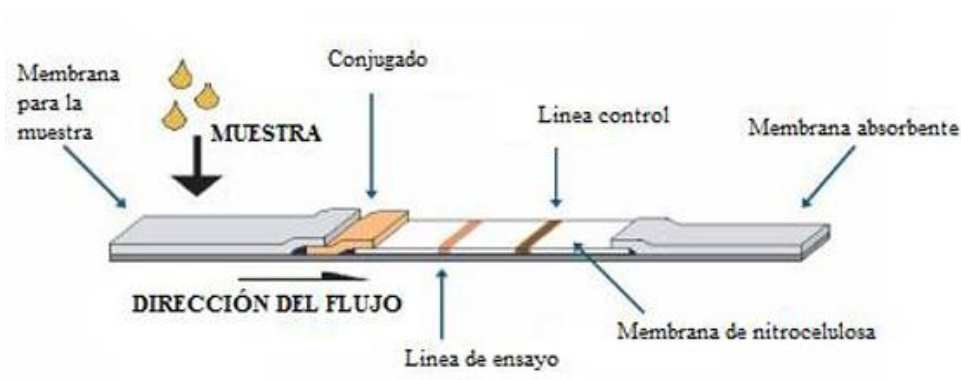


Figura 8. Esquema de un inmunoensayo de flujo lateral en tira (O'Farrell, 2009).

El conjugado puede estar formado por diversas partículas que faciliten la visualización de la señal producida. Normalmente se suele emplear partículas de oro coloidal, látex, sílice o selenio (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; De Boer y López, 2012). También se ha comprobado que las nanopartículas de carbono dan excelentes resultados, ya que además de facilitar la detección visual, permiten la cuantificación de la señal obtenida (Noguera *et al.*, 2011).

En el capítulo 3 de esta tesis presentaremos un prototipo de tira de flujo lateral que permite la detección específica de *X. arboricola* pv. *pruni* en muestras de campo naturalmente infectadas.

### 1.3.6.6 Técnicas moleculares

- **Protocolos de PCR**

En los últimos años se ha producido un incremento en el desarrollo de técnicas moleculares, principalmente protocolos de PCR, utilizadas para el diagnóstico de la mancha bacteriana causada por *X. arboricola* pv. *pruni*. Estas técnicas permiten una detección e identificación del organismo patógeno mucho más rápida y precisa, en comparación con los métodos tradicionales. Además, pueden llegar a ser más sensibles y su uso es relativamente sencillo. A pesar de todo esto, ningún protocolo de PCR está todavía incluido en el protocolo de la EPPO (EPPO, 2006), posiblemente debido a que éste fue publicado hace once años.

El primer protocolo de PCR convencional para *X. arboricola* pv. *pruni* fue diseñado por Pagani (2004) y fue durante varios años la única técnica molecular disponible para la detección e identificación de este patógeno. Los iniciadores diseñados para esta PCR (Y17CoF/Y17CoR) amplifican un fragmento de 943 pares de bases (pb) correspondiente a una región parcial de un gen relacionado con un transportador de membrana tipo ABC presente en la bacteria. Este protocolo fue posteriormente optimizado por Peñalver *et al.* (2008) y Scortichini (2008). Sin embargo, este método no es lo suficientemente sensible, resultando inapropiado para la detección de *X. arboricola* pv. *pruni* en muestras asintomáticas (López *et al.*, 2010) y además se observaron reacciones cruzadas con cepas de *X. arboricola* pv. *celebensis*, *X. arboricola* pv. *corylina* y *X. arboricola* pv. *poinsettiicola* (Pothier *et al.*, 2011c). Aún así, López *et al.* (2012) evaluaron la eficiencia de una versión optimizada del protocolo para la detección de *X. arboricola* pv. *pruni* en muestras sintomáticas de diferentes huéspedes, obteniendo resultados comparables a los conseguidos mediante aislamiento en medio de cultivo y PCR en tiempo real, por

lo que este protocolo se puede usar en caso de necesitar resultados rápidos o no disponer de equipos de PCR en tiempo real.

Otro protocolo de PCR convencional utilizado para la detección de *X. arboricola* pv. *pruni* es el desarrollado por Park *et al.* (2010) basado en la pareja de iniciadores XapF/XapR que amplifican una región de 243 pb asociada a los genes *hrp* de *Xanthomonas*. Según sus autores, es un protocolo específico para el patovar *pruni* y muy útil para la detección de este patógeno en muestras naturalmente infectadas, aunque solo se ha ensayado en muestras de melocotonero.

Otro protocolo, en este caso de dúplex-PCR, fue descrito por Pothier *et al.* (2011c), en el que se combinan la pareja de iniciadores descritos por Pagani (2004) junto con otro par de iniciadores (XarbQ-F/XarbQ-R) que amplifica una región de 402 pb del gen *qumA* asociado al metabolismo del quinato. Se demostró que era un método muy sensible para la detección de *X. arboricola* pv. *pruni* en muestras sintomáticas de albaricoquero. Sin embargo, se volvieron a obtener reacciones cruzadas con cepas de *X. arboricola* pv. *celebensis*, *X. arboricola* pv. *corylina* y *X. arboricola* pv. *poinsettiicola*, aunque esto no debería interferir en un diagnóstico preciso de la mancha bacteriana puesto que dichos patovares nunca se han descrito en especies del género *Prunus*.

Pothier *et al.* (2011a) también desarrollaron una *multiplex*-PCR basada en la secuencia de ADN del plásmido pXap41, presente en cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* pero no en otros patovares de *X. arboricola*, indicando su gran potencial como herramienta para la detección e identificación específica de este patógeno. Los iniciadores se diseñaron a partir de genes del plásmido implicados en su replicación y movilización (*repA1*, *repA2* y *mobC*). El poder de discriminación a

nivel de patovar de este método se demostró con la amplificación de una colección representativa de cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* de distintos orígenes geográficos y cubriendo todo el rango de genotipos descritos por Boudon *et al.* (2005) y Zaccardelli *et al.* (1999). Además, las cepas de otros patovares como *celebensis*, *corylina*, *fragariae*, *juglandis*, *poinsettiicola* y *populi* dieron resultado negativo. Sin embargo, no hay información disponible acerca de la sensibilidad del protocolo para la detección de *X. arboricola* pv. *pruni* en material vegetal naturalmente infectado.

En cuanto a los protocolos de PCR en tiempo real, Palacio-Bielsa *et al.* (2011) diseñaron unos iniciadores (Xap-2F/Xap-2R) y una sonda TaqMan (Xap-2P) a partir de la misma región del gen asociado al transportador de membrana tipo ABC usado por Pagani (2004), que permiten amplificar un fragmento de 72 pb. Se demostró que era un método muy sensible y específico, tanto para muestras sintomáticas como asintomáticas de distintas especies de *Prunus*, alcanzando una sensibilidad de  $10^2$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml), tras un proceso previo de extracción de ADN usando el método de Llop *et al.* (1999). En algunos casos, la amplificación fue posible, incluso sin el paso previo de extracción de ADN. Actualmente, es uno de los protocolos más usados, aunque también amplifican cepas de *X. arboricola* pv. *corylina*.

Existe otro protocolo de PCR en tiempo real desarrollado por Ballard *et al.* (2011) quienes diseñaron unos iniciadores (29F/29R) que amplifican un fragmento de 344 pb y que se caracteriza por el uso de SYBR Green en lugar de una sonda. Es un método que se indica como específico para *X. arboricola* pv. *pruni*, sin embargo, su sensibilidad no es demasiado buena, por lo que se recomienda realizar un paso previo a la PCR consistente en un enriquecimiento de la bacteria mediante su

cultivo en el medio semiselectivo XPSM. A este procedimiento se le conoce con el nombre de Bio-PCR.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo protocolo de PCR en tiempo real que permite diferenciar cepas patógenas de *X. arboricola* pv. *pruni* de cepas no patógenas de *X. arboricola* aisladas en especies de *Prunus*, conocidas como *Xap-look-a-like* (Garita-Cambroner *et al.*, 2017), algo que con el resto de protocolos de PCR previamente descritos era imposible de conseguir. Tanto los iniciadores (XopE3F-XopE3R) como la sonda (XopE3P) se diseñaron a partir de la secuencia parcial del gen *XopE3*, que es un efector del tipo III únicamente encontrado en cepas del patovar *pruni*. Con este protocolo se han observado reacciones cruzadas con cepas de *X. axonopodis*, *X. campestris* y *X. citri* subsp. *citri*, por lo que los autores recomiendan el uso combinado de este protocolo junto con el desarrollado por Palacio-Bielsa *et al.* (2011) para una precisa identificación de *X. arboricola* pv. *pruni*. De esta manera, si con una cepa se obtiene un resultado positivo con ambos protocolos puede identificarse como *X. arboricola* pv. *pruni*, mientras que si solo da positivo por el protocolo de Palacio-Bielsa *et al.* (2011), la cepa se englobaría en el grupo de las *Xap-look-a-like*.

Los iniciadores y las sondas utilizados en estos protocolos están descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores y sondas de PCR descritas para la detección e identificación de *X. aroricola* pv. *pruni*.

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Tipo PCR	Referencia
Y17CoF	GAC GTG GTG ATC AGC GAG TCA TTC	Convencional	Pagani (2004)
Y17CoR	GAC GTG GTG ATG ATG ATC TGC		
XapF	GAA GCT CGA TGC CAC ATC GT	Convencional	Park <i>et al.</i> (2010)
XapR	GTG CAG ATC CTC AGC ATG TC		
<i>XapY17CoF</i>	GAC GTG GTG ATC AGC GAG TCA TTC	Dúplex	Pothier <i>et al.</i> (2011c)
<i>XapY17CoR</i>	GAC GTG GTG ATG ATG ATC TGC	convencional	
<i>XarbQ-F</i>	GCG CGA GAT CAA TGC GAC CTC GTC		
<i>XarbQ-R</i>	GGT GAC CAC ATC GAA CCG CGC A		
pXap41 repA1-F	GCG AGG ACA TGG CTT TCA C	<i>Multiplex</i>	Pothier <i>et al.</i> (2011a)
pXap41 repA1-R	GCG GCC AAG GCG TGC ATC TGC	convencional	
Xap41 repA2-F	TAC CAA GAG CGG 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		
29F	GTA CCG CAT TTC AGG CCG TCA	Tiempo real (SYBR Green)	Ballard <i>et al.</i> (2011)
29R	AAG TAG CCA ACG CGG AAT TT		
Xap-2F	TGG CTT CCT GAC TGT TTG CA	Tiempo real sonda	Palacio-Bielsa <i>et al.</i> (2011)
Xap-2R	TCG TGG GTT CGC TTG ATG A		
Sonda Xap-2P	FAM-TCA ATA TCT GTG CGT TGC TGT TCT CAC GA-TAMRA	TaqMan	
XopE3F	TCA GCG ATC ACG CAT CCA	Tiempo real sonda	Garita- Cambronero
XopE3R	CGC ACC AGA TCG ACA AAC AC		
Sonda XopE3P	CAT GCG CAG GCC GCA CAT	TaqMan	<i>et al.</i> (2017)



- **LAMP**

Finalmente, además de los protocolos de PCR, se ha desarrollado otro método de detección basado en la técnica LAMP (“Loop Mediated Isothermal Amplification”), con la que se consigue una amplificación específica de ADN de una manera rápida y eficiente en condiciones isotérmicas (Notomi *et al.*, 2000). Diferentes estudios han demostrado su utilidad como técnica de detección de bacterias fitopatógenas (Temple *et al.*, 2008; Rigano *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2010; Temple y Johnson, 2011; De Boer y López, 2012). Además, Bühlman *et al.* (2013) han desarrollado un protocolo de LAMP para la detección de *X. arboricola* pv. *pruni* que ha demostrado ser específico, ya que no se han observado amplificaciones con cepas de otros patovares de *Xanthomonas arboricola* ni con cepas de otros patógenos de especies de *Prunus*. En cuanto a su sensibilidad, aunque se ha demostrado en un estudio con muestras de almendro que es ligeramente inferior a la obtenida con la PCR en tiempo real (Palacio-Bielsa *et al.*, 2015b), es suficiente como para poder utilizar este método para el diagnóstico de la mancha bacteriana.

### **1.3.7 Epidemiología de la mancha bacteriana**

#### **1.3.7.1 Supervivencia del patógeno y fuentes de inóculo**

La mancha bacteriana es más frecuente y causa los mayores daños en zonas de climas templados y húmedos. Según la información disponible, *X. arboricola* pv. *pruni* es capaz de sobrevivir y multiplicarse de forma epífita sobre la superficie de varios órganos de la planta sin producir síntomas (Shepard y Zehr, 1994) y también de sobrevivir de forma endófito. Durante el invierno, se localiza principalmente en yemas latentes y en las axilas de las hojas (Scortichini, 2010;

Lamichhane, 2014), aunque también podemos encontrar la bacteria en hojas caídas durante el invierno (Zacardelli *et al.*, 1998), en chancros, especialmente en ciruelo japonés (Bazzi y Mazzuchi, 1980; Ritchie, 1995) o en frutos de almendra momificados y que quedaron adheridos al árbol tras la recolección (Palacio-Bielsa *et al.*, 2010a). Todos estos reservorios representan importantes fuentes de inóculo para las infecciones primaverales (Battilani *et al.*, 1999; Garcin *et al.*, 2011).

Sin embargo, el ciclo de esta enfermedad se ha basado en estudios que consideraban que las bacterias solo están vivas cuando son capaces de multiplicarse y formar una progenie en condiciones óptimas (Postgate, 1967; 1969; Davis, 2014), por lo que aquellas que no formaban colonias en medio de cultivo se consideraban muertas. Esta idea ha sido cuestionada durante muchos años, hasta que con el desarrollo de métodos microbiológicos independientes del cultivo (Zimmerman *et al.*, 1978; Kogure *et al.*, 1979) se demostró la existencia de células no cultivables que sin embargo son viables y metabólicamente activas.

Se ha demostrado que algunas bacterias, como respuesta a algún tipo de estrés, pueden perder su capacidad de crecer en medios de cultivo donde lo hacen habitualmente, pero permanecer viables (Oliver, 1993), dando lugar a lo que se conoce como estado viable no cultivable (VNC). Las células en este estado se caracterizan por mantener la integridad de sus membranas y por presentar actividad celular (Lai *et al.*, 2009), actividad metabólica (Oliver, 2005), capacidad de expresión de genes (Maalej *et al.*, 2004) y capacidad para recuperar la cultivabilidad (Anuchin *et al.*, 2009). Este estado se considera como una estrategia de supervivencia que la bacteria utiliza ante distintas situaciones de estrés (Roszak y Colwell, 1987). Es necesario señalar que hay que tenerlo en cuenta desde el punto de vista epidemiológico, ya que se ha demostrado que las células en este

estado mantienen su poder patógeno (Oliver, 2005) e incluso son capaces de sintetizar toxinas (Weichart, 1999), por lo que no es descartable que bacterias en estado VNC tengan un papel importante en la aparición y desarrollo de enfermedades (Oliver, 2000).

Aunque el estado VNC no se ha descrito en *X. arboricola* pv. *pruni*, es bastante probable que pueda inducirse, como ocurre con otras *Xanthomonas* como *X. campestris* pv. *campestris* (Ghezzi y Steck, 1999) o *X. citri* subsp. *citri* (Del Campo *et al.*, 2009; Golmohammadi *et al.*, 2013). Por ello, si la bacteria entra en este estado en situaciones de estrés, su ciclo y sus reservorios, podrían ser más amplios de los actualmente considerados.

### 1.3.7.2 Ciclo de la enfermedad

Con la llegada de la primavera, se inicia la fase vegetativa de las especies de *Prunus* y la bacteria presente en las plantas coloniza los nuevos brotes recién formados de forma epífita, ocasionando posteriormente las primeras lesiones en hojas y frutos (Lamichhane, 2014). Este proceso se ve favorecido por temperaturas de entre 19 y 30°C y una elevada humedad relativa (Stefani, 2010). Para que la infección tenga éxito, los tejidos de la planta deben estar en estado de congestión hídrica (Zehr *et al.*, 1996) y es imprescindible que haya una película de agua sobre las hojas que facilite la proliferación de la bacteria y su entrada a través de los estomas (Lamichhane, 2014). Además, una vez en el interior de la planta, el agua facilita la difusión de la bacteria a través de los espacios intercelulares. El tiempo de incubación de esta bacteria depende de la temperatura, la humectación de las hojas y la cantidad de inóculo, pero en condiciones similares de temperatura, el periodo de latencia disminuye cuando

aumenta la humectación (Zehr *et al.*, 1996). La concentración de inóculo y la sensibilidad varietal influyen de manera determinante en la severidad de la infección (Battilani *et al.*, 1999). Los estudios realizados en Italia han demostrado que las infecciones primarias en las hojas de melocotonero “Elegant Lady” se producen tras tres días consecutivos de lluvias con temperaturas de entre 14 y 19°C (Battilani *et al.*, 1999). Los momentos más decisivos para la infección tienen lugar las seis semanas siguientes a la floración.

Además de las condiciones climáticas, la incidencia de la enfermedad está relacionada con las características edafológicas y con las prácticas culturales. Se ha indicado que los suelos arenosos y los muy arcillosos facilitan la aparición de brotes severos de la enfermedad (Scortichini, 2010). Por el contrario, Zehr *et al.* (1996) no observaron síntomas en árboles de melocotonero “Suwanee” plantados en suelos arenosos con una mezcla de limo y vermiculita. Por otro lado, se ha observado que la sensibilidad del huésped a la enfermedad aumenta de forma notable cuando éste se encuentra en suelos infestados con el nematodo *Criconemella xenoplax* (Shepard *et al.*, 1999). En cuanto a las prácticas culturales, tanto la deficiencia de nutrientes como un exceso de fertilización mineral predispone a las plantas a ser más fácilmente infectadas por *X. arboricola* pv. *pruni* (Lamichhane, 2014).

El ciclo de la enfermedad se muestra en la Figura 9. Se observa que *X. arboricola* pv. *pruni* penetra en los tejidos vegetales a través de aberturas naturales como los estomas, o bien por heridas producidas ya sea de forma natural (viento o granizo) o provocadas por el hombre (heridas causadas durante la poda o la recolección). Durante el proceso de infección primaria, en el que se producen las lesiones de primavera, la bacteria se multiplica inicialmente en la cavidad subestomática y después en el apoplasto de los espacios intercelulares de las hojas. La

proliferación de la bacteria junto con la destrucción del tejido vegetal a causa de su actividad enzimática, provoca la rotura de la epidermis y la formación de lesiones necróticas y de chancros de primavera (Aarouf *et al.*, 2008). En esta fase, la bacteria produce abundante exopolisacárido, y forma estructuras tipo biopelícula que facilitan la infección y la supervivencia de la bacteria en distintos órganos. Además se disemina a otras partes de la planta, dando lugar a las lesiones de verano (Garcin *et al.*, 2005). A final del verano y principios del otoño se producen infecciones en brotes verdes, posiblemente por el bajo nivel de defensas de la planta en esa época, y éstos serán los lugares donde la bacteria persista durante el invierno (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014).

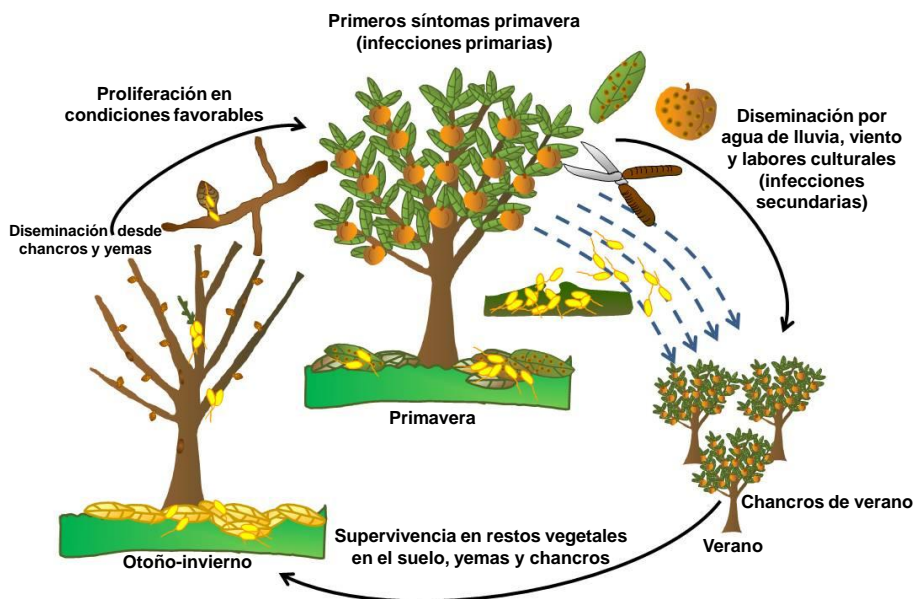


Figura 9. Ciclo de la enfermedad de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro causada por *X. arboricola* pv. *pruni* (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014).

Se ha descrito que *X. arboricola* pv. *pruni* puede moverse de forma sistémica por la planta, y que es capaz de dirigirse desde las lesiones iniciales en las hojas hasta el tejido meristemático de los brotes a través de los vasos del xilema (Du Plessis, 1984, 1986, 1987; Aarouf *et al.*, 2008).

La bacteria se disemina a corta distancia de manera natural. A partir de las lesiones, y gracias a la lluvia, al viento y al uso de maquinaria o herramientas de poda contaminadas, la bacteria se puede transmitir a otros árboles próximos e incluso a los de parcelas cercanas (Goodman y Hatting, 1986). A larga distancia, la principal vía de diseminación es el movimiento de material vegetal de propagación contaminado, ya sea entre viveros del mismo país o de países diferentes (Boudon *et al.*, 2005).

### **1.3.7.3 Mecanismos de virulencia de *X. arboricola* pv. *pruni***

No hay mucha información respecto a los factores asociados a los mecanismos de virulencia de *X. arboricola* pv. *pruni*. En cuanto a los mecanismos iniciales de infección y los compuestos que juegan un papel importante en la unión de las bacterias a la superficie del huésped y en la formación de biopelículas (Hori y Matsumoto, 2010), hay estudios acerca de la composición del xantano (Borges y Vendruscolo, 2008) y del polisacárido específico O (Molinari *et al.*, 2003), que forma parte de los lipopolisacáridos constituyentes de la membrana externa de las bacterias. Ambos actúan en estadios iniciales de colonización de un huésped en los que intervienen una serie de sensores y receptores que proporcionan al patógeno información acerca del entorno y que desencadenan una serie de procesos como la quimiotaxis, motilidad o la formación de estructuras tipo biopelícula, necesarios para que se produzca la infección (Qian *et al.*, 2008;

Pieretti *et al.*, 2012). En esta fase, hay una serie de complejos proteicos que juegan un papel fundamental, como los transportadores TonB-dependientes, los sensores del sistema regulador de dos componentes y las proteínas aceptoras de grupos metilo (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011). La motilidad, tanto en superficies sólidas como semi-sólidas, está asociada al flagelo y a una serie de adhesinas fimbriales o no fimbriales, entre las que destaca el pilus tipo IV (Craig *et al.*, 2004; Craig y Li, 2008). Estudios recientes han confirmado que las cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* son capaces de moverse en superficie mediante movimiento tipo swarming (Garita-Cambronero *et al.*, 2016c) y este tipo de movimiento está asociado tanto a la presencia del flagelo como a la producción de sustancias surfactantes.

En cuanto a los factores asociados a etapas más tardías de la infección, se ha determinado el repertorio de efectores tipo III (T3E) de este patovar, que juegan un papel muy importante en la virulencia de la bacteria (Mayer *et al.*, 2011). Las cepas virulentas de *X. arboricola* pv. *pruni* presentan un sistema de secreción tipo III (T3SS) del tipo Hrp2, que generalmente está presente en todas las especies de *Xanthomonas*, y que está compuesto por los genes *hrcC*, *hrcJ*, *hrcN*, *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU*, *hrcV*, *hrpB1*, *hrpD5* y *hrpF*. En cuanto al repertorio de efectores T3E de este patógeno está formado por 21 genes: *avrBs2*, *avrXccA1*, *avrXccA2*, *hpaA*, *hrpW*, *xopA*, *xopAF*, *xopAH*, *xopAI*, *xopE2*, *xopE3*, *xopF1*, *xopG*, *xopK*, *xopL*, *xopN*, *xopQ*, *xopR*, *xopV*, *xopX* y *xopZ* (Hajri *et al.*, 2012).

Además, la secuenciación del plásmido pXap41, descrito solo en cepas de *X. arboricola* pv. *pruni*, ha confirmado que éste puede jugar un papel importante en la virulencia de las cepas, ya que se ha demostrado la existencia de efectores T3E (*xopE3* y *xopAQ*) y otros genes asociados al sistema de secreción tipo III (*mltB*) codificados tanto en el cromosoma como en el plásmido (Pothier *et al.*, 2011a).

### 1.3.8 Diversidad genética de *X. arboricola* pv. *pruni*

A pesar de su importancia económica, hasta hace relativamente poco tiempo no había mucha información acerca de la diversidad genética de este patógeno y de su estructura poblacional, aspectos muy importantes a tener en cuenta para mejorar las estrategias de control y diseminación de esta bacteria. El principal inconveniente era la ausencia de una metodología con la suficiente capacidad de resolución para discriminar entre individuos de especies monomórficas, como es el caso de las cepas que constituyen el patovar *pruni* (Dallai *et al.*, 2009).

El primer trabajo que abordó el tema de la diversidad genética en *X. arboricola* pv. *pruni* fue el llevado a cabo por Zaccardelli *et al.* (1999) mediante la técnica de AFLP. Estos autores estudiaron la variabilidad existente en un grupo de 109 cepas de *X. arboricola* pv. *pruni*, principalmente italianas pero también incluyendo algunas de otros continentes, y 8 cepas de otras especies de *Xanthomonas*. Los perfiles de AFLP obtenidos permitieron diferenciar claramente a las cepas del patovar *pruni* del resto de especies de *Xanthomonas*. Sin embargo se confirmó que la técnica no tiene la suficiente resolución para distinguir entre las cepas de *pruni*, incluso aunque tengan orígenes geográficos diferentes.

Pocos años después, Boudon *et al.* (2005) analizaron 64 cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* originarias de tres continentes diferentes mediante el análisis de la secuencia de la región ITS y un MLSA con los genes *atpD*, *dnaK*, *efp* y *glnA*, y no observaron apenas diversidad genética entre ellas, confirmando la homogeneidad de las cepas de este patovar. Las mismas cepas también se analizaron mediante AFLP fluorescente (FAFLP) y aunque el polimorfismo observado fue menor que con otras especies de *Xanthomonas*, fue suficiente para identificar 14 genotipos distintos. La mayoría de cepas (46 de 64) se agruparon en uno de esos genotipos



que curiosamente contenía cepas de cinco países y tres continentes diferentes, incluyendo la mayoría de cepas europeas, cepas de Estados Unidos, una de Brasil y otra de Australia. Además, se observó menor diversidad genética entre las cepas europeas que entre las norteamericanas. A la vista de estos resultados, los autores sugirieron que la aparición de la bacteria en Europa se debió a la introducción desde Estados Unidos del genotipo más frecuente a nivel mundial.

Más recientemente, Fischer-Le Saux *et al.* (2015) también analizaron cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* mediante MLSA, esta vez con siete genes (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* y *rpoD*) y se volvió a confirmar el bajo grado de polimorfismo de este patovar, agrupándose casi todas las especies en un mismo grupo clonal.

También se han hecho estudios basados en perfil de integrones y casetes génicos y BOX-PCR (Barionovi y Scortichini, 2006; 2008) obteniendo resultados similares que con el resto de técnicas. En este caso, tras la amplificación de los casetes génicos, se encontraron dos patrones claramente diferenciados entre las cepas de *X. arboricola* pv. *pruni*, aunque esas diferencias no estaban asociadas al origen geográfico de las cepas ni al huésped. Mediante BOX-PCR también se observaron dos patrones entre las cepas del patovar *pruni*, sin embargo los resultados no concordaban con los obtenidos con los casetes. Por tanto, a pesar de que estas técnicas no resultaron suficientemente resolutivas, permitieron señalar la posible existencia de varios linajes dentro del patovar.

Por último, Kawaguchi (2014) estudió la diversidad genética de 148 cepas japonesas de *X. arboricola* pv. *pruni* mediante “Inter-Simple Sequence Repeat PCR” (ISSR-PCR) y “repetitive sequence-based PCR” (rep-PCR). Aunque se obtuvieron cuatro genotipos distintos, 145 de las 148 se agruparon en el mismo,

confirmando una vez más la escasa diversidad genética de este patovar, al menos entre cepas japonesas.

A pesar de que todos estos métodos permiten diferenciar claramente cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* del resto de patovares de la especie, no tienen la suficiente resolución como para analizar de modo general la variabilidad genética existente dentro del patovar. Es por ello, que en los últimos años se ha utilizado la técnica del MLVA debido a la gran capacidad para evaluar la diversidad genética de patógenos que presentan poca diversidad genética entre sus cepas (Achtman, 2008), como es el caso de *X. arboricola* pv. *pruni*. Además, esta técnica constituye una herramienta muy útil para el conocimiento de la epidemiología molecular de una enfermedad, ya que permite establecer las posibles relaciones existentes entre cepas aisladas en distintos brotes, así como aportar información acerca de las posibles vías de introducción y diseminación de una determinada bacteria.

El primer análisis MLVA realizado con cepas de este patovar fue el llevado a cabo por Bergsma-Vlami *et al.* (2012) con 25 cepas de *P. laurocerasus* aisladas en Holanda, que fueron analizadas con seis VNTR (“variable number of tandem repeats”) polimórficos. Este análisis permitió clasificar las 25 cepas en 14 haplotipos diferentes que se agruparon en dos grupos principales, y aunque no se pudo establecer una correlación entre las cepas y su origen geográfico, se planteó la hipótesis de que cada uno de esos dos grupos en los que se clasificaron, podían representar diferentes introducciones de la bacteria por importación de plantas infectadas de *P. laurocerasus* desde otras partes de Europa.

Poco después, Cesbron *et al.* (2014) desarrollaron un esquema de MLVA basado en 26 VNTR polimórficos obtenidos a partir del genoma de una cepa de *X. arboricola* pv. *pruni*, y que permitían diferenciar los diferentes patovares de la

especie. En nuestro caso, dicho esquema de MLVA fue evaluado y mejorado para llevar a cabo un estudio de la diversidad genética y la estructura poblacional de una amplia colección de cepas españolas de *X. arboricola* pv. *pruni*, que proporcionara información acerca de la relación existente entre las cepas y sus posibles vías de entrada y diseminación, como veremos con más detalle en el capítulo 4 de esta tesis.

### **1.3.9 Control de *X. arboricola* pv. *pruni***

La mancha bacteriana de los frutales de hueso y el almendro es una enfermedad de difícil control, como ocurre con la mayoría de enfermedades causadas por bacterias. Además, para un buen control, se requiere un conocimiento en profundidad tanto del patógeno y sus huéspedes como de la epidemiología de la enfermedad. Es necesario llevar a cabo una estrategia de control integrada compuesta por medidas de distintos tipos, incluyendo una adecuada legislación, el uso de variedades resistentes o de baja sensibilidad, prácticas culturales y medidas de control en campo, bien mediante productos químicos o con técnicas de control biológico. La estrategia debe centrarse en evitar la introducción y diseminación del patógeno, ya que una vez establecido su control práctico es mucho más complicado.

#### **1.3.9.1 Medidas legales**

La directiva europea 2000/29/EC proporciona a los estados miembros de la UE una base jurídica para la adopción de medidas legales en zonas donde la producción de frutales de hueso o almendro se vean afectadas por *X. arboricola*

*pv. pruni* (Stefani, 2010). En España, en zonas donde la enfermedad no esté presente se debe evitar la introducción de material vegetal infectado, y los Servicios de Sanidad Vegetal de las comunidades autónomas son los encargados de aplicar las medidas fitosanitarias, incluyendo medidas de contención y erradicación en caso de que sea necesario, de acuerdo a la legislación nacional o autonómica (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014).

Actualmente, la inspección visual de síntomas una vez al año es el único requisito necesario para la certificación de material vegetal no infectado por *X. arboricola pv. pruni*, excepto semillas. Esta medida es claramente insuficiente para evitar la diseminación del patógeno debido a la probabilidad de que haya infecciones asintomáticas (López *et al.*, 2010; Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). Por tanto, para un control eficaz, es necesario disponer de técnicas rápidas, eficientes y lo suficientemente sensibles para la detección de *X. arboricola pv. pruni* incluso en muestras asintomáticas, y de aplicarlas, tanto a nivel autonómico como nacional.

### **1.3.9.2 Sensibilidad varietal y selección de genotipos resistentes**

Aunque se dispone de mucha información acerca de la resistencia y la sensibilidad de algunas variedades y especies de *Prunus*, finalmente la elección varietal suele estar más condicionada por intereses comerciales que por criterios fitopatológicos. En cualquier caso, en la medida que sea posible es muy conveniente el uso de variedades consideradas resistentes o poco sensibles a la enfermedad (Simeone y Scortichini, 2005; Garcin y Bresson, 2009).

Actualmente, la carencia de un germoplasma de frutales de hueso y almendro con un alto grado de resistencia a la enfermedad limita en gran medida el control

preventivo de la mancha bacteriana. Hammerschlag (1988) fue el primero en intentar obtener plantas resistentes a *X. arboricola* pv. *pruni* mediante el uso de cultivo de tejidos. Sin embargo, a pesar de obtener plantas que conservaban caracteres de resistencia cuando crecían en invernadero, estos se perdían o no se expresaban cuando las plantas eran cultivadas en condiciones de campo (Hammerschlag *et al.*, 1994). Weisheng *et al.* (1996) publicaron la posible identificación de fuentes de resistencia en germoplasma de ciruelo, pero esos resultados nunca llegaron a confirmarse.

Recientemente, los avances en mejora genética han permitido generar mapas de loci de caracteres cuantitativos (QTLs), que posibilitan la obtención de variedades resistentes o con mayor grado de tolerancia a *X. arboricola* pv. *pruni* en albaricoquero y melocotonero (Socquet-Juglard *et al.*, 21013; Yang *et al.*, 2013). En el caso del albaricoquero, se estudió una población obtenida del cruce entre las variedades “Harostar” x “Rouge de Mauves” para desarrollar un análisis de QTLs para la resistencia a *X. arboricola* pv. *pruni*. Como resultado del análisis, se ha identificado un microsatélite (UDAp-452) relacionado con la resistencia a *X. arboricola* pv. *pruni*. Al dividir la población analizada según los alelos observados para este microsatélite, se observó que en aquellos individuos con el alelo favorable se produjo una reducción del 35.6% en la incidencia de la enfermedad (Socquet-Juglard *et al.*, 2013). En melocotonero, se estudió una población obtenida del cruce entre las variedades “O’Henry” y “Clayton”, a partir de la cual se detectaron 14 QTLs con efecto en la resistencia a *X. arboricola* pv. *pruni*, algunos asociados a la resistencia en hojas y otros a la resistencia en frutos, lo que sugiere una regulación de la resistencia independiente para cada órgano (Yang *et al.*, 2013).

### 1.3.9.3 Prácticas culturales

En primer lugar, es importante la elección del lugar donde se va a realizar el cultivo, teniendo en cuenta el tipo de suelo, ya que los suelos muy arcillosos que retienen mucha humedad favorecen el desarrollo de la enfermedad (Stefani, 2010), y es preciso evitar la cercanía a zonas infectadas por la posible diseminación del inóculo a cortas distancias. El riego y la fertilización son otros dos factores a tener en cuenta. Debe evitarse el uso de sistemas de riego que mantienen niveles de humedad elevados en las hojas, así como una fertilización excesiva, especialmente nitrogenada, ya que favorecen la infección. También es recomendable el uso de cortavientos para prevenir la diseminación de la bacteria a corta distancia por medio del viento y la lluvia (Pagani *et al.*, 1997).

Es fundamental la reducción del nivel de inóculo, tanto con el arranque de plantas infectadas como con la eliminación de restos de poda y hojas o frutos que hayan caído al suelo, ya que son potenciales fuentes de inóculo (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). Respecto a la poda, y particularmente en plantaciones de ciruelo, donde es más frecuente la aparición de chancros, la poda se debe realizar durante el invierno para eliminar las ramas que presenten claros síntomas de la enfermedad, mientras que en los meses de primavera y verano, solo es aconsejable podar si observan chancros recién formados (Stefani, 2010). Asimismo también es muy importante la desinfección de las herramientas de poda.

### 1.3.9.4 Control químico

El control químico está basado fundamentalmente en el uso de compuestos de cobre, que son los únicos autorizados en la UE y que se deben aplicar de forma

preventiva para reducir el nivel de inóculo en los árboles. Los productos fitosanitarios que contienen cobre deben cumplir los requisitos de seguridad establecidos en los artículos 5.1a y 5.1b de la Directiva 91/414/CEE. En los frutales del género *Prunus* solo están autorizadas un máximo de tres aplicaciones al año en función del estado fenológico del árbol, excepto en el caso del almendro, para el que no hay un límite estipulado de aplicaciones. Los momentos más recomendables para realizar los tratamientos son en primavera, antes de la floración, con el objetivo de reducir las poblaciones bacterianas y disminuir el riesgo de infecciones primarias, y en otoño, tras la caída de las hojas, para proteger las heridas de las axilas y evitar que las poblaciones de la bacteria se acumulen en las yemas para pasar el invierno. Además, también se puede realizar alguna aplicación durante el periodo vegetativo en caso de que se produzca un brote de la enfermedad (Stefani, 2010). También es recomendable realizar un tratamiento poco después de que se produzcan heridas en la planta, como por ejemplo tras la poda o después de una granizada, ya que esas heridas facilitan la entrada del patógeno (Lamichhane, 2014). Asimismo, hay que tener en cuenta que los tratamientos con cobre tienen escasa persistencia y solo son eficientes con las poblaciones epífitas debido a su baja capacidad de penetración (Lamichhane, 2014). Además de los problemas de acumulación del cobre en el medio ambiente, los principales inconvenientes del uso de estos productos es que su uso excesivo pueden generar resistencias por parte del patógeno (Lamichhane, 2014) y que pueden producir problemas de fitotoxicidad, especialmente en variedades sensibles de nectarino y ciruelo (Stefani, 2010).

Los compuestos cúpricos no son los únicos que se usan para el control de la mancha bacteriana, y por ejemplo el sulfato de zinc se ha usado con éxito en plantaciones de melocotonero en Uruguay (Leoni, 2004). También se recomienda

incluir productos derivados del azufre junto con el tratamiento con cobre como estrategia de control integrado en plantaciones en las que además de *X. arboricola* pv. *pruni* haya problemas de enfermedades fúngicas como el oídio (McLaren *et al.*, 2005).

Otra posible alternativa al uso de productos derivados del cobre es el uso de sustancias conocidas como fitofortificantes o inductores de resistencia adquirida, como por ejemplo los glucohumatos (Dallai *et al.*, 2012), aunque aún están en fase de desarrollo.

#### **1.3.9.5 Control biológico**

El hecho de que el uso de productos químicos esté cada vez más limitado en países de la UE, ha provocado un incremento en el estudio de potenciales agentes de biocontrol. Se han descrito varias cepas bacterianas con efecto antagonista sobre *X. arboricola* pv. *pruni*. En ensayos realizados en plantaciones de melocotonero y nectarino, se observó que una cepa de *Pseudomonas fluorescens* poseía un enorme potencial inhibitorio sobre *X. arboricola* pv. *pruni* dando lugar a una reducción en la incidencia de la enfermedad (Biondi *et al.*, 2009). Resultados parecidos se obtuvieron en ensayos realizados con una cepa de *P. aeruginosa* (Silva Vasconcellos *et al.*, 2014) y con esta cepa además, se observó un efecto sobre la producción de exopolisacárido del patógeno así como cambios en su morfología celular. También se ha estudiado la capacidad antagonista de dos cepas no patógenas de *X. campestris* (AZ98101 y AZ98106) en ensayos de campo sobre diversos cultivares de melocotonero, observándose una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad (Kawaguchi *et al.*, 2014). Actualmente se está evaluando en España la eficiencia de varias cepas de



*Lactobacillus plantarum* para el control biológico de esta enfermedad (Roselló *et al.*, 2014).

El uso de fagos como agentes de biocontrol de *X. arboricola* pv. *pruni* también ha sido descrito. Zaccardelli *et al.* (1994) comprobaron que ciertos fagos obtenidos en campos de melocotonero infectados, daban buenos resultados para el control de la enfermedad en melocotonero. Sin embargo, su uso a gran escala puede presentar una serie de inconvenientes, como su escasa supervivencia, su inhibición por parte de productos químicos utilizados habitualmente en el cultivo y la posibilidad de generar resistencia por parte del patógeno (Randhawa y Civerolo, 1986; Zaccardelli *et al.*, 1992).

#### **1.3.9.6 Modelos de predicción de riesgos**

Cada vez es más habitual que en las estrategias de control integrado de cualquier enfermedad se incluyan modelos de predicción. La enfermedad de la mancha bacteriana está muy influenciada por las condiciones climáticas (Battilani *et al.*, 1999) y por tanto, el momento en el que se puede producir la infección se puede predecir en función de una serie de parámetros medioambientales. En Francia ya se ha desarrollado un modelo de predicción para melocotonero (Garcin *et al.*, 2011), que funciona bien para predecir infecciones primarias, pero no resulta del todo preciso para infecciones secundarias. Además, estos modelos deberían probarse durante varios años y en varias especies de *Prunus*. En España, ya están en marcha en la Universitat de Girona los ensayos para el desarrollo de un modelo de predicción (Morales *et al.*, 2016).

### **1.3.9.7 Control integrado**

El Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, en su Guía de Gestión Integrada de Plagas, Enfermedades y Malas Hierbas (GIP) de frutales de hueso (MAGRAMA, 2015b) recomienda una estrategia de control integrado para la mancha bacteriana. Es necesario realizar un seguimiento y estimación de riesgo para el cultivo, y al ser un patógeno de cuarentena, la legislación obliga a comunicar a las autoridades competentes la presencia de síntomas sospechosos. Las nuevas plantaciones deben proveerse del material vegetal en un vivero autorizado y con el correspondiente pasaporte fitosanitario CE, además de evitar variedades sensibles, especialmente si la plantación se va a realizar en una zona con elevada humedad ambiental. Asimismo, se recomiendan una serie de prácticas culturales, como la poda, adecuada para lograr una mayor aireación de la plantación, la fertilización nitrogenada, la eliminación de la madera infectada y la desinfección de las herramientas de poda y la maquinaria utilizada. Al no existir un umbral de intervención, las actuaciones fitosanitarias deben realizarse de forma preventiva, acentuándose en caso de que se produzca un periodo de lluvias. Para el control químico, el uso de productos preventivos en otoño y hasta la floración es fundamental para limitar la proliferación de la bacteria y reducir la cantidad de inóculo, y solo se podrán utilizar productos fitosanitarios autorizados en el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

## **Capítulo 2**

### **Justificación y objetivos**



## Justificación y objetivos

La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro se considera que es una enfermedad emergente en España, ya que desde 2002 se han identificado numerosos brotes repartidos por distintas comunidades autónomas en las principales regiones productoras del país. Se han tomado las medidas de erradicación oportunas, por lo que se sigue considerando como una enfermedad aún no establecida en este país. Para que esta situación se mantenga, es fundamental mejorar las técnicas de diagnóstico, que permitan la detección rápida y precisa de su agente causal, *X. arboricola* pv. *pruni*, así como conocer su diversidad, vías de entrada y diseminación, y distinguirlo de otras especies de *Xanthomonas* presentes en plantas del género *Prunus*.

Por tanto, en esta tesis se han planteado los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un prototipo de tiras de flujo lateral para la detección *in situ* de *X. arboricola* pv. *pruni* en muestras de campo sintomáticas.
2. Desarrollar un esquema de MLVA adecuado para evaluar la diversidad genética de una colección de cepas españolas de *X. arboricola* pv. *pruni* que nos permita establecer las relaciones existentes entre ellas y conocer las posibles introducciones que han podido tener lugar en España.
3. Caracterizar taxonómicamente cepas de *Xanthomonas* aisladas en nectarino cuyas características fenotípicas y moleculares no coinciden con ninguna de las especies de este género descritas hasta ahora.



## **Capítulo 3**

**Inmunoensayo de flujo lateral para la detección  
*in situ* de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en  
muestras de campo sintomáticas**





## **Lateral flow immunoassay for on-site detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in symptomatic field samples**

Pablo López-Soriano\*<sup>1</sup>, Patricia Noguera<sup>2</sup>, María Teresa Gorris<sup>1</sup>, Rosa Puchades<sup>2</sup>, Ángel Maquieira<sup>2</sup>, Ester Marco-Noales<sup>1</sup> and María M. López<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Protección Vegetal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Departamento de Química. Universitat Politècnica de València, Spain.

\* Pablo López-Soriano has contributed in the design of the experiments, in the collection of field samples, preparing leaf extracts, performing specificity and sensitivity assays, the analyses of field samples by LFIA, plate isolation and real time PCR and writing the first version of the manuscript.

*PLoS ONE* (2017), **12**(4): e0176201

### 3.1 Abstract

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* is a quarantine pathogen and the causal agent of the bacterial spot disease of stone fruits and almond, a major threat to *Prunus* species. Rapid and specific detection methods are essential to improve disease management, and therefore a prototype of a lateral flow immunoassay (LFIA) was designed for the detection of *X. arboricola* pv. *pruni* in symptomatic field samples. It was developed by producing polyclonal antibodies which were then combined with carbon nanoparticles and assembled on nitrocellulose strips. The specificity of the LFIA was tested against 87 *X. arboricola* pv. *pruni* strains from different countries worldwide, 47 strains of other *Xanthomonas* species and 14 strains representing other bacterial genera. All *X. arboricola* pv. *pruni* strains were detected and cross-reactions were observed only with four strains of *X. arboricola* pv. *corylina*, a hazelnut pathogen that does not share habitat with *X. arboricola* pv. *pruni*. The sensitivity of the LFIA was assessed with suspensions from pure cultures of three *X. arboricola* pv. *pruni* strains and with spiked leaf extracts prepared from four hosts inoculated with this pathogen (almond, apricot, Japanese plum and peach). The limit of detection observed with both pure cultures and spiked samples was  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>. To demonstrate the accuracy of the test, 205 samples naturally infected with *X. arboricola* pv. *pruni* and 113 samples collected from healthy plants of several different *Prunus* species were analyzed with the LFIA. Results were compared with those obtained by plate isolation and real time PCR and a high correlation was found among techniques. Therefore, we propose this LFIA as a screening tool that allows a rapid and reliable diagnosis of *X. arboricola* pv. *pruni* in symptomatic plants.

## 3.2 Introduction

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* is the causal agent of bacterial spot disease of stone fruits and almond. It affects a wide range of *Prunus* species including peach (*P. persica*), plum (*P. salicina*), almond (*P. amygdalus*, syn. *P. dulcis*), apricot (*P. armeniaca*), and cherry (*P. avium*), as well as ornamental plants such as *P. davidiana* and *P. laurocerasus* (Roselló *et al.*, 2012; Tjou-Tam-Sin *et al.*, 2014). It is considered one of the most important bacterial pathogens affecting this group of species, causing substantial losses in susceptible cultivars (López *et al.*, 2010; Pothier *et al.*, 2011a). In fact, it is listed as a quarantine organism in the EU phytosanitary legislation (EU Council Directive 2000/29/EC), and on the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) list. *X. arboricola* pv. *pruni* was first described in North America in 1903 on Japanese plum (Smith, 1903), and it has later been reported in the main stone fruit producing areas worldwide. In Europe, the disease was first reported in 1920 in Italy, where it is now considered endemic (Battilani *et al.*, 1999), and in the last decade it has emerged in France, the Netherlands, Spain, Switzerland, and some countries of Eastern Europe (López *et al.*, 2012). In Spain, *X. arboricola* pv. *pruni* was first detected in 2002 on Japanese plum, and since then several outbreaks have occurred in different Spanish regions, in both commercial orchards and nurseries, on different *Prunus* species (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). Suitable diagnostic protocols, as well as effective control measures, are required to prevent the introduction and dissemination of this quarantine pathogen (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011).

The main symptoms of bacterial spot disease of *Prunus*, observed on leaves, include necrotic and angular spots that may drop out giving a 'shot-hole' appearance to the leaf. On fruits, sunken lesions are typical and gum flow may

occur, especially after hail lesions or rainy days or periods of high humidity. Twig lesions have a dark, slightly depressed, and water-soaked appearance, and may progress to dieback (EPPO, 2006; Roselló *et al.*, 2012). Symptoms caused by *X. arboricola* pv. *pruni* are relatively similar to those caused in stone fruits by other bacterial species such as *Pseudomonas syringae* pv. *mors-prunorum*, *P. syringae* pv. *persicae*, *P. syringae* pv. *syringae*, and *P. viridiflava*, and by some fungi, viruses or abiotic factors, thereby increasing the need for an effective diagnosis that allows rapid and accurate detection of the pathogen (López *et al.*, 2012). Currently, the only international regulation concerning the diagnosis of bacterial spot disease is an EPPO standard from 2006 (EPPO, 2006), which is based on the isolation of the pathogen in agar media and subsequent identification through biochemical tests, protein profiling (SDS-PAGE), fatty acid profiling (FAME), immunofluorescence (IF), and pathogenicity tests. All these techniques are effective and reliable, but also laborious and time-consuming. Although molecular methods are not included in the EPPO standard protocol, they are very useful for the specific detection of *X. arboricola* pv. *pruni*. The first PCR protocol targeting *X. arboricola* pv. *pruni* was developed by Pagani (2004) and recently several new protocols of PCR (Park *et al.*, 2010), duplex PCR (Pothier *et al.*, 2011c), multiplex PCR (Pothier *et al.*, 2011a), real time SYBR Green I assay and Bio-PCR (Ballard *et al.*, 2011), and real time TaqMan PCR (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011) have been published. Compared to conventional methods, these molecular techniques are more sensitive and reproducible, although they also present some drawbacks, since expensive equipment and qualified personnel are required.

Lateral flow immunoassay (LFIA), widely employed in the diagnosis of plant pathogens, is considered as an efficient tool used for 'point-of-care' or 'in-field' pathogen detection (Boonham *et al.*, 2008). An LFIA typically consists of a

nitrocellulose membrane strip on which pathogen-specific antibodies are immobilized. These specific antibodies are bound to nanoparticles that are often made of colloidal gold, latex or silica to facilitate visual detection (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; De Boer and López, 2012).

LFIA has been used for different purposes, including diagnosis of human diseases, detection of toxic compounds in food, pregnancy tests, and in environmental settings (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). Their use in phytopathology was focused mostly on fungi (Thornton *et al.*, 2004; Lane *et al.*, 2007) and viruses (Safenkova *et al.*, 2012; 2016), although it has been extended to the specific detection of bacteria such as *Erwinia amylovora* (Braun-Kiewnick *et al.*, 2011), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Safenkova *et al.*, 2014), and *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Hodgetts *et al.*, 2015). LFIA offers several advantages over traditional techniques used in routine diagnostic procedures, such as its low cost, simplicity of use, and long shelf life; moreover, results are obtained within 10 minutes and tests can be performed on site by minimally trained staff (Boonham *et al.*, 2008; Noguera *et al.*, 2011; De Boer and López, 2012). It has become a reliable tool for the rapid screening of suspicious samples.

A wide range of nanoparticles can be used for LFIA and, among them, carbon nanoparticles have characteristics that make them a good alternative to other particles used in diagnostic applications (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). They can be conjugated to a variety of biomolecules such as DNA, antibodies, and other proteins, thus allowing the detection of a variety of analytes. Moreover, they are economical and stable over time, and conjugates are easy to prepare (with no need for activation) and usually generate sensitive LFIA immunoassays (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). Moreover, background noise is minimal (since

there is little non-specific binding to the carbon particles, thus increasing the signal) and LFIA strips can be interpreted easily by visual inspection (a black line on a white background). For these reasons carbon nanoparticles were selected to manufacture the prototype of LFIA strips described in this work.

The aim of this study was to develop and validate a simple, rapid, and reliable lateral flow immunoassay for the detection of *X. arboricola* pv. *pruni* in field samples. A lateral flow device prototype was designed and polyclonal antibodies against *X. arboricola* pv. *pruni* were generated and conjugated with carbon nanoparticles. Specificity and sensitivity of the new device were determined, and finally it was compared with standard diagnostic methods in field samples.

### **3.3 Materials and methods**

#### **3.3.1 Bacterial strains and growth conditions**

The bacterial strains used in this study are listed in S3.1 Table. To determine LFIA sensitivity, *X. arboricola* pv. *pruni* strains IVIA 2626.1, IVIA 3162.1, and IVIA 4430 were used for *in vitro* assays. The strain IVIA 3162.1 was selected for preparing spiked samples in leaf extracts. All bacteria were routinely grown on yeast peptone glucose agar (YPGA) medium (Ridé, 1969) (yeast extract 5 g l<sup>-1</sup> [Difco], bacteriological peptone 5 g l<sup>-1</sup> [Difco], glucose 10 g l<sup>-1</sup> and agar 20 g l<sup>-1</sup> [pH 7.1]), and incubated at 25°C for 48 h.

### **3.3.2 Production and characterization of the antisera against *X. arboricola* pv. *pruni*.**

#### **3.3.2.1 Preparation of antigens**

Bacterial antigens were generated with the *X. arboricola* pv. *pruni* Spanish strain IVIA 2626.1. Bacterial cultures were grown for 48 h on YPGA medium, and suspensions of  $10^9$  CFU ml<sup>-1</sup> in 10mM phosphate-buffered saline (PBS) were used to prepare antisera from two types of antigens, whole cells (WC) and heat-treated cells (HT). Heat-treated cells were obtained by incubating 1 ml aliquots of the suspensions at 100°C for 10 min.

#### **3.3.2.2 Antiserum production and characterization**

Two antisera (2626.1-WC and 2626.1-HT) were prepared. Female rabbits (Californian-New-Zealander cross) ca. 2 kg in weight were injected intramuscularly weekly for 4 weeks with 2 ml of a 1:1 emulsion of bacterial antigen with Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The animals were bled 3 days after the final injection. The antisera were mixed with 50% of glycerol, sterilized by filtration, and stored at -80°C. Titers of 1:20000 and 1:80000 were determined by indirect-ELISA (Cambra and López, 1978) for 2626.1-WC and 2626.1-HT, respectively.

#### **3.3.2.3 Ethics statement**

The rabbits used to produce the antibodies described here were housed and handled at the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) in 2003 in accordance with the European legislation regarding animal welfare in research at that moment (Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations, and administrative provisions of the Member

States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes).

At the time when the experiments were performed, no animal Ethics Committee could review the protocol because such committees had not yet been created in our country. However, the protocols and experiments described in the paper were reviewed and approved by the former IVIA director and researchers with experience in the area at that time.

At the end of the experiment, animals were kept alive according to the requirements of the Council Directive 86/609/ECC for their use in subsequent experiments, and they received appropriate care under the supervision of a competent specialist.

### **3.3.3 Lateral flow immunoassay**

The reagents used to manufacture the carbon conjugate and LFIA strips were:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  and Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany);  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ , bovine serum albumin (BSA) (A2153), and polyclonal anti-rabbit antiserum IgG (R5506) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Antibodies were purified prior to their use with Hitrap GHP columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's instructions.

#### **3.3.3.1 Carbon conjugate**

Carbon nanoparticles were conjugated with polyclonal 2626.1-WC antibodies following a previously described methodology (O'Keefe *et al.*, 2003; Noguera *et al.*, 2011). Briefly, 10 mg of carbon nanoparticles (Spezial Schwartz 4, Degussa AG,



Frankfurt, Germany) were suspended in 1 mL of MilliQ water and sonicated for 5 min (Branson model 250 Sonifier, Danbury, CT, USA). The resulting 1% (w/v) carbon suspension was diluted fivefold in borate buffer (BB) 5 mM pH 8.8 and sonicated for 5 min. Next, 350  $\mu$ g 2626.1-WC antibody was added to 1 mL of the diluted carbon suspension and the mixture was stirred for 3 h at room temperature. This suspension was first centrifuged at 14000 g for 15 min and the supernatant was removed. Then the pellet was washed with 1 ml of washing buffer (WB, 5 mM BB with 1% (w/v) BSA) to eliminate unbound protein. The mixture was centrifuged at 14000 g for 15 min at room temperature, the supernatant was removed, and the pellet was resuspended in 1 mL of WB. This process was repeated twice. After the final washing, the pellet was resuspended in 1 mL of 100 mM BB with 1% (w/v) BSA and stored at 4°C until use. The resulting homogeneous carbon nanoparticle suspension (CNP) contained 0.2% (w/v) carbon conjugate.

### 3.3.3.2 LFIA strips

A test line of 2626.1-HT antibody (0.2 mg/mL) was dispensed with a Biodot AD 1500 dispenser (Biodot, Irvine, California, USA) on a nitrocellulose (NC) membrane (HiFlow Plus HFB135, Millipore, Billerica, MA, USA). In order to validate the correct performance of lateral flow tests, a control line of an anti-rabbit antibody (0.5 mg/mL) was also dispensed onto the same NC strip, 5 mm from the first line of antibodies. Both immunoreagents were deposited on the NC membrane at a concentration of 1  $\mu$ L/5 mm (diluted in 5 mM BB). After drying the NC membranes overnight at 37°C, they were fixed on plastic backing cards coated with a pressure-sensitive adhesive (G&L, Glen Rock, PA, USA) along with a cellulose absorbent pad (Schleicher and Schuell, 's-Hertogenbosch, the Netherlands). Finally, strips were cut to a length of 6 cm and a width of 5 mm using a Bio-Dot Cutter CM4000

(Irvine, CA, USA), and stored inside a desiccation chamber (in the dark) at room temperature until use.

### 3.3.3.3 LFIA assays

Wells of low-binding 96-well microplates (Nunc, MicroWell, Thermo Scientific, Madrid, Spain) were used to perform the LFIA assays. In each well, 1  $\mu$ l of bacterial suspension was introduced along with 99  $\mu$ l of a dilution of the carbon nanoparticle suspension (0,2% CNP diluted 1/100 with 100 mM BB containing 1% (w/v) BSA and 0.05% (v/v) Tween 20, and then sonicated for 15 seconds). After mixing the contents of the well, a strip was dipped in the well and left to stand vertically. This allowed the reagents to move upwards through the strip by capillary force and to react with the *X. arboricola* pv. *pruni* or rabbit antibodies. Strips were examined visually after 10 min; a positive result (+, presence) was recorded when the test line was distinguishable from the background by the naked eye, and a negative result (–, absence) was noted when no line was seen.

### 3.3.4 Specificity assays

The specificity of the LFIA was determined using 87 *X. arboricola* pv. *pruni* strains, isolated in nine countries worldwide (Argentina, Australia, Brazil, Canada, France, Italy, New Zealand, Spain, and United States) and conserved in international collections. Strains were obtained from different hosts including almond (*P. amygdalus*, syn. *P. dulcis*), apricot (*P. armeniaca*), European plum (*P. domestica*), Japanese plum (*P. salicina*), nectarine (*P. persica* var. *nectarina*), peach (*P. persica*), and the hybrid *P. persica* x *P. dulcis*. In addition, 21 strains of *X. arboricola* of three other pathovars (*corylina*, *fragariae*, and *juglandis*), 26 strains

of other *Xanthomonas* species (*X. alfalfae* pv. *citrumelonis*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. citri*, subsp. *citri* and *Xanthomonas* sp.), and 14 strains representing other species from different bacterial genera also pathogenic to stone fruit were included in the specificity assay. Bacterial cells from a 48 h culture in YPGA medium were resuspended in 10 mM phosphate buffered saline (PBS) at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. Tests with LFIA were performed as described above (LFIA assay section). Bacterial suspensions were heat treated at 95°C for 10 min and tested again. Assays were repeated twice.

### 3.3.5 Sensitivity assays

Sensitivity was determined using serial 10-fold dilutions of PBS suspensions of three *X. arboricola* pv. *pruni* strains (IVIA 2626.1, IVIA 3162.1, and IVIA 4430) at a range of concentrations from 10 to  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. Dilutions were heat treated at 95°C for 10 min and sensitivity was tested again. Additionally, sensitivity was evaluated in spiked samples, created by adding dilutions of the strain IVIA 3162.1 in leaf extracts of almond, apricot, Japanese plum, and peach. Extracts were prepared in accordance with Palacio-Bielsa *et al.* (2011), i.e., by washing approximately 1 g fresh weight of mature, pathogen-free leaves with 15 ml of PBS in sterile plastic bags at room temperature for 15 min. Aliquots of 1 ml of each extract were inoculated with the strain at the same range of concentrations used for the pure cultures. Tests with LFIA were performed as described above, and the limit of detection was determined as the lowest concentration that produced a visible positive test line. Experiments were performed twice.

### **3.3.6 Comparison of LFIA with plate isolation and real time PCR for detection of *X. arboricola* pv. *pruni* in naturally infected samples**

Plant samples included in these analyses were collected in 2012 and 2013 from different stone fruits producing areas in Spain. The bacterial strains used in this study were obtained from samples received at the Laboratory of Reference (IVIA) of the Spanish Ministry of Agriculture. Symptomatic samples were processed in accordance with the EPPO protocol (EPPO, 2006) with some modifications. On peach and apricot fruits, 1 cm<sup>2</sup> pieces of tissue from the margin of the lesion were comminuted in small particles using sterile scalpels in sterile Petri dishes with 4.5 ml of PBS, and the suspension was left to stand for 1-2 min at room temperature. Almond fruits were washed in sterile plastic bags with 15 ml of PBS (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012) for 5-15 min. Leaf samples were processed alternatively by washing approximately 1 g of fresh weight of leaves in 15 ml of PBS for 15 min, or cutting small pieces having 2-3 necrotic spots, in 4.5 ml of PBS in sterile Petri dishes and leaving them to stand for 5-15 min.

In addition, samples collected from healthy plants in zones having no history of *X. arboricola* pv. *pruni* were included in the analysis. Plant material consisted of leaves of almond, apricot, Japanese plum, peach, peach rootstock GF-305, *Prunus laurocerasus*, and the hybrid GF-677 (*P. dulcis* x *P. persica*). Healthy almond fruits were also included. All these samples were processed by washing as described above.

Two aliquots (1 ml each) were removed from each sample to use in parallel LFIA and bacterial cultivation. The remainder was stored at -20°C until it was used for real time PCR. Plate isolation was performed by streaking 50 µl of the extract on YPGA, and checking for the presence of suspected colonies after 48-72 h

incubation at 25°C, which were then identified by PCR using the protocol described below.

Real time PCR assays were performed using Xap-2F (5'- TGG CTT CCT GAC TGT TTG CA- 3') and Xap-2R (5'- TCG TGG GTT CGC TTG ATG A- 3') primer set, in combination with the TaqMan probe Xap-2P (5'- 6-carboxyfluorescein [FAM]- TCA ATA TCT GTG CGT TGC TGT TCT CAC GA- 6-carboxytetramethylrhodamine [TAMRA]- 3') (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011), using a Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Germany). The reaction mix contained: 2.5 µl sample, 0.4 µM each primer, 12.5 µl master mix (QuantiMix Easy Probes kit, Biotools, Madrid, Spain), and 150 nM TaqMan probe in a final volume of 25 µl. Real time PCR conditions were: an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 45 cycles, each one consisting of 1 min at 95°C and 1 min at 59°C. The expected product was a DNA fragment of 72 bp as indicated in Palacio-Bielsa *et al.* (2011). Appropriate negative controls including non-spiked leaf extracts of the four plant hosts, and master-mix-only samples were used in all reactions. Heat-treated suspensions of the strain IVIA 3162.1 at  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> were included as positive controls.

In order to compare the results of the different diagnostic methods used in this study, and to evaluate the usefulness of the LFIA as a new diagnostic tool, contingency tables were calculated. Results obtained with the LFIA were compared independently with those obtained by plate isolation and real time PCR, both of which are considered 'gold standard' methods (Braun-Kiewnick *et al.*, 2011), and parameters such as diagnostic specificity, diagnostic sensitivity, false positive and negative ratings, and relative accuracy were calculated in accordance with Olmos *et al.* (2008) and the EPPO standards PM 7/98(2) (EPPO, 2014).

## 3.4 Results

### 3.4.1 Specificity assays

To assess the specificity of the LFIA, a wide range of *Xanthomonas* species and other bacterial species were tested. The 87 *X. arboricola* pv. *pruni* strains, representing isolates from nine countries and seven hosts, were detected. Cross-reactions were observed only with four strains of *X. arboricola* pv. *corylina* (CFBP 1846, R1PF-X10, R1PF-X18, and R1PF-X23), a hazelnut pathogen not reported in stone fruit or almond trees. All the other *Xanthomonas* strains tested were negative, as were the rest of the bacterial species included in the assay (Table 1). Exactly the same results were obtained with the heat-treated bacterial suspensions.

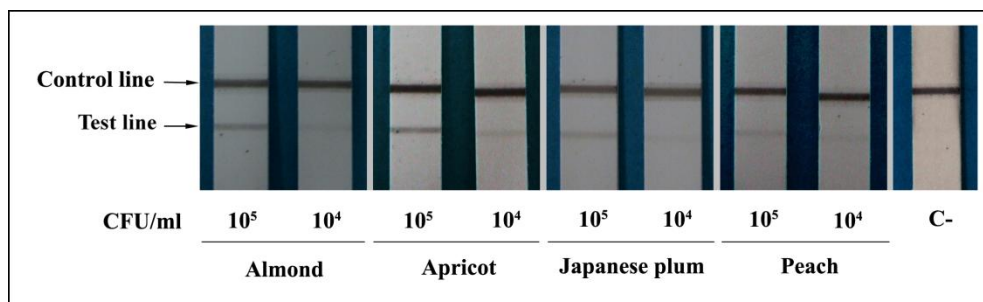
**Table 1. Specificity of the lateral flow immunoassay (LFIA) against strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (n = 87), other *Xanthomonas* species (n = 47), and other bacterial species related with stone fruits (n = 14).**

Species	Host	LFIA (Positive samples/Total samples)
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus</i> spp.	87/87
<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	<i>Corylus avellana</i>	4/6
<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>	<i>Fragaria</i> spp.	0/2
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	<i>Juglans regia</i>	0/11
<i>X. arboricola</i>	<i>P. persica</i>	0/2
<i>X. alfalfae</i> pv. <i>citrumelonis</i>	<i>C. paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	0/1
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0/1
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i>	0/2
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>Citrus sinensis</i>	0/12
<i>Xanthomonas</i> sp.	<i>Capsicum annum</i> / <i>Prunus</i> spp.	0/10
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Prunus</i> spp.	0/5
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Olea europea</i>	0/1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Several	0/3
<i>P. syringae</i>	Several	0/4
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidae</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	0/1

### 3.4.2 Sensitivity assays

The sensitivity of the LFIA was first tested using serial dilutions from pure cultures of several *X. arboricola* pv. *pruni* strains (IVIA 2626.1, IVIA 3162.1, and IVIA 4430) obtaining a limit of detection of  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>. On comparing heat-treated and untreated suspensions no differences were observed. In addition, sensitivity was

also assessed in spiked samples, in which serially diluted suspensions of the strain IVIA 3162.1 were added to leaf extracts of almond, apricot, Japanese plum, and peach. Sensitivity, expressed as the lowest amount of pathogen detected, was the same in the four hosts. In all of them, the limit of detection was  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup> (Fig 1), the same as that obtained with pure cultures. Nevertheless, suspensions having titers lower than  $10^5$  CFU ml<sup>-1</sup> showed weak positive test lines, which became more obvious after the membranes were dried.



**Fig 1. Sensitivity of the lateral flow immunoassay in spiked samples.** Plant extracts of four *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* hosts were inoculated with serially diluted suspensions of the strain IVIA 3162.1. Bacterial concentrations are indicated as CFU ml<sup>-1</sup>. A non-spiked negative control is indicated as C-.

### 3.4.3 Comparison of LFIA with plate isolation and real time PCR for detection of *X. arboricola* pv. *pruni* in naturally infected plant samples

A total of 205 symptomatic samples collected from three *Prunus* species (almond, peach, and apricot) showing typical *X. arboricola* pv. *pruni* symptoms were analyzed in the laboratory with both 'gold standard' (plate isolation and real time



PCR methods) and also tested with the LFIA (Table 2). Almond and peach samples included both symptomatic fruits and leaves, whereas apricot samples consisted only of fruits. All these symptomatic samples gave a positive identification by plate isolation and real time PCR, whereas eight were negative by LFIA (five almond leaves, one peach leaf, and two apricot fruits).

**Table 2. Comparison of lateral flow immunoassay (LFIA), plate isolation and real time PCR for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in naturally infected plant samples.**

Host	Organ	Positive samples / Total samples		
		Plate isolation	Real time PCR	LFIA
<b>Almond</b>	Fruit	31/31	131/131	131/131
	Leaf	38/38	38/38	33/38
<b>Peach</b>	Fruit	20/20	20/20	20/20
	Leaf	10/10	10/10	9/10
<b>Apricot</b>	Fruit	6/6	6/6	4/6
<b>Total</b>		<b>105/105</b>	<b>205/205</b>	<b>197/205</b>

Additionally, in order to calculate the diagnostic parameters of the LFIA, 113 samples collected from healthy plants of seven *Prunus* species or hybrids were also processed with the three methods. All the samples from healthy plants were negative with the three methodologies (Table 3).

**Table 3. Comparison of lateral flow immunoassay (LFIA), plate isolation and real time PCR for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in asymptomatic samples collected from healthy plants.**

Host	Organ	Positive samples / Total samples		
		Plate isolation	Real time PCR	LFIA
<b>Almond</b>	Fruit	0/10	0/10	0/10
	Leaf	0/20	0/20	0/20
<b>Peach</b>	Leaf	0/15	0/15	0/15
<b>Apricot</b>	Leaf	0/15	0/15	0/15
<b>Japanese plum</b>	Leaf	0/18	0/18	0/18
<b>GF-305</b>	Leaf	0/10	0/10	0/10
<b>GF-677</b>	Leaf	0/15	0/15	0/15
<b><i>Prunus laurocerasus</i></b>	Leaf	0/10	0/10	0/10
<b>Total</b>		<b>0/113</b>	<b>0/113</b>	<b>0/113</b>

Results obtained with LFIA were compared with those obtained with real time PCR (Table 4). Out of 318 samples processed, 197 were positive by LFIA, whereas 205 were positive using the real time PCR. All the samples collected from healthy plants were negative by both techniques. Thus, a diagnostic specificity of 100% and diagnostic sensitivity of 96.1% were obtained when comparing both techniques, with a low rate of false negatives (3.9%). False positives were not detected in our samples. The relative accuracy obtained between techniques was 97.5%. Other diagnostic parameters calculated are shown in Table 4.

**Table 4. Contingency table comparing lateral flow immunoassay (LFIA) with real time PCR for *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* detection in samples of naturally infected and healthy plants. The upper part shows the positive and negative results for each technique. The diagnostic parameters corresponding to these results are shown in the lower part.**

		Real time PCR		
		Positive	Negative	Total
<b>Lateral flow immunoassay</b>	Positive	197	0	197
	Negative	8	113	121
	Total	205	113	318
<b>Diagnostic parameters<sup>a</sup></b>	Diagnostic sensitivity			96.1%
	Diagnostic specificity			100%
	Positive predictive value			100%
	Negative predictive value			93.4%
	False positive rate			-
	False negative rate			3.9%
	Prevalence rate			64.5%
	Likelihood ratio for positive results			-
	Likelihood ratio for negative results			0.04
Relative accuracy			97.5	

<sup>a</sup> Diagnostic parameters calculated in accordance with Olmos *et al.* (2008) and the EPPO standards PM 7/98(2) (EPPO, 2014) are shaded in orange

The LFIA was also compared to plate isolation (Table 5). Out of 218 samples included, 97 were positive using the LFIA and 105 were positive by plate isolation. All samples obtained from healthy plants were also negative by plate isolation. The diagnostic sensitivity of the LFIA compared to isolation was slightly lower (92.4%) than the one previously obtained when comparing the LFIA with the real

time PCR (96.1%), whereas diagnostic specificity was also 100%. The false negative rate obtained was 7.6% and no false positives were detected. Relative accuracy between LFIA and plate isolation was 96.3%. As before, other parameters calculated are shown in Table 5.

**Table 5. Contingency table comparing lateral flow immunoassay (LFIA) with plate isolation for *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* detection in samples of naturally infected and healthy plants. The upper part shows the positive and negative results for each technique. The diagnostic parameters corresponding to these results are shown in the lower part.**

		Plate isolation		
		Positive	Negative	Total
<b>Lateral flow immunoassay</b>	Positive	97	0	97
	Negative	8	113	121
	Total	105	113	218
<b>Diagnostic parameters<sup>a</sup></b>	Diagnostic sensitivity			92.4%
	Diagnostic specificity			100%
	Positive predictive value			100%
	Negative predictive value			93.4%
	False positive rate			-
	False negative rate			7.6%
	Prevalence rate			48.2%
	Likelihood ratio for positive results			-
	Likelihood ratio for negative results			0.08
Relative accuracy			96.3	

<sup>a</sup> Diagnostic parameters calculated in accordance with Olmos *et al.* (2008) and the EPPO standards PM 7/98(2) (EPPO, 2014) are shaded in orange.

### 3.5 Discussion

Bacterial spot disease is considered one of the main bacterial diseases affecting *Prunus* species and effective management strategies may cause a considerable decrease in disease incidence. Development of rapid diagnostic methods for reliable detection of *X. arboricola* pv. *pruni*, the causal agent of this major disease, is essential to prevent its dissemination and establishment into new areas. The LFIA developed in this study provides an alternative diagnostic test that combines the advantages of enough specificity and sensitivity, low cost, and rapid and simple operation, which make it especially appropriate for on-site analysis of symptomatic *Prunus* field samples.

The LFIA was shown to be specific to *X. arboricola* pv. *pruni*, detecting all strains representing a worldwide collection. Cross-reactivity was observed only with four strains of *X. arboricola* pv. *corylina*, which is the causal agent of the bacterial blight of hazelnut (Lamichhane and Varvaro, 2014). This pathogen is phylogenetically highly related to *X. arboricola* pv. *pruni* (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015) and in fact, primers designed for *X. arboricola* pv. *pruni* have been used for the identification of the pathovar *corylina*, since strains of this pathovar also amplify with them (Pothier *et al.*, 2011c). Interestingly, as *X. arboricola* pv. *corylina* has never been reported in *Prunus* species, the antibodies generated against *X. arboricola* pv. *pruni* can still be used for the detection of the bacterial spot pathogen in *Prunus* spp. None of the other bacteria tested were detected, including the rest of the *X. arboricola* strains and other bacterial species commonly isolated in stone fruits, thereby confirming the specificity of LFIA for the purpose of this work.

The detection limit obtained with the lateral flow immunoassay was  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup> both in pure cultures and spiked samples, a level that is sufficient to detect *X. arboricola* pv. *pruni* in symptomatic samples, in which bacterial populations are typically higher than  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011; Bühlmann *et al.*, 2013; Garita-Cambronero *et al.*, 2017). This limit is similar to that reported with other lateral flow devices designed for the detection of bacterial pathogens, such as *X. campestris* pv. *musacearum* (Hodgetts *et al.*, 2015) or *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Safenkova *et al.*, 2014), but better than the one obtained for *E. amylovora* (Braun-Kiewnick *et al.*, 2011). In addition, in our hands the use of an available commercial kit (Pocket Diagnostic, Sand Hutton, York, UK) for on-site detection of *X. arboricola* pv. *pruni* revealed a limit of detection of  $10^5$  CFU ml<sup>-1</sup>, which is lower than the one obtained with the prototype described in this study. Although  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup> can be considered a low sensitivity, it is enough for detection in symptomatic samples, which is the objective of our development.

The similarity between the detection limit obtained with pure cultures and that obtained with spiked samples suggests that there is no significant influence of the plant material in the sensitivity of the immunoassay. Leaf extracts of different *Prunus* species (almond, apricot, Japanese plum, and peach) were tested and no significant differences were found among them, demonstrating a general usefulness of LFIA for *X. arboricola* pv. *pruni* detection in all hosts. Unlike the limit of detection obtained with LFIA, other methods such as conventional PCR and real time PCR have lower sensitivity when used with Japanese plum samples compared to those of other hosts (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011; López *et al.*, 2012), probably due to the presence of inhibitors in Japanese plum extracts. This may indicate that LFIA is not affected by the presence of potential inhibitors, like

phenolic compounds, in leaf extracts, which is an advantage over other *X. arboricola* pv. *pruni* detection methodologies.

Heat-treated suspensions were also detected at the same sensitivity as with living bacteria, suggesting heat stability of the epitopes which can be detected by the antibodies obtained in this study. The use of this type of suspension facilitates the handling of this quarantine pathogen in some countries.

The LFIA was compared with two standard methodologies typically used for the detection and identification of *X. arboricola* pv. *pruni*, such as plate isolation and real time PCR. Diagnostic specificity of the LFIA was the same (100%) when compared to the other two techniques, whereas diagnostic sensitivity of the LFIA compared to plate isolation (92.4%) was slightly lower than the one obtained when compared to real time PCR (96.1%). However, the comparison of LFIA with plate isolation was based on only 105 naturally infected samples, due to the fact that isolation could not be performed in 100 almond fruits. This difference in the total number of samples analyzed by plate isolation compared to the total number of samples tested by real time PCR and LFIA could explain the lower diagnostic sensitivity of the LFIA with respect to plate isolation. Furthermore, having fewer samples analyzed by plate isolation probably contributed to the false negative rate obtained (7.6%) in contrast to that obtained when comparing LFIA to real time PCR (3.9%).

Although our results showed that all the samples were positive after plate isolation, it should be noted that colony appearance and/or counting may be hampered by the overgrowth of colonies of saprophytic bacteria commonly isolated from field samples. Additionally, plate isolation only detects culturable bacteria, whereas LFIA and real time PCR both detect dead and putative viable but

non culturable (VBNC) bacteria. This state has been described in different *Xanthomonas* species such as *X. campestris* pv. *campestris* (Ghezzi and Steck, 1999) and *X. citri* subsp. *citri* (Del Campo *et al.*, 2009; Golmohammadi *et al.*, 2013). *X. arboricola* pv. *pruni* cells are also very likely to enter into the VBNC state, potentially leading to an advantage of the LFIA over plate isolation.

Naturally infected samples used in this study included different plant species and different plant tissues, i.e., leaves (almond and peach) and fruits (peach, apricot, and almond). Samples that gave negative results by LFIA (n = 8) belonged to the different plant species analyzed (five from almond, two from apricot, and one from peach), suggesting the absence of any correlation between hosts and negative results.

Additionally, 113 samples collected from healthy plants, also processed by the three methodologies, all tested negative, thus confirming the absence of false positives.

A comparison of the relative accuracy obtained between LFIA and real time PCR (97.5%) and LFIA and plate isolation (96.3%) demonstrates a strong correlation between techniques. Moreover, the lateral flow immunoassay allows minimally trained users to obtain reliable results in less than 15 minutes and, unlike plate isolation and real time PCR, it can be used directly in the field as an initial screening tool to rule out other bacterial or fungal diseases causing similar symptoms.



### 3.6 Acknowledgements

We are especially grateful to María Clara Morente and Javier Peñalver for their excellent technical work, Enrique Moltó, Mariano Cambra, Ernesto Gómez and Arantxa Villagrà for their technical support, and Marco Scortichini and Joanna Pulawska for sending *X. arboricola* pv. *pruni* and *X. arboricola* pv. *juglandis* strains, respectively, and also Mark Andrews from Translemics for English revision.



## **3.7 Supporting information**



**S3.1 Table. Bacterial strains used in this study, their country of origin, host and results obtained with LFIA.**

Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
IVIA 2626.1	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2626.3	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2647.1-2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2647.3-1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2647.1-8b	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2647.3-1b	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2649.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2667	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2795	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2758.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2758.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2758.3	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2826.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 2826.6	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 2826.10	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+

Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
IVIA 2832.4b	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 2832.21	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 2832.27	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 2835.7	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2835.8	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 2835.9	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3161.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3162.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3162.3	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3162.4	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3177.1-1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3181.3-1-6	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3181.3-1-7	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3181.3-3	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3355.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3373.1a	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3374.a	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+

Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
IVIA 3378.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	+
IVIA 3397.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3397.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3437.5	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3438.8	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3439.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3487.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus armeniaca</i>	+
IVIA 3487.4	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus armeniaca</i>	+
IVIA 3489.4	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3490.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3490.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3490.3	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3490.4	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3491.7	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3491.8	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3492.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3492.3	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+

Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
IVIA 3604.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 3704.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3704.6	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3704.7	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3705.6	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3705.7	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3741	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3742	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 3767.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3767.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 3767.3	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	+
IVIA 4113	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	+
IVIA 4165.15	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
IVIA 4166.12	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Spain	<i>Prunus dulcis</i>	+
CFBP 411	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	USA	Unknown	+
CFBP 1311	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Canada	Unknown	+
CFBP 3894 <sup>PT</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	New Zealand	<i>Prunus salicina</i>	+



Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
CFBP 5229	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Argentina	<i>Prunus</i> sp.	+
CFBP 5529	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus persica</i>	+
CFBP 5530	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Italy	<i>Prunus persica</i>	+
CFBP 5562	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	France	<i>Prunus persica</i>	+
CFBP 5720	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	USA	<i>Prunus persica</i>	+
CFBP 5722	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Brazil	<i>Prunus persica</i>	+
CFBP 5724	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	USA	<i>Prunus dulcis</i>	+
ISF 43	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Italy	<i>Prunus salicina</i>	+
ISF 463	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Italy	<i>Prunus persica</i>	+
ISF 464	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Italy	<i>Prunus persica</i>	+
ISF 465	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Italy	<i>Prunus persica</i>	+
ISF 515	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Italy	<i>Prunus persica</i>	+
DAR 33337	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus salicina</i>	+
DAR 33420	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus persica</i>	+
DAR 41285	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus persica</i>	+
DAR 41286	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus persica</i>	+
DAR 41287	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus persica</i>	+

Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
DAR 56679	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus armeniaca</i>	+
DAR 56680	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus salicina</i>	+
DAR 61729	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>Prunus domestica</i>	+
DAR 69849	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Australia	<i>P. persica</i> x <i>P. dulcis</i>	+
CFBP 1846	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	France	<i>Corylus avellana</i>	+
IVIA 3978	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	Spain	<i>Corylus avellana</i>	-
RIPF-X08	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	Poland	<i>Corylus avellana</i>	-
RIPF-X10	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	Poland	<i>Corylus avellana</i>	+
RIPF-X18	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	Poland	<i>Corylus avellana</i>	+
RIPF-X23	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	Poland	<i>Corylus avellana</i>	+
CFBP 6771 <sup>PT</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>	Italy	<i>Fragaria</i> sp.	-
IVIA 2063.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>	Spain	<i>Fragaria</i> sp.	-
IVIA 1317.1a	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Spain	<i>Juglans regia</i>	-
IVIA 1321.1a	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Spain	<i>Juglans regia</i>	-
IVIA 1325.3a	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Spain	<i>Juglans regia</i>	-
IVIA 1327.4a	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Spain	<i>Juglans regia</i>	-
IVIA 3114.1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Spain	<i>Juglans regia</i>	-

Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
IVIA 3114.2	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Spain	<i>Juglans regia</i>	-
IVIA 4254.1-1	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Spain	<i>Juglans regia</i>	-
IVIA 4254.8-4	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Spain	<i>Juglans regia</i>	-
RIPF-X04	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Poland	<i>Juglans regia</i>	-
RIPF-X05	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Poland	<i>Juglans regia</i>	-
RIPF-X06	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Poland	<i>Juglans regia</i>	-
IVIA 2835.1	<i>X. arboricola</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	-
IVIA 4185	<i>X. arboricola</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	-
F3	<i>X. alfalfae</i> pv. <i>citrumelo</i>	USA	<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	-
CECT-914	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Hungary	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-
IVIA 2734.1	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Spain	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	-
IVIA 2808.7a	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Spain	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	-
IVIA 3222.6	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Uruguay	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 2776.107	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Argentina	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 2800.1Z	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Argentina	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 2808.8-1	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Argentina	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 2807.10-2	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Argentina	<i>Citrus sinensis</i>	-

Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
IVIA 2889.1	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Argentina	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 3011.3a	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Uruguay	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 3023.2	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Uruguay	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 3024.5	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Uruguay	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 3026.1	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Uruguay	<i>Citrus sinensis</i>	-
AW	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	USA	Unknown	-
IVIA 3365.13	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Uruguay	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 3080	<i>Xanthomonas</i> sp.	Spain	<i>Capsicum annuum</i>	-
IVIA 3081	<i>Xanthomonas</i> sp.	Spain	<i>Capsicum annuum</i>	-
IVIA 3082	<i>Xanthomonas</i> sp.	Spain	<i>Capsicum annuum</i>	-
IVIA 2636.1-1	<i>Xanthomonas</i> sp.	Spain	<i>Capsicum annuum</i>	-
CECT-792	<i>Xanthomonas</i> sp.	Israel	Unknown	-
IVIA 3619.1	<i>Xanthomonas</i> sp.	Spain	<i>Capsicum annuum</i>	-
IVIA 3287.1	<i>Xanthomonas</i> sp.	Spain	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	-
IVIA 3436	<i>Xanthomonas</i> sp.	Spain	<i>Prunus salicina</i>	-
CFBP 3566	<i>Xanthomonas</i> sp.	France	<i>Prunus armeniaca</i>	-
DAR 64858	<i>Xanthomonas</i> sp.	Australia	<i>Prunus dulcis</i>	-

Strain <sup>ab</sup>	Species	Country of origin	Host species	LFIA <sup>c</sup>
IVIA 1245.80	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	-
IVIA 1682.4b	<i>A. tumefaciens</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	-
IVIA 2304.10	<i>A. tumefaciens</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	-
IVIA 2974.3a	<i>A. tumefaciens</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	-
IVIA 3201.2	<i>A. tumefaciens</i>	Spain	<i>Prunus salicina</i>	-
IVIA 2261.2	<i>Pantoea agglomerans</i>	Spain	<i>Olea europea</i>	-
IVIA 2677.2a	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Spain	<i>Lactuca sativa</i>	-
IVIA 3249.9	<i>P. fluorescens</i>	Spain	<i>Lactuca sativa</i>	-
IVIA 3518.2	<i>P. fluorescens</i>	Spain	<i>Petunia</i> sp.	-
IVIA 2627.3a	<i>P. syringae</i>	Spain	<i>Pyrus communis</i>	-
IVIA 2716	<i>P. syringae</i>	Spain	<i>Prunus persica</i>	-
IVIA 3405.1-1	<i>P. syringae</i>	Spain	<i>Citrus reticulata</i>	-
IVIA 3514.2	<i>P. syringae</i>	Spain	<i>Citrus sinensis</i>	-
IVIA 3918.7	<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidae</i>	Spain	<i>Actinidia deliciosa</i>	-

<sup>a</sup> Information related to some of these strains can be found in the next references: Palacio-Bielsa *et al.* (2011), Bühlmann *et al.*, (2013) and Fischer-Le Saux *et al.* (2015).

<sup>b</sup> CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Paterna, Valencia, España; CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, France; DAR: Australian Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Rydalmere, Australia; ISF: Culture Collection of C.R.A.: Centro de Ricerca per la Frutticoltura, Roma, Italia; IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia, España; RIFP: Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland.

<sup>c</sup> LFIA results after after 10 min: + indicates positive detection; - indicates negative detection



## **Capítulo 4**

**El análisis mediante “Multilocus variable number of tandem repeat” revela múltiples introducciones en España de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y el almendro**





## **Multilocus variable number of tandem repeat analysis reveals multiple introductions in Spain of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, the causal agent of bacterial spot disease of stone fruits and almond**

Pablo López-Soriano\*<sup>1</sup>, Karine Boyer<sup>2</sup>, Sophie Cesbron<sup>3</sup>, María Clara Morente<sup>1</sup>, Javier Peñalver<sup>1</sup>, Ana Palacio-Bielsa<sup>4</sup>, Christian Vernière<sup>2,5</sup>, María M. López<sup>1</sup>, Olivier Pruvost<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> UMR Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Saint-Pierre, La Réunion, France

<sup>3</sup> INRA, UMR1345 IRHS Institut de Recherche en Horticulture et Semences, Beaucozéz, France

<sup>4</sup> Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón, IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, Spain

<sup>5</sup> UMR Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France

\* Pablo López-Soriano has contributed in the design of the experiments, performing DNA extraction, in the design of PCR conditions, in the selection and analysis of VNTRs, performing PCR and multiplex PCR analyses, population structure and genetic diversity analyses and writing the first version of the manuscript.

*PLoS ONE* (2016), **11**(9): e0163729

## 4.1 Abstract

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* is the causal agent of the bacterial spot disease of stone fruits, almond and some ornamental *Prunus* species. In Spain it was first detected in 2002 and since then, several outbreaks have occurred in different regions affecting mainly Japanese plum, peach and almond, both in commercial orchards and nurseries. As the origin of the introduction(s) was unknown, we have assessed the genetic diversity of 239 *X. arboricola* pv. *pruni* strains collected from 11 Spanish provinces from 2002 to 2013 and 25 reference strains from international collections. We have developed an optimized multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme targeting 18 microsatellites and five minisatellites. A high discriminatory power was achieved since almost 50% of the Spanish strains were distinguishable, confirming the usefulness of this genotyping technique at small spatio-temporal scales. Spanish strains grouped in 18 genetic clusters (conservatively delineated so that each cluster contained haplotype networks linked by up to quadruple-locus variations). Furthermore, pairwise comparisons among populations from different provinces showed a strong genetic differentiation. Our results suggest multiple introductions of this pathogen in Spain and redistribution through contaminated nursery propagative plant material.

## 4.2 Introduction

Geographical expansions of pathogens into new areas are one of the most important factors involved in plant disease emergence (Anderson *et al.*, 2004). Such introductions have become more frequent over the last decades due to major increases in plant trade and transport (Hulme, 2009), which has favored the exchange of contaminated plant material. The application of efficient molecular typing tools to the study of bacterial populations becomes essential for a better understanding of their genetic diversity and may allow the reconstruction of the invasion routes in order to develop preventive control strategies.

*Xantomonas arboricola* pv. *pruni* (Vauterin *et al.*, 1995) (synonym, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* Smith) is the causal agent of bacterial spot disease of stone fruits, almond and some ornamental species of *Prunus*. It is considered one of the most important bacterial pathogens affecting plants of the genus *Prunus* due to its high economic impact since most of the commercial cultivars of peach, Japanese plum, apricot and almond are susceptible (Stefani, 2010; Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). Crop losses may exceed 10,000 € per ha in plum orchards in favorable years to the development of the disease (Stefani, 2010) and, in Spain, decrease production in susceptible almond cultivars may reach 47% (Palacio-Bielsa *et al.*, 2015a). For these and other reasons, this bacterium is listed as a quarantine organism in the European Union (EU) phytosanitary legislation (EU Council Directive 2000/29/EC) and in the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) list (EPPO A2 list).

The disease was first described in North America in 1903 on Japanese plum (Smith, 1903) and thereafter *X. arboricola* pv. *pruni* has been reported in the main stone fruit producing areas from the five continents (Roselló *et al.*, 2012). In

Europe this pathogen is present in Italy, where it is considered endemic (Battilani *et al.*, 1999) and it has emerged in Belgium, France, Germany, the Netherlands, Switzerland, Spain and some Eastern Europe countries (López *et al.*, 2012) (EPPO-PQR, 2015). In the Americas, it is endemic in many areas of Argentina, Brazil, United States and Uruguay. Symptoms are observed on leaves and fruits, and may cause dieback (Roselló *et al.*, 2012; EPPO, 2006). The severity of disease outbreaks was found strongly related to weather conditions, cultivar susceptibility and agricultural practices. Bacteria survive during winter in cankers, leaf scars and buds in the absence of symptoms (Dhavantari, 1971; Zaccardelli *et al.*, 1998; Battilani *et al.*, 1999). Shepard and Zehr (1994) also showed the epiphytic persistence of this pathogen in different plant organs in population ranging from  $10^2$  to  $10^6$  CFU per gram of fresh weight in asymptomatic plant material. As there is no effective chemical control available, and to be part of a sustainable management, integrated control strategies are advised. In this context, it is essential to control the sanitary status of plant material in nurseries in order to propagate it free from the disease (Stefani, 2010). Currently, in the EU legislation, a visual inspection in nurseries for symptoms is the only requirement to certify plants free of *X. arboricola* pv. *pruni*, but latent infections and/or epiphytic populations in asymptomatic propagative material have been found (Goodman and Hattingh, 1986; Zaccardelli *et al.*, 1998; López *et al.*, 2010).

Despite its economic importance, little is known about the population biology and epidemiology of this quarantine bacterium. Boudon *et al.* (2005) used fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) analysis and multilocus sequence analysis (MLSA) to study the diversity of 64 *X. arboricola* pv. *pruni* strains isolated from different countries worldwide. No polymorphism was observed by MLSA based on four gene portions indicating that *X. arboricola*

*pv. pruni* is a monomorphic bacteria (Achtman, 2008). Subsequent studies based on seven gene portions highlighted minor polymorphism but further confirmed its monomorphic nature (Fischer-Le Saux *et al.*, 2015). Similarly, FAFLP globally yielded little polymorphism, slightly larger in America than in Europe and consistent with the history of the reported outbreaks. Similar results were obtained by Barionovi and Scortichini (2008) when screening the variability of 47 *X. arboricola pv. pruni* strains collected from Italy, Spain and Australia using an integron gene cassette array and BOX-PCR. Kawaguchi (2014) also observed low genetic diversity in *X. arboricola pv. pruni* Japanese strains using inter-simple sequence repeat PCR and repetitive sequence-based (rep)-PCR. Thus, all these methods lack resolution for deeper genetic diversity analyses at intrapathovar level, especially at small spatio-temporal (e.g. outbreak investigation) scales.

Multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) is a reliable genotyping method that proved efficient for assessing the genetic diversity of monomorphic bacterial pathogens (Lindstedt, 2005) and it is based on the variation detected in the size of short repetitive DNA sequences, tandem repeats (TR), which are highly variable regions in bacterial genomes (Van Belkum *et al.*, 1998). Variation in TR number is produced mainly by slipped strand mispairing during DNA replication (Levinson and Gutman, 1987). Most TRs evolve following the stepwise mutation model where new alleles are created by the addition or deletion of a single repeat unit per mutation event (Balloux and Lugon-Moulin, 2002), or a generalized two-phase model where multiple-repeat mutation frequencies follow a geometric distribution (Vogler *et al.*, 2006). The first MLVA scheme targeting a bacterial plant pathogen was performed for *Xylella fastidiosa* (Coletta-Filho *et al.*, 2001). In *Xanthomonas* species, MLVA schemes have been developed first for *X. citri pv. citri* (Bui Thi Ngoc *et al.*, 2009a; Pruvost *et al.*, 2014)

and later on for *X. oryzae* (Zhao *et al.*, 2012; Poulin *et al.*, 2015) and *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Arrieta-Ortiz *et al.*, 2015). A comprehensive MLVA scheme targeting 26 TR loci was developed to discriminate 61 *X. arboricola* strains of different pathovars (*celebensis*, *corylina*, *fragariae*, *juglandis*, *poinsetticola*, *populi* and *pruni*) (Cesbron *et al.*, 2014). Essakhi *et al.* (2015) used MLVA for assessing the genetic relatedness between *X. arboricola* pv. *juglandis* (a walnut pathogen) and non-pathogenic *X. arboricola* strains also isolated from walnut. Six TR loci were used to subtype 25 *X. arboricola* pv. *pruni* isolates from cherry laurel (*P. laurocerasus*) in the Netherlands (Bergsma-Vlami *et al.*, 2012).

Here, we study the genetic relatedness among strains causing bacterial spot disease in Spain, where *X. arboricola* pv. *pruni* was first detected in 2002 on Japanese plum, and in subsequent years several outbreaks have occurred in the main stone fruit producing regions (Roselló *et al.*, 2012; Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). Our objective was to assess the genetic diversity in a collection of 239 Spanish strains of *X. arboricola* pv. *pruni* as well as in 25 reference strains. To achieve this goal, we used a MLVA scheme including two sets of molecular markers combining microsatellite and minisatellite loci. This is the first extensive study targeting the intra-pathovar genetic diversity of a large collection of *X. arboricola* pv. *pruni* strains in a single country as an attempt to provide clues for better understanding introduction and dispersal pathways.

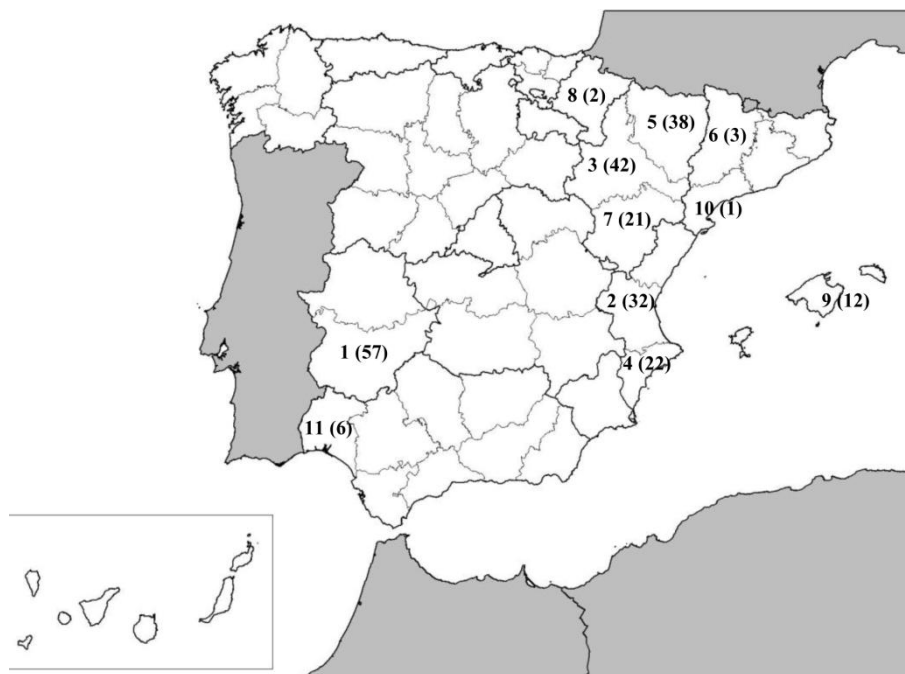
## 4.3 Materials and methods

### 4.3.1 Bacterial strains and DNA extraction

A total of 264 strains of *X. arboricola* pv. *pruni* were used in this study, 239 isolated from 11 Spanish provinces (Alicante, Badajoz, Huelva, Huesca, Lleida,

Mallorca, Navarra, Tarragona, Teruel, Valencia and Zaragoza) as shown in Fig 1 and S4.1 Table. Spanish strains were isolated from commercial orchards, nurseries and experimental plots since the first detection of this pathogen in Spain in 2002 to 2013. The strains used in this study were obtained from samples received as Laboratory of Reference of the Spanish Ministry of Agriculture (IVIA). The Ministry has been consulted about publishing the results and as official laboratory we do not require specific permission for handling these strains.

Strains were routinely cultured on YPGA medium (Ridé, 1969) (yeast extract 5 g l<sup>-1</sup> [Difco], bacteriological peptone 5 g l<sup>-1</sup> [Difco], glucose 10 g l<sup>-1</sup> and agar 20 g l<sup>-1</sup> [pH 7.1]) at 25°C for 72 h. DNA from bacterial pure cultures was obtained using a simple isopropanol-based extraction method, as previously described (Llop *et al.*, 1999). DNA concentration and purity were determined by using a ND1000 spectrophotometer (Thermo Fisher, Alcobendas, Spain) and the preparations were stored at -20°C. Most of the strains were isolated from Japanese plum (*Prunus salicina*) (n = 103), almond (*P. dulcis*) (n = 77), peach (*P. persica*) (n = 39), a few from apricot (*P. armeniaca*), nectarine (*P. persica* var. *nectarine*), flat peach (*P. persica* var. *platycarpa*), and from the rootstocks Cadaman® (*P. persica* x *P. davidiana*), Barrier (*P. davidiana* x *P. persica*), Garnem (*P. dulcis* x *P. persica*) and Monegro (*P. dulcis* x *P. persica*) (S4.1 Table). Spanish strains were also compared to 25 representative strains from Argentina, Australia, Brazil, Canada, France, Italy, New Zealand and United States conserved in international collections (S4.2 Table). A panel test comprising 16 strains representative of the geographical and genetic diversity of the pathogen was used for preliminary primers screening (S4.1 and S4.2 Tables).



**Fig 1. Chronological detection of outbreaks of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Spain.** 1, Badajoz, 2002; 2, Valencia, 2003; 3, Zaragoza, 2004; 4, Alicante, 2006; 5, Huesca, 2008; 6, Lleida, 2008; 7, Teruel, 2009; 8, Navarra, 2009; 9, Mallorca, 2010; 10, Tarragona, 2011; 11, Huelva, 2012. In brackets, number of isolates analyzed per province.

#### 4.3.2 Genomic DNA isolation, sequencing and annotation

Genomic DNA from *X. arboricola* pv. *pruni* pathotype strain CFBP 3894 was isolated and purified using the Qiagen genome DNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The Genomic DNA quality and quantity were assessed on an agarose gel and using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (the NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Libraries with an average insert size of 350 bp were sequenced using the Illumina HiSeq 2000 platform (Genoscreen, France). Paired-end reads were assembled in contigs using



SOAPdenovo 1.05 (Li *et al.*, 2010) and Velvet 1.2.02 (Zerbino and Birney, 2008). The assemblies had a total length of 5.06 MB generating 77 contigs. The G+C content of the sequence was of 65.42%. Annotation was performed using EuGene-PP using similarities with known protein sequences (Sallet *et al.*, 2014). Annotation of the genome sequences revealed 4337 putative protein-coding sequences, 55 tRNA, and three rRNA.

### 4.3.3 TR selection

In a first step 26 TR loci previously selected by Cesbron *et al.* (2014) were tested with a test panel of 16 Spanish and reference strains from different geographical origins. TR primers were assessed by PCR as follows: 5 to 10 ng of DNA was used as template in a 15 µl reaction mix containing 0.3 µM of each primer, 1X Terra Buffer (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France), 0.5X Q-solution and 0.375 U Terra Polymerase Mix (Ozyme). All reactions were performed in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) using the following PCR conditions: initial denaturation at 98°C for 2 min, followed by 35 cycles consisting of denaturation at 98°C for 10 s, annealing at temperatures ranging from 58 to 68°C for 15 s, and extension at 68°C for 1 min, with a final extension step at 68°C for 30 min. PCR products were visualized under UV light in agarose gels (2%) stained with ethidium bromide.

In a second step, the draft genome sequence of the *X. arboricola* pv. *pruni* pathotype strain CFBP 3894 was screened for minisatellites using the Tandem Repeat Finder (TRF) (<http://minisatellites.u-psud.fr>; <http://tandem.bu.edu/trf/tr.html>) (Benson, 1999; Denoeud and Vergnaud, 2004). Parameters selected were total length in a range of 50-1000 bp and tandem

repeats length  $\geq 10$  bp. Other parameters were set as default. Twenty-three single TR loci were retained from the genome of the CFBP 3894. Primer pairs targeting single locus alleles were designed in the TR flanking regions using Primer3, included in Geneious 7 software. Primers were tested with the test panel strains by PCR with the same conditions described above. Amplicons were visualized as mentioned above.

#### 4.3.4 MLVA scheme

A total of 23 primer pairs targeting single locus alleles were used in a multiplex PCR format. Primers were grouped in multiplex pools according to their annealing temperature. Each primer in the PCR mix was 5'-labeled with one of the following fluorescent dyes: 6-FAM, NED, PET and VIC (Applied Biosystems) (Table 1). Each PCR reaction contained 5 to 10 ng of genomic DNA as template in 15  $\mu$ l mix containing 0.3 to 1.2  $\mu$ M of each primer, 1X Terra Buffer (Ozyme), 0.5X Q-solution and 0.375 U Terra polymerase (Ozyme). PCR amplifications were performed in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) using the following conditions: 2 min at 98°C for polymerase activation, followed by 25 cycles at 98°C for 10 s, annealing temperatures ranging from 64 to 68°C for 15 s (Table 1), and 68°C for 1 min (except in one pool where elongation time was 2 min 30 s), and a final extension step at 68°C for 30 min. 1  $\mu$ l of diluted amplicons was mixed with 0.1  $\mu$ l of GeneScan-500 LIZ or 0.5  $\mu$ l of GeneScan-1200 LIZ internal size standard (Applied Biosystems) and 10.9  $\mu$ l or 10.5  $\mu$ l of Hi-Di formamide (Sigma-Aldrich) (for GeneScan-500 LIZ and GeneScan-1200 LIZ, respectively). Capillary electrophoresis was performed in an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer and results were analyzed with GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

**Table 1. TR markers tested on Spanish strains of *X. arboricola* pv. *pruni* (n = 239), primers, PCR conditions, number of alleles and Nei's genetic diversity ( $H_T$ ).**

Name	TR length (bp)	Primers	Annealing T (°C)	Primer concentration (μM)	PCR pool	Range of repeat numbers	Number of alleles ( $H_T$ ) <sup>a</sup>
TR51I	7	5' FAM-CATGGCAGTGCAGGTGGATC 3' 5' CTGCAACTCCCGATTCCCGA 3'	68	0.3	1	4-6	3 (0.154)
TR37I	7	5' VIC-ATGGAGGATGCGGTTGCGGCT 3' 5' CCAACAGAACCCCGCACCCA 3'	68	0.3	1	4-6	3 (0.384)
TR37II	6	5' PET-CGTCATGGACGCCCTGGTCAG 3' 5' CATTGGCATCGGCACGGCTACT 3'	68	0.3	1	9-11	3 (0.017)
TR05-06	7	5' NED-GTCGACGGTTTCGCGGAAGGT 3' 5' GTGCAGCACCAGCCAAAGGCA 3'	68	0.3	1	15-21	7 (0.795)
TR40I	7	5' FAM-TATCAGGCAGCGCACCAGCT 3' 5' TGGAAATGTGGAGGCTGTTTCG 3'	68	0.3	2	7-8	2 (0.168)
TR36I	7	5' VIC-GCAGGAGAAGGAAAGCGCCAG 3' 5' CGATCGCATCTGTGTGGGTTAG 3'	68	0.3	2	5-6	2 (0.132)
TR03I	7	5' PET-GACATTCGCCGGAGTGACAG 3' 5' GGTTGCTTGGTCGTTGATCG 3'	68	0.3	2	7-8	2 (0.008)
TR68I	7	5' NED-CTTGCGGTACTGGCTGTCA 3' 5' AAATCATCGGCGCCTGAAAC 3'	68	0.3	2	9-15	7 (0.632)

Name	TR length (bp)	Primers	Annealing T (°C)	Primer concentration (μM)	PCR pool	Range of repeat numbers	Number of alleles (H <sub>T</sub> ) <sup>a</sup>
TR30II	7	5' FAM-TTCTGCCGTCCTTCAGGGCTGG 3' 5' CATCAGTGCAGGCCACGAAC 3'	66	0.3	3	7-11	4 (0.371)
TR28II	9	5' VIC-GCGGCATGTTCCGACTGCACC 3' 5' GGTGGATGAGGGTCTGCATG 3'	66	0.6	3	3-4	2 (0.008)
TR38II	6	5' PET-TCTCGGTATCGATGTGGGTGC 3' 5' CCCGTAGCTGTATCAGTGCCT 3'	66	0.9	3	6-12	7 (0.691)
TR58II	7	5' NED-GGAAGAGTACCCGGCAATTCT 3' 5' TCTGATCGGTGCTGAGCGTCT 3'	66	0.6	3	9-17	8 (0.667)
TR33I	7	5' FAM-CGAGTGGATGTTATGGCGTGG 3' 5' CTCGAAAACCCTTGCCATC 3'	66	0.3	4	5-8	4 (0.207)
TR58I	7	5' VIC-ATCTGTTGCTGGCCGAGAGC 3' 5' ACCAACACCGAGCTTGCCTC 3'	66	0.3	4	5-9	5 (0.355)
TR79I	7	5' NED-GCTGATCCTTCGTGGGCTTG 3' 5' GGTGTGAATTCGTCGGTGAC 3'	66	0.3	4	6-10	5 (0.393)
TR50I	7	5' VIC-GTTGCGAGATCGGGCGCTTC 3' 5' CGTGCATCAGACGCTTGCCT 3'	68	0.3	5	5-9	5 (0.727)
TR66I	8	5' PET-TGCAGTTGTGGTCTTCGGCA 3' 5' CACGCATCAAGTTCGACATGGTGC 3'	68	0.3	5	9-12	4 (0.719)
TR15I	7	5' NED-GCCATGTCGCCGGAAACGA 3' 5' TCGAGCGGTTCTGCGGTTGT 3'	68	0.3	5	6-7	2 (0.285)

Name	TR length (bp)	Primers	Annealing T (°C)	Primer concentration (μM)	PCR pool	Range of repeat numbers	Number of alleles (H <sub>T</sub> ) <sup>a</sup>
TR67II	7	5' VIC-AGATACAAGGCGAACGCGAT 3' 5' CAGGACAGGAACGGCAACC 3'	64	0.3	6	10-20	11 (0.779)
Xap4790	112	5' CGCGTATTGCAGGAATCCAC 3' 5' FAM-CGATTGGAGATCCGGACCAG3'	68	0.3	A	2-4	2 (0.041)
Xap4422 <sup>b</sup>	116	5' GGTCTGATCCGCTTCTCACC 5'-NED-ATCCGCGCCAACACTACAAGAA	68	0.3	A		
Xap0897	15	5' ATTACTTCTTCCCTGCGGC 3' 5' FAM-TCTACAACACCAAGACCGGC 3'	64	1.2	B	1-3	2 (0.008)
Xap2280	20	5' AGAGCCTACACGGACGTA 3' 5' VIC-TGAACGGGATGGTGCAAGTT 3'	64	0.3	B	7-13	6 (0.508)
TR10II	12	5' TGGTTGCGCCCTTGCCTTCTC 3' 5' PET-TCGCCGGCATCAACATGGCCG 3'	64	0.9	B	5-7	3 (0.292)

<sup>a</sup> Nei's genetic diversity calculated using ARLEQUIN version 3.01.

<sup>b</sup> This marker was monomorphic within Spanish strains and was only used to compare them to the worldwide collection.

### 4.3.5 Data scoring and analysis

Fragment sizes obtained for each TR locus using GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) were transformed to tandem repeat numbers and used as input data. According to Pourcel and Vergnaud (2011) when a TR array was truncated, the TR number was rounded up to the higher integer.

Strains sharing the same MLVA profile were grouped in haplotypes. Phylogenetic relationships between strains were studied generating a minimum spanning tree (MST) with PHYLOViZ v1.0 (Francisco *et al.*, 2012). Clonal complexes (CC) were defined as networks of single locus variants (SLVs, i.e. groups of strains differing at a single TR locus), and were obtained and analyzed with eBURST v3 (Feil *et al.*, 2004). The founder was defined as the haplotype with the largest number of SLVs.

The population structure of the collection of the Spanish strains was assessed using PHILOViZ v1.0. A categorical MST was generated using the algorithm recommended for MLVA data combining global optimal eBURST (goeBURST) and Euclidean distances. Genetic clusters (GCs) were delineated so that each cluster contains a network of haplotypes linked by up to quadruple-locus variations.

### 4.3.6 Genetic diversity of Spanish strains

Only Spanish strains were used to calculate genetic diversity indices and to perform analysis of population structure at the province level, although only those provinces where more than 12 strains were isolated were selected (i.e. 224 strains from seven provinces) which represent 94% of total strain collection studied. Nei's unbiased estimates of genetic diversity ( $H_E$ ) were calculated using ARLEQUIN

version 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). Allelic richness (A), the mean number of alleles per locus per population, was calculated using the rarefaction procedure with HP-RARE version 1.0 (Kalinowski, 2005). Genetic differentiation among provinces was evaluated with Wright's fixation index ( $F_{ST}$ ) and Slatkin's  $F_{ST}$  analogue ( $R_{ST}$ ), which were calculated by computing distance matrices for haplotypic data. Significance was tested with 1000 permutations using ARLEQUIN version 3.1. (Excoffier *et al.*, 2005).

Metric multidimensional scaling (MDS), based on a Manhattan distance matrix, was used to represent distances among the Spanish and the worldwide strains. MDS transforms a distance matrix (which cannot be analyzed by eigen-decomposition) into a cross-product matrix, then solving the eigen-vector problem to find the coordinates of individuals so that distortions to the distance matrix are minimized. As in principal component analysis, individuals are projected into  $n$  dimensions (Abdi, 2007). MDS was performed using the `cmdscale` function in the R software.

## 4.4 Results

### 4.4.1 Selection of TR markers

The panel test of 16 *X. arboricola* pv. *pruni* strains was first tested by the 26 TR loci previously selected by Cesbron *et al.* (2014). Primers were redesigned when original primers were found to hybridize within the TR array (e.g. TR18II and TR67II) or when mispriming was observed (TR21II). Four TR loci were not further considered (TR19I, TR54I, TR39II and TR18II). In the context of xanthomonads,

which often contain compound microsatellites in their genome (i.e. loci for which TRs are composed of two or more sequence types), we considered TRs to be different when they had less than 70% sequence identity. TR19I was found to be a combination of two microsatellites sharing only 58% identity. TR54I showed a combination of two microsatellites (showing only 29% identity) and one minisatellite. TR39II and TR18II showed very different profiles in closely related strains (i.e single- or double-locus variants), in some cases differences were up to 12-14 repeats in the same locus between strains isolated in the same orchard and the same year. Sanger sequencing confirmed that the observed size polymorphism concerned the TRs and not the flanking regions. These differences may be attributed to recombination events and this suggested that these two loci might not follow a stepwise or two-phase mutation model. Therefore, they were not further considered in the analysis.

Moreover, from the genome sequence of strain CFBP 3894, markers TR05II and TR06II corresponded to a same and single tandem repeat locus. Furthermore, TR05II forward primer and TR06II reverse primer were found to prime within the repeated sequence. Therefore, we used the forward primer of TR06II and the reverse primer of TR05II (new marker named TR05-06), which did not prime in the tandem repeat array (S4.1 Fig).

The panel test of strains was also used to test primer pairs targeting 23 minisatellites identified with TRF screening the draft genome sequence of strain CFBP 3894. Four of them were polymorphic (Xap4790, Xap0897, Xap4422 and Xap2280) and were included in the MLVA scheme, whereas the other markers were monomorphic. Xap4422 was monomorphic among Spanish strains and was only retained to compare Spanish strains to the worldwide collection of strains.



Consequently we eventually retained 23 TR loci (18 microsatellites (TR < 9bp) and 5 minisatellites (TR ≥ 9 bp) (Pourcel and Vergnaud, 2011) for assessing the diversity of the Spanish strains collection and 24 loci for the worldwide collection.

#### 4.4.2 MLVA genotyping of the Spanish strains

The set of 239 strains of *X. arboricola* pv. *pruni* isolated in Spain was successfully genotyped, and all of them yielded reproducible amplicons for all 23 TR loci. Nei's genetic diversity at each locus ranged from 0.008 to 0.795 (Table 1). Three TR loci (TR03I, TR28II and Xap0897) showed very low levels of polymorphism and differentiated a single isolate in the whole collection. TR37II and Xap4790 were also weakly polymorphic and only differentiated two and four isolates, respectively. Allele number per locus ranged from 2 to 11 (Table 1).

Out of 239 Spanish strains, 119 MLVA haplotypes were identified. The genetic diversity of the whole collection was  $H_T = 0.363$ . Genetic diversity indices for each province are shown in Table 2. In order to assess the population structure of the Spanish strains, a categorical minimum spanning tree was built. Eighteen GCs were obtained grouping haplotypes differing by up to four TR loci (Fig 2).

**Table 2. Genetic diversity estimated from MLVA data of *X. arboricola* pv. *pruni* for the strains from 11 sampled Spanish provinces.**

Province <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	Na <sup>c</sup>	A <sup>d</sup>	N <sub>H</sub> <sup>e</sup>	H <sub>E</sub> <sup>f</sup>
Alicante	22	33	1.30	8	0.059
Badajoz	57	62	2.37	24	0.344
Huesca	38	70	2.56	30	0.311
Mallorca	12	26	1.04	2	0.290
Teruel	21	52	2.09	14	0.230
Valencia	32	34	1.28	9	0.053
Zaragoza	42	68	2.48	27	0.281
Huelva	6			3	
Lleida	3			3	
Navarra	2			2	
Tarragona	1			1	
Unknown	3			1	
<b>Total</b>	<b>239</b>		<b>4.30</b>	<b>119</b>	<b>0.363<sup>g</sup></b>

<sup>a</sup> Only provinces with  $n \geq 12$  were selected to calculate diversity indices (Na, A and H<sub>E</sub>).

<sup>b</sup> N, number of isolates per province.

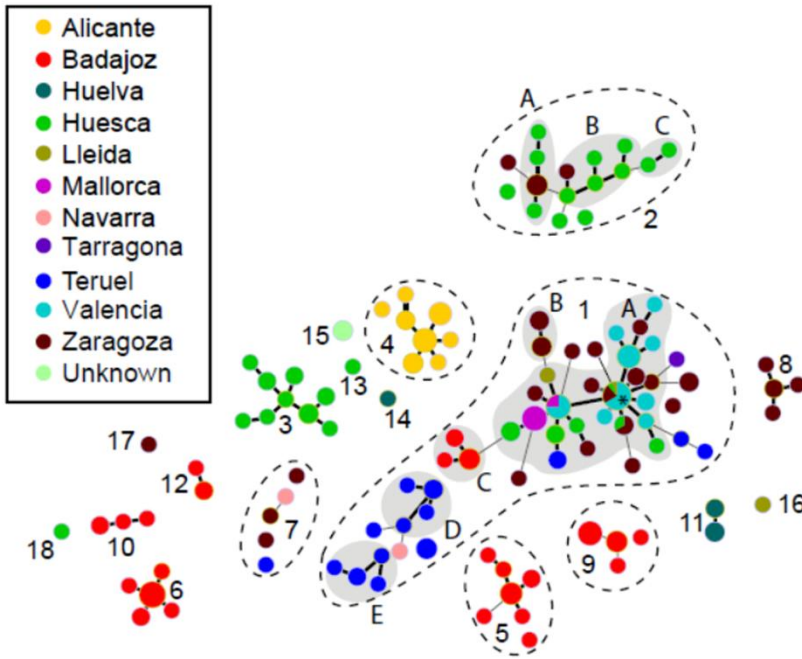
<sup>c</sup> Na, number of alleles.

<sup>d</sup> A, allelic richness calculated by rarefaction method ( $n = 12$ ).

<sup>e</sup> N<sub>H</sub>, number of haplotypes in each province.

<sup>f</sup> H<sub>E</sub>, Nei's genetic diversity within provinces.

<sup>g</sup> H<sub>T</sub>, total Nei's genetic diversity.



**Fig 2. Categorical minimum spanning tree from MLVA data (239 strains and 119 haplotypes) representing the genetic diversity of the Spanish strains of *X. arboricola* pv. *pruni* in relation with its province of origin.** Dot diameter represents the number of strains per haplotype. Numbers represent the 18 genetic clusters identified. Haplotypes in the same genetic cluster are up to quadruple locus variants. Thick links indicate single locus variants and thin links indicates double locus variants. Shaded areas show different clonal complexes in genetic clusters 1 and 2 and are identified with letters (A-E). Genetic clusters not enclosed in dashed lines are formed by a unique clonal complex or singleton.

\*Indicates the primary founder haplotype.

The largest GC (i.e. GC1) contained 48 haplotypes and 111 strains, which represent 40 and 46% of the whole collection, respectively. Strains from nine provinces were found in GC1, including all the strains from Valencia, Mallorca and Tarragona. Only those originating from Alicante and Huelva were not linked to this group. Other GCs were much smaller ( $\leq 16$  haplotypes), and six of them were formed by a single haplotype (GC13, GC14, GC15, GC16, GC17 and GC18). Strains from the province of Badajoz, where the disease was first reported in Spain, and Zaragoza split in six and five different GCs, respectively (Fig 2). All but three GCs (GC1, GC2 and GC7) were composed of a small number of strains originating from a single province with five of them containing strains originating from Badajoz. For example, all strains isolated in Alicante were included in GC4. This was correlated with the allelic richness ( $A$ ) calculated for each province (Table 2), where Alicante, Mallorca and Valencia showed the lowest values ( $A \leq 1.3$ ), while Badajoz, Huesca and Zaragoza displayed the highest values ( $A > 2.3$ ). Also consistent with the delineation of GCs, pairwise comparisons among populations sampled in seven provinces ( $n \geq 12$ ) showed highly significant  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  values (Table 3) supporting a strong genetic differentiation between strains originating from different provinces. Only strains from Mallorca and Zaragoza showed a  $R_{ST}$  value slightly significant ( $P < 0.05$ ).

**Table 3. Genetic differentiation of Spanish strains of *X. arboricola* pv. *pruni* from seven provinces ( $n \geq 12$ ) estimated by  $F_{ST}$  (above the diagonal) and  $R_{ST}$  (below the diagonal) pairwise comparisons based on MLVA data.**

	1	2	3	4	5	6	7
1 Alicante		0.535***	0.634***	0.907***	0.703***	0.885***	0.643***
2 Badajoz	0.367*** <sup>a</sup>		0.206***	0.379***	0.263***	0.421***	0.238***
3 Huesca	0.648***	0.231***		0.341***	0.266***	0.345***	0.106***
4 Mallorca	0.961***	0.341***	0.307***		0.447***	0.573***	0.241***
5 Teruel	0.821***	0.325***	0.331***	0.458***		0.507***	0.220***
6 Valencia	0.954***	0.401***	0.448***	0.559***	0.414***		0.176***
7 Zaragoza	0.679***	0.268***	0.134***	0.091*	0.228***	0.175***	

<sup>a</sup> Significance level of  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  pairwise comparisons: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; <sup>NS</sup> $P > 0.05$  (non-significant).

Haplotypes grouped in 16 CC and 34 singletons (i.e. strains with no SLV). The correspondence between GCs and CCs is highlighted in Fig 2. Single-repeat variants represented 70.7% of the total number of SLVs, suggesting a predominant stepwise mutation model. Double-repeats variants were observed (25.6% of the total SLVs) only with TR05-06, TR33I, TR38II, TR50I and TR58II loci, which are among the most polymorphic ones. A plausible explanation may be that some intermediate allelic states were missing in our strain collection, or perhaps these loci do not strictly follow a strict stepwise mutation model but a two-phase model (Vogler *et al.*, 2006). Only three triple-repeat variants were found in TR05-06 locus. Variations involving more than three repeats, which may be attributed to recombination events, were not observed in our dataset.

The largest clonal complex (GC1-A) was formed by 23 haplotypes and 70 strains isolated from six different provinces (Huesca, Lleida, Mallorca, Teruel, Valencia and Zaragoza) between 2003 and 2013 (Fig 2). Two other clonal complexes, GC2-A and GC2-B, were constituted by strains from different provinces (Huesca and Zaragoza). There were provinces with all their strains included in a single clonal complex, e.g. all the strains from Mallorca and Valencia that grouped in GC1-A. Most clonal complexes (13 out of 16) grouped only strains from the same province or the same location.

The primary founder in GC1-A (haplotype 29), the haplotype with the highest number of SLVs ( $n = 10$ ) corresponded to the most frequent haplotype ( $n = 18$ ), with strains isolated from 4 different provinces (Huesca  $n = 1$ , Lleida  $n = 1$ , Valencia  $n = 12$  and Zaragoza  $n = 4$ ) (Fig 2). In addition, two other haplotypes sharing strains isolated from different provinces were identified in this CC: haplotype 30 composed by eight strains isolated from Mallorca ( $n = 2$ ) and Valencia ( $n = 6$ ) and haplotype 32 formed by three strains from Huesca ( $n = 1$ ) and Zaragoza ( $n = 2$ ).

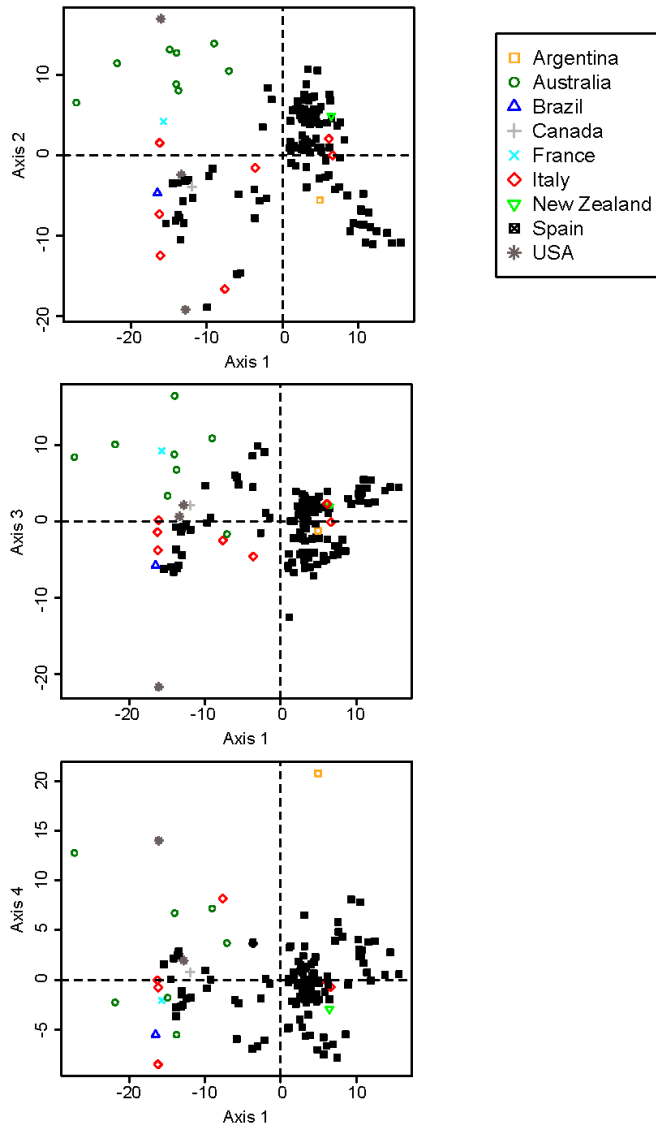
Sixty-three strains isolated in seven Spanish nurseries located in five different provinces were distributed in five different GCs (S1 Table). Among them, 32 strains isolated from nursery plants in Valencia in 2003 and seven strains isolated from nursery plants in Zaragoza between 2004 and 2008 grouped into the major clonal complex (GC1-A). Among those, 13 strains (Valencia  $n = 12$ , Zaragoza  $n = 1$ ) were assigned to the primary founder haplotype, suggesting a probable transmission of contaminated plant material by human activities. Fourteen strains were isolated in a single nursery located in Badajoz in 2002 showing very different MLVA profiles. Indeed, two of them clustered in GC1 and the other ones in GC6,

suggesting a possible polyclonal or multiple introduction(s) through the same nursery. Other strains from nursery plants were clearly separated with different allelic profiles, such as strains from Zaragoza clustering in GC8 or strains from Huesca and Lleida nurseries in GC13 and GC16, respectively.

Six haplotypes grouped strains isolated both in nurseries and orchards. For three of them the corresponding nurseries and the orchards were located in the same province (two in Badajoz and the other one in Zaragoza). For the three other cases, the nurseries were located in different provinces from those of the orchards.

#### **4.4.3 MLVA genotyping of a worldwide collection**

The 25 *X. arboricola* pv. *pruni* strains from our world collection were classified in 23 haplotypes, which means that almost every strain formed a unique haplotype. No haplotype was shared by strains from different countries. MLVA profiles clearly separated the 239 Spanish strains from the world strain collection, showing in most of the cases differences in a range of 4 to 15 loci, even within strains originated from a same country (haplotypes from Australia resulted from 5 to 9-loci variants) (Fig 3). Only two strains, CFBP 3894 from New Zealand and CFBP 5530 from Italy, were SLV (TR79I) and double locus variants (DLV) (TR33I and TR67II) of a Spanish haplotype, respectively, as shown by their close genetic distance on the MDS (Fig 3).



**Fig 3. MDS representation of the distances among 264 strains of *X. arboricola* pv. *pruni*.** Countries of origin are represented by different symbols. MDS axes 1-2, 1-3 and 1-4 described 59.3%, 47.4% and 44.4% of the total variation, respectively.



## 4.5 Discussion

The understanding of the invasion routes, biology and epidemiology of plant pathogens is of striking importance in order to elucidate which are the main factors involved in the success of invasions and to develop strategies aiming at preventing new introductions. Traditionally, two types of methods are employed to retrace invasion routes: direct methods, based on recorded data by quarantine services or agricultural agencies and indirect methods, based on genetic data obtained by the use of molecular markers (Estoup and Guillemaud, 2010). In this study we have tried combine both of them, using all the available information from the 239 Spanish strains analyzed.

### 4.5.1 MLVA is sufficiently resolutive for molecular epidemiology analyses of *X. arboricola* pv. *pruni* over small spatial or temporal scales

The analysis of literature data suggested that *X. arboricola* pv. *pruni* is a monomorphic bacterium and all available genotyping techniques but MLVA are not suitable for deciphering the genetic structure of strains during outbreaks. MLVA had been used to distinguish among *X. arboricola* pathovars (Cesbron *et al.*, 2014) and for assessing the genetic diversity among Dutch strains of *X. arboricola* pv. *pruni* isolated from *P. laurocerasus* (Bergsma-Vlami *et al.*, 2012). Using a comprehensive strain collection, we implemented and evaluated a MLVA scheme derived and improved from Cesbron *et al.* (2014) in order to assess the genetic structure of *X. arboricola* pv. *pruni*, eleven years after its emergence in Spain (Roselló *et al.*, 2012).

Around 50% of the Spanish strains were discriminated as different haplotypes, which confirms the appropriateness of MLVA as a genotyping tool for small-scale analyses of this monomorphic pathogen in a relatively small geographical area compared to other techniques such as MLST (Boudon *et al.*, 2005). A set of 11 Spanish strains shown genetically diverse based on MLVA (i.e. assigned to different GCs) constituted a single MLST haplotype using four housekeeping genes (Garita-Cambroneró *et al.*, personal communication).

Conversely and consistent with earlier data on *X. citri* pv. *citri* (Pruvost *et al.*, 2014; Leduc *et al.*, 2015) and *X. oryzae* (Poulin *et al.*, 2015), our MLVA scheme, which is mainly based on microsatellites, was not appropriate for understanding deep phylogenies and therefore strain relatedness at a global scale.

Our study did not aim at analyzing the role of the hosts in structuring the genetic diversity of *X. arboricola* pv. *pruni* because the strain collection available could not allow to extensively address this question. However, based on partial data that have been analyzed for this purpose, no strong or clear structure by the host was observed (data not shown) and several hosts from different provinces shared populations that were not statistically differentiated.

#### **4.5.2 MLVA supports multiple introductions of *X. arboricola* pv. *pruni* in Spain**

Since the original description of bacterial spot disease of stone fruits and almond in Badajoz in 2002, the outbreaks caused by *X. arboricola* pv. *pruni* in Spain are likely the result of multiple and/or polyclonal introductions. A scenario involving

multiple introductions of a pest is a common phenomenon in invasions (Duglosch and Parker, 2008), and it has already been described in some plant pathogenic bacteria such as *Erwinia amylovora* (Donat *et al.*, 2007; Bühlmann *et al.*, 2014).

This hypothesis was suggested by several independent pieces of evidence. Firstly, the 239 Spanish strains were assigned to 18 conservatively delineated GCs (i.e. strains in a network linked by up to quadruple-locus variations were assigned to a single GC). Secondly, pairwise comparisons among populations from Spanish provinces showed highly significant values of  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  among seven provinces, indicating a strong genetic differentiation. Thirdly, the assignation of isolates collected in 2002 in the Badajoz province further suggested that the initial establishment of the pathogen in Spain was caused by at least four distinct GCs (GC1, GC6, GC9 and GC12).

Few studies focus on the genetic diversity of local emerging strains of a *Xanthomonas* species within the first years following its detection. The situation observed in Spain for *X. arboricola* pv. *pruni* was strikingly different from the one reported for *X. citri* pv. *citri* strains having emerged in Mali and Burkina Faso (Leduc *et al.*, 2015). In the latter study, strains from two genetic lineages were identified but only one was detected in commercial citrus nurseries making it markedly prevalent likely through the massive spread of diseased propagative plant material. As a result, a large majority of emerging strains clustered as a single large CC and all epidemic strains would have been assigned to a single GC using the same criteria for GC delineation as herein. On the contrary, the genetic structure revealed in the present study was markedly different, suggestive of more or less concomitant outbreaks having a distinct origin.

Some GCs (i.e. GC3, GC4 and GC10) were formed by a few strains that were isolated in the same orchard and in the same year. These groups of strains showed MLVA profiles completely different to the rest of Spanish strains suggesting that these outbreaks were spatially restricted. These groups are probably the result of local dispersal as a result of natural dispersion by rain and wind or mechanical transmission during agricultural practices within the orchard. Interestingly, strains from these GCs have not been detected from nurseries.

#### **4.5.3 MLVA together with records from plant protection agencies support the role of nurseries in the introduction and spread of *X. arboricola* pv. *pruni* in Spain**

Nursery strains analyzed herein clustered in five GCs. Several strains from nurseries in different provinces grouped in the major CC (found in cluster GC1). Interestingly, the primary founder in this CC shared strains from different provinces that were isolated both from two nurseries and several orchards. Field investigations indicated that there had been an exchange of plant material between these two nurseries located in Valencia and Zaragoza, from which strains isolated in 2003 and 2004 respectively, were assigned to this primary founder (haplotype 29). Consistent with these results, several interceptions of contaminated plant material have been reported in Spanish nurseries and most of them consisted of symptomless plants with latent infections (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014). *X. arboricola* pv. *pruni* has been detected in seedlings of nectarine, Japanese plum and different stone fruit rootstocks, some of them originating from Italy where the disease is endemic in some regions (Battilani *et al.*, 1999). A

striking example of an interception was documented in GC8, which is composed of four strains from the rootstocks Garnem and Cadaman®. All of them were isolated in a nursery from Zaragoza in 2010 but the plants were produced in an Italian nursery (unpublished data). Such strains presented an allelic profile very different from the rest of the Spanish strains.

The largest CC identified herein was formed by strains originated from six different provinces. Some of them, as Huesca, Lleida, Teruel and Zaragoza belong to one of the greatest stone fruit producing areas in Spain, and some of the orchards where the strains were collected are separated by distances ranging from 5 to 30 km. Although natural spread of *X. arboricola* pv. *pruni* may occur within orchards during rain showers and hail storms (Ritchie, 1995; Zehr *et al.*, 1996; Battilani *et al.*, 1999), its spread has not been documented over such large distances. To our knowledge, the sole documented case involving extreme weather events (not reported in Spain) was described for *X. citri* pv. *citri* in a subtropical environment by Irey *et al.* (2006). Contaminated nursery plant material may have been associated with such long distance dissemination.

*X. arboricola* pv. *pruni* is a pathogen which can survive epiphytically or endophytically in different organs of the plants, such as leaves, twigs, buds, flowers and fruits at low concentration, without causing symptoms of bacterial spot disease (Gasperini *et al.*, 1984; Shepard and Zehr, 1994; Loreti *et al.*, 2015). These populations are a potential inoculum source for the development of the disease when weather conditions are favorable and may be transported between nurseries or from them to orchards inadvertently. Our results suggest that nursery plant material has contributed to spread *X. arboricola* pv. *pruni* in Spain and that the current inspection procedure consisting of visual observations of typical

symptoms in plants in nurseries is insufficient to ascertain their sanitary status. Consequently, survey and sampling protocols combined with high accuracy detection techniques should be applied (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011; 2012). There is a need to produce new research data combining microbial ecology and genotyping to improve the knowledge on the biological significance of *X. arboricola* pv. *pruni* epiphytic and endophytic populations as a primary inoculum source. Assessing mutation rates of TR markers in future experimental evolution studies would also be valuable.

#### **4.6 Acknowledgements**

We especially thank Spanish Diagnostic Laboratories of Badajoz, Barcelona, Huelva, Mallorca, Valencia and Zaragoza for sending samples and information, José Miguel Quesada and Isabel M. Berruete for their excellent technical work and Jerson Garita-Cambronero and Jaime Cubero for sharing unpublished data. We thank Géraldine Taghouti for genomic DNA extraction and Martial Briand, Jerome Gouzy and Sébastien Carrère for performing assembly and automatic annotation of the genome.

## **4.7 Supporting information**





**S4.1 Table. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains isolated from 11 provinces in Spain.**

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
IVIA 3161.2-1 <sup>b</sup>	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	5	4
IVIA 3161.2-2	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	5	4
IVIA 3161.4	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	5	4
IVIA 3162.1 <sup>c</sup>	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	46	4
IVIA 3162.2	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	7	4
IVIA 3162.3	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	7	4
IVIA 3162.4-5	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	5	4
IVIA 3162.4-6	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	7	4
IVIA 3177.1-1-1	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	5	4
IVIA 3177.1-6-2	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	5	4
IVIA 3177.3-4-3	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	40	4
IVIA 3177.3-8-4	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	48	4
IVIA 3177.3-10-5	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	5	4
IVIA 3181.3-1-6	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	47	4
IVIA 3181.3-1-7	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	6	4
IVIA 3181.3-1-8	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	6	4
IVIA 3181.3-3-1	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	4	4
IVIA 3181.3-3-2	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	4	4
IVIA 3181.3-3-3	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	4	4

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
IVIA 3181.3-3-4	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	4	4
IVIA 3181.3-3-5	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	4	4
IVIA 3181.3-3-6	Alicante	Almond	Rumbeta	2006	Orchard	4	4
IVIA 2626.1 <sup>c</sup>	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	2	6
IVIA 2626.2	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	2	6
IVIA 2626.3	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	13	1
IVIA 2626.4	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	64	1
IVIA 2626.5	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	2	6
IVIA 2626.6 <sup>b</sup>	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	14	1
IVIA 2626.7	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	13	1
IVIA 2626.8a	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	43	6
IVIA 2626.8b	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	50	6
IVIA 2626.10	Badajoz	Japanese plum	Fortune	2002	Orchard	14	1
IVIA 2647.1-2	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	44	6
IVIA 2647.1-3	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6
IVIA 2647.1-6	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6
IVIA 2647.1-7	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6
IVIA 2647.1-8	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	1	6
IVIA 2647.1-9	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	1	6
IVIA 2647.1-10	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6
IVIA 2647.1-12a	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
<b>IVIA 2647.1-12b</b>	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6
<b>IVIA 2647.1-13</b>	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6
<b>IVIA 2647.1-14</b>	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6
<b>IVIA 2647.1-15</b>	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2002	Nursery	2	6
<b>IVIA 2647.3-1</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Nursery	13	1
<b>IVIA 2647.3-2</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Nursery	13	1
<b>IVIA 2649.1</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Orchard	16	9
<b>IVIA 2649.2</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Orchard	66	9
<b>IVIA 2649.3</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Orchard	16	9
<b>IV IA 2649.4</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Orchard	16	9
<b>IVIA 2649.7</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Orchard	68	9
<b>IVIA 2649.10</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Orchard	16	9
<b>IVIA 2667</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2002	Orchard	3	12
<b>IVIA 2758.1</b>	Badajoz	Japanese plum		2003	Orchard	9	10
<b>IVIA 2758.2</b>	Badajoz	Japanese plum		2003	Orchard	52	10
<b>IVIA 2758.3</b>	Badajoz	Japanese plum		2003	Orchard	9	10
<b>IVIA 2795</b>	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2003	Orchard	53	10
<b>IVIA 3355.1</b>	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2007	Orchard	3	12
<b>IVIA 3355.2</b>	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2007	Orchard	45	12
<b>IVIA 3373.1a</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2007	Orchard	18	9
<b>IVIA 3373.1b</b>	Badajoz	Japanese plum	Friar	2007	Orchard	18	9

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
IVIA 3373.2a	Badajoz	Japanese plum	Friar	2007	Orchard	18	9
IVIA 3373.2b	Badajoz	Japanese plum	Friar	2007	Orchard	18	9
IVIA 3374a	Badajoz	Japanese plum	Angeleno	2007	Orchard	18	9
IVIA 3374b	Badajoz	Japanese plum	Angeleno	2007	Orchard	18	9
IVIA 3378.2-2	Badajoz	Nectarine	Zeeglo	2007	Orchard	18	9
IVIA 3378.3	Badajoz	Nectarine	Zeeglo	2007	Orchard	18	9
IVIA 3437.5	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	11	5
IVIA 3437.6	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	10	5
IVIA 3437.7	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	10	5
IVIA 3438.8	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	11	5
IVIA 3438.10	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	11	5
IVIA 3439.1	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	11	5
IVIA 3439.3	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	56	5
IVIA 3439.5	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	11	5
IVIA 3439.7	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	57	5
IVIA 3439.8	Badajoz	Japanese plum		2008	Orchard	54	5
IVIA 3741	Badajoz	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	62	5
IVIA 3742	Badajoz	Japanese plum	Golden Plum	2010	Orchard	61	5
IVIA 4266.1	Huelva	Japanese plum	Black Late	2012	Orchard	35	11
IVIA 4266.2	Huelva	Japanese plum	Black Late	2012	Orchard	35	11
IVIA 4266.7	Huelva	Japanese plum	Black Late	2012	Orchard	34	11

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
IVIA 4266.9	Huelva	Japanese plum	Black Late	2012	Orchard	34	11
IVIA 4286.1-1	Huelva	Japanese plum	Black Late	2012	Orchard	49	14
IVIA 4286.2-2	Huelva	Japanese plum	Black Late	2012	Orchard	34	11
IVIA 3487.1	Huesca	Apricot		2008	Orchard	72	3
IVIA 3487.3	Huesca	Apricot		2008	Orchard	22	3
IVIA 3487.4	Huesca	Apricot		2008	Orchard	21	3
IVIA 3489.2	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	71	3
IVIA 3489.4	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	21	3
IVIA 3490.1	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	20	3
IVIA 3490.2	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	20	3
IVIA 3490.3	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	21	3
IVIA 3490.4	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	73	3
IVIA 3491.7	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	70	3
IVIA 3491.8	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	69	3
IVIA 3492.2	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	19	3
IVIA 3492.3	Huesca	Japanese plum		2008	Orchard	19	3
IVIA 3604.2	Huesca	Almond		2009	Orchard	114	2
IVIA 3604.7	Huesca	Almond		2009	Orchard	12	1
IVIA 3604.10	Huesca	Almond		2009	Orchard	107	2
IVIA 3604.12	Huesca	Almond		2009	Orchard	108	2
IVIA 4165.15	Huesca	Almond	Guara	2011	Orchard	32	1

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
IVIA 4165.21	Huesca	Almond	Guara	2011	Orchard	113	2
IVIA 4166.12	Huesca	Almond	Guara	2011	Orchard	29	1
IVIA 4166.28	Huesca	Almond	Guara	2011	Orchard	92	1
IVIA 4491.1	Huesca	Almond		2013	Orchard	116	2
IVIA 4491.2	Huesca	Almond		2013	Orchard	117	2
IVIA 4491.3	Huesca	Almond		2013	Orchard	110	2
IVIA 4492.1	Huesca	Almond		2013	Orchard	111	2
IVIA 4492.2	Huesca	Almond		2013	Orchard	112	2
IVIA 4492.3	Huesca	Almond		2013	Orchard	118	2
IVIA 4492.4	Huesca	Almond		2013	Orchard	119	2
IVIA 4493	Huesca	Almond		2013	Orchard	25	1
CITA 21	Huesca	Almond		2008	Orchard	22	3
CITA 38	Huesca	Almond		2009	Orchard	12	1
CITA 56	Huesca	Almond		2010	Orchard	12	1
CITA 63	Huesca	Almond	Guara	2010	Orchard	115	2
CITA 116	Huesca	Almond		2011	Orchard	105	2
CITA 145	Huesca	Almond		2012	Nursery	41	13
CITA 148	Huesca	Almond	Guara	2012	Orchard	82	1
CITA 170	Huesca	Almond	Vayro	2013	Orchard	51	18
CITA 173	Huesca	Almond	Vayro	2013	Orchard	25	1
IVIA 3479.1	Lleida	Peach	Ryan Sun	2008	Orchard	81	1

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
CITA 91	Lleida	Peach		2011	Nursery	88	16
CITA 143	Lleida	Almond		2012	Orchard	29	1
IVIA 3704.2 <sup>c</sup>	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	31	1
IVIA 3704.3	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	31	1
IVIA 3704.5	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	31	1
IVIA 3704.6	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	31	1
IVIA 3704.7	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	31	1
IVIA 3704.8	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	31	1
IVIA 3704.9	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	30	1
IVIA 3704.10	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	31	1
IVIA 3704.11	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	30	1
IVIA 3704.12	Mallorca	Japanese plum	Larry Ann	2010	Orchard	31	1
IVIA 3705.6	Mallorca	Japanese plum	Fortune	2010	Orchard	31	1
IVIA 3705.7	Mallorca	Japanese plum	Fortune	2010	Orchard	31	1
CITA 53	Navarra	Almond	Guara	2009	Orchard	100	1
CITA 77	Navarra	Almond	Guara	2010	Orchard	59	7
IVIA 4113 <sup>c</sup>	Tarragona	Almond	Guara	2011	Orchard	78	1
IVIA 4330 <sup>c</sup>	Teruel	Almond	Guara	2009	Orchard	93	1
IVIA 4490.1	Teruel	Almond		2013	Orchard	15	1
IVIA 4490.2	Teruel	Almond		2013	Orchard	15	1
IVIA 4494.1	Teruel	Apricot		2013	Orchard	36	1

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
IVIA 4494.2	Teruel	Apricot		2013	Orchard	36	1
IVIA 4523.1	Teruel	Peach	Royal Lee	2013	Orchard	65	1
IVIA 4523.2	Teruel	Peach	Royal Lee	2013	Orchard	36	1
IVIA 4523.3	Teruel	Peach	Royal Lee	2013	Orchard	102	1
IVIA 4524.1	Teruel	Peach	Royal Lee	2013	Orchard	96	1
IVIA 4524.2	Teruel	Peach	Royal Lee	2013	Orchard	87	1
IVIA 4524.3	Teruel	Peach	Royal Lee	2013	Orchard	37	1
IVIA 4524.4	Teruel	Peach	Royal Lee	2013	Orchard	85	1
IVIA 4524.5	Teruel	Peach	Royal Lee	2013	Orchard	36	1
CITA 34	Teruel	Almond	Guara	2009	Orchard	26	1
CITA 35	Teruel	Almond	Guara	2009	Orchard	58	7
CITA 36	Teruel	Almond	Guara	2009	Orchard	26	1
CITA 68	Teruel	Almond	Guara	2010	Orchard	99	1
CITA 138	Teruel	Almond		2012	Orchard	37	1
CITA 172	Teruel	Almond	Guara	2013	Orchard	15	1
CITA 174	Teruel	Flat peach		2013	Orchard	97	1
CITA 175	Teruel	Flat peach		2013	Orchard	98	1
IVIA 2826.1	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	29	1
IVIA 2826.2 <sup>b</sup>	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	28	1
IVIA 2826.3	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	28	1
IVIA 2826.4	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	30	1



Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
IVIA 2826.5	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	29	1
IVIA 2826.6	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	30	1
IVIA 2826.7	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	30	1
IVIA 2826.8	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	79	1
IVIA 2826.9	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	86	1
IVIA 2826.10	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	30	1
IVIA 2826.11	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	30	1
IVIA 2832.4b	Valencia	Peach	Plamaguel	2003	Nursery	29	1
IVIA 2832.5	Valencia	Peach	Plamaguel	2003	Nursery	29	1
IVIA 2832.7	Valencia	Japanese plum	Angeleno	2003	Nursery	27	1
IVIA 2832.10	Valencia	Japanese plum	Angeleno	2003	Nursery	27	1
IVIA 2832.17	Valencia	Japanese plum	Larry Ann	2003	Nursery	28	1
IVIA 2832.19	Valencia	Japanese plum	Larry Ann	2003	Nursery	28	1
IVIA 2832.20	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	80	1
IVIA 2832.21	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	28	1
IVIA 2832.22	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	29	1
IVIA 2832.24	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	29	1
IVIA 2832.25	Valencia	Peach	58CC70	2003	Nursery	29	1
IVIA 2832.26	Valencia	Peach	58CC70	2003	Nursery	29	1
IVIA 2832.27	Valencia	Peach	58CC70	2003	Nursery	29	1
IVIA 2832.30a	Valencia	Peach x Chinese peach	Cadaman®	2003	Nursery	29	1

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
<b>IVIA 2832.30b</b>	Valencia	Peach x Chinese peach	Cadaman®	2003	Nursery	29	1
<b>IVIA 2835.4<sup>c</sup></b>	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	28	1
<b>IVIA 2835.5</b>	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	28	1
<b>IVIA 2835.6</b>	Valencia	Peach	Zephir	2003	Nursery	90	1
<b>IVIA 2835.7</b>	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	29	1
<b>IVIA 2835.8</b>	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	83	1
<b>IVIA 2835.9</b>	Valencia	Japanese plum	Anna Gold	2003	Nursery	30	1
<b>IVIA 3467.1</b>	Zaragoza	Peach		2008	Orchard	109	2
<b>IVIA 3467.2</b>	Zaragoza	Peach		2008	Orchard	67	1
<b>IVIA 3724.3</b>	Zaragoza	Peach x Chinese peach	Barrier	2009	Nursery	103	8
<b>IVIA 3767.1<sup>d</sup></b>	Zaragoza	Almond x peach	Garnem	2010	Nursery	104	8
<b>IVIA 3767.2<sup>d</sup></b>	Zaragoza	Almond x peach	Garnem	2010	Nursery	101	8
<b>IVIA 3767.3<sup>d</sup></b>	Zaragoza	Peach x Chinese peach	Cadaman®	2010	Nursery	38	8
<b>IVIA 3767.4<sup>cd</sup></b>	Zaragoza	Peach x Chinese peach	Cadaman®	2010	Nursery	38	8
<b>CITA 4</b>	Zaragoza	Peach	Catherine	2004	Nursery	17	1
<b>CITA 5</b>	Zaragoza	Peach	Catherine	2004	Nursery	17	1
<b>CITA 6</b>	Zaragoza	Peach	Catherine	2004	Nursery	91	1
<b>CITA 7</b>	Zaragoza	Peach		2004	Nursery	95	1
<b>CITA 8</b>	Zaragoza	Peach		2004	Nursery	29	1
<b>CITA 12</b>	Zaragoza	Peach	Honey Royal	2008	Nursery	32	1
<b>CITA 13</b>	Zaragoza	Peach	Gardeta	2008	Nursery	84	1

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
CITA 15	Zaragoza	Peach	Ryan Sun	2008	Nursery	32	1
CITA 19	Zaragoza	Peach		2008	Nursery	23	1
CITA 22	Zaragoza	Peach		2008	Experimental plot	23	1
CITA 23	Zaragoza	Peach	Evaisa	2008	Experimental plot	29	1
CITA 24	Zaragoza	Almond	Ayles	2008	Experimental plot	29	1
CITA 25	Zaragoza	Almond		2008	Experimental plot	23	1
CITA 26	Zaragoza	Almond x peach	Monegro	2008	Experimental plot	39	2
CITA 29	Zaragoza	Peach		2008	Experimental plot	29	1
CITA 37	Zaragoza	Almond	Guara	2009	Orchard	63	7
CITA 39	Zaragoza	Almond	Guara	2009	Orchard	60	7
CITA 40	Zaragoza	Almond	Guara	2009	Orchard	74	1
CITA 43	Zaragoza	Almond	Guara	2009	Orchard	94	1
CITA 47	Zaragoza	Apricot	Cristali	2009	Experimental plot	77	1
CITA 48	Zaragoza	Japanese plum	El Dorado	2009	Experimental plot	89	1
CITA 54	Zaragoza	Almond		2010	Experimental plot	39	2
CITA 59	Zaragoza	Almond		2010	Orchard	39	2
CITA 64	Zaragoza	Almond		2010	Experimental plot	106	2
CITA 69	Zaragoza	Peach		2010	Experimental plot	24	1
CITA 75	Zaragoza	Almond		2010	Experimental plot	33	1
CITA 76	Zaragoza	Almond	Guara	2010	Orchard	42	17
CITA 87	Zaragoza	Almond		2010	Experimental plot	33	1

Strain <sup>a</sup>	Province	Host of isolation	Cultivar	Year of isolation	Origin	Haplotype number	Genetic cluster (GC)
<b>CITA 89</b>	Zaragoza	Almond	Guara	2010	Orchard	55	7
<b>CITA 114</b>	Zaragoza	Almond		2011	Experimental plot	33	1
<b>CITA 118</b>	Zaragoza	Almond		2011	Nursery	75	1
<b>CITA 121</b>	Zaragoza	Peach x almond		2011	Experimental plot	24	1
<b>CITA 123</b>	Zaragoza	Almond	Guara	2011	Orchard	76	1
<b>CITA 153</b>	Zaragoza	Almond x peach	Garnem	2012	Experimental plot	24	1
<b>CITA 154</b>	Zaragoza	Almond		2012	Orchard	39	2
<b>IVIA 3397.1-1</b>	Unknown	Japanese plum				8	15
<b>IVIA 3397.1-2</b>	Unknown	Japanese plum				8	15
<b>IVIA 3397.2</b>	Unknown	Japanese plum				8	15

<sup>a</sup> IVIA, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia, Spain; CITA, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Montañana, Zaragoza, Spain.

<sup>b</sup> Strains deposited in the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA, Angers, France.

<sup>c</sup> Strains included in the panel test for preliminary primers screening.

<sup>d</sup> Interception by the Centro de Sanidad y Certificación Vegetal del Gobierno de Aragón (CSCV), Spain, of Garnem and Cadaman<sup>®</sup> rootstocks plants from an Italian nursery.

**S4.2 Table. *X. arboricola* pv. *pruni* strains from international collections.**

Strain <sup>a</sup>	Country of origin	Host of isolation	Year of isolation	Haplotype
CFBP 5229 <sup>b</sup>	Argentina	<i>Prunus</i> spp.	1996	W3
CFBP 5529 <sup>b</sup>	Australia	Peach	1964	W15
DAR 33337	Australia	Japanese plum	1978	W18
DAR 33420	Australia	Peach	1980	W17
DAR 41285	Australia	Peach	1982	W1
DAR 41286	Australia	Peach	1982	W1
DAR 41287	Australia	Peach	1982	W11
DAR 56679	Australia	Apricot	1987	W2
DAR 56680	Australia	Japanese plum	1987	W2
DAR 61729	Australia	European plum	1988	W16
DAR 69849	Australia	Peach x almond	1994	W13
CFBP 5722 <sup>b</sup>	Brazil	Peach	1991	W9
CFBP 1311 <sup>b</sup>	Canada			W7
CFBP 5562 <sup>b</sup>	France	Peach	1995	W14
CFBP 5530 <sup>b</sup>	Italy	Peach	1989	W21
ISF 43	Italy	Japanese plum	1993	W22
ISF 463	Italy	Peach	1996	W10
ISF 464	Italy	Peach	1996	W6
ISF 465	Italy	Peach	1996	W12
ISF 515	Italy	Peach	1997	W19
ISPaVe B4	Italy	Japanese plum		W4
CFBP 3894 <sup>bc</sup>	New Zealand	Japanese plum	1953	W20
CFBP 411	USA		1963	W8
CFBP 5720 <sup>b</sup>	USA	Peach	1987	W23
CFBP 5724 <sup>b</sup>	USA	Almond		W5

<sup>a</sup> CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, France; DAR: Australian Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Rydalmere, Australia; ISF: Culture Collection of C.R.A.: Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma, Italia; ISPaVe: Istituto di Patologia Vegetale, Bologna, Italia.

<sup>b</sup> Strains included in the panel test.

<sup>c</sup> Pathotype strain.



**FIG S4.1. Nucleotide sequence in *Xanthomonas arboricola* pv. pruni strain CFBP 3894 of TR loci developed by Cesbron *et al.* (2014) that were excluded from the analysis (TR19I and TR54I) or for which new primer combinations were designed (other loci). Color blocks indicate TRs differing in nucleotide sequence. Underlined regions correspond to primers designed by Cesbron *et al.* (2014). For TR05II and TR06II, the bold and italicized regions correspond to TR05II and TR06II, respectively. Plain and dashed underlined regions correspond to primers designed by Cesbron *et al.* (2014) for TR05II and TR06II, respectively.**

## **Capítulo 5**

***Xanthomonas prunicola* sp. nov. un nuevo  
patógeno que afecta a nectarino**





## ***Xanthomonas prunicola* sp. nov., a novel pathogen that affects nectarine trees**

María M. López<sup>#1</sup>, Pablo López-Soriano<sup>#\*1</sup>, Jerson Garita-Cambronero<sup>2</sup>, Carmen Beltrán<sup>3</sup>, Geraldine Taghouti<sup>4</sup>, Perrine Portier<sup>4</sup>, Jaime Cubero<sup>2</sup>, Marion Fischer-Le Saux<sup>4</sup> and Ester Marco-Noales<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera CV-315 Km 10,7, 46113 Moncada, Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Carretera de la Coruña Km 7,5, 28040 Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Consejería de Agricultura y Agua. Comunidad Autónoma Región de Murcia. Calle Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia, Spain.

<sup>4</sup>IRHS, INRA, AGROCAMPUS-Ouest, Université d'Angers, SFR 4207 QUASAV, CIRM-CFBP, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé cedex, France

# First and second author contributed equally to the paper

\* Pablo López-Soriano has contributed in the analysis of the novel strains by LFIA and PCR, performing DNA extraction and purification, multilocus sequence analysis, performing phylogenetic analyses, API 20 NE and API 50 CH tests, BIOLOG GN2 analysis and writing the first version of the manuscript.

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

(To be submitted)

## 5.1 Abstract

Three strains were isolated from nectarine (*Prunus persica* var. *nectarine*) trees in Murcia, Spain, showing similar symptoms to those produced by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. First analyses based on serological tests and real time PCR for such pathogen gave negative results. Therefore, these strains were characterized and compared with reference strains of *Xanthomonas* species using a polyphasic approach including both phenotypic and genomic methods. The 16S rRNA gene sequences confirmed that these strains belong to genus *Xanthomonas*. Multilocus sequence analysis (MLSA) based on the partial sequences of *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* genes clustered the novel strains together in a distinct group separated from the other species of *Xanthomonas*, showing similarity values below 95% with the rest of the species. Average nucleotide identity (ANI) values between the novel strains were higher than 99.95% confirming that they belong to the same species. Additionally, pairwise comparisons between the novel strains and other *Xanthomonas* species showed ANI values below 91%. The results of the phenotypic characterization were in accordance to the obtained with molecular analysis: API 20 NE and API 50 CH tests showed that the novel strains may be differentiated from other *Xanthomonas* species based on the results observed in nine tests and, in addition, they presented a metabolic pattern that is different to the strains of *X. arboricola* according to the results obtained with the BIOLOG GN2 system. Fatty acid profile also supported the observed differences. Furthermore, pathogenicity tests confirmed that the novel strains were able to produce symptoms in peach. On the basis of these results, the novel strains represent a novel species of the genus *Xanthomonas*, for which the name *Xanthomonas prunicola* is proposed. The type strain is CFBP 8353<sup>T</sup>.

## 5.2 Introduction

The genus *Xanthomonas* currently contains 29 bacterial species that are responsible for diseases in a broad range of economically important crops, such as stone fruit trees, citrus or rice, and wild plants (Jacques *et al.*, 2016). Taxonomy of this genus has been always under revision; the first *Xanthomonas* classification was based on host specificity, according to the concept “new host-new species”, leading to a complex genus with more than 100 species (Burkholder and Starr, 1948; Vauterin *et al.*, 2000). Then, Dye and Lelliott (1974) reduced *Xanthomonas* species to only five (*X. albilineans*, *X. ampelina*, *X. axonopodis*, *X. campestris* and *X. fragariae*), and included the remaining nomenspecies into the single species *X. campestris*. Later, Young *et al.* (1978) proposed to rename the former nomenspecies as pathovars of *X. campestris*; pathovar is an infrasubspecific taxonomic range, grouping strains responsible for the same symptoms on the same host range (Dye *et al.*, 1980). Since then, pathovar classification has been commonly used by all the phytopathologists.

Based on species definition (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2002), it is mandatory to delineate new species using a polyphasic approach including both phenotypic and genotypic characters. Phenotypic methods such as conventional biochemical tests (Van den Mooter & Swings, 1990), pathogenicity tests (Berthier *et al.*, 1993), fatty acid analysis (Yang *et al.*, 1993) and protein profiling (Vauterin *et al.*, 1991), among other, have been widely applied in taxonomic studies of the *Xanthomonas* members. Molecular methods have also been used, including plasmid profiling (Lazo and Gabriel, 1987), repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) (Rademaker *et al.*, 2000) and especially DNA-DNA hybridizations (Vauterin *et al.*, 1995) which has been considered the “gold standard” to delimit bacterial species (Stackebrandt and Goebel, 1994). However, this technique has several

drawbacks that limit its use, since it is labour-intensive and time-consuming and mostly because the impossibility of building incremental databases, in contrast to sequence information (Goris *et al.*, 2007). Therefore, alternative methods like multilocus sequence analysis (MLSA) (Young *et al.*, 2008) and the average nucleotide identity (ANI) between a given pair of genomes (Richter and Rosselló-Mora, 2009) are the most utilized techniques to delineate new bacterial species.

The major *Xanthomonas* reclassification was accomplished by Vauterin *et al.* (1995) who described 20 *Xanthomonas* species based on DNA-DNA hybridizations and physiological tests. Among them, *X. arboricola* was a new species that comprised six pathovars including the pathovar *pruni*. This pathovar grouped the strains affecting *Prunus* species, mainly stone fruits and almond, but also some ornamentals. In subsequent years, further species of the genus have been identified, as *X. cynarae* (Trébaol *et al.*, 2000), *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* (Jones *et al.*, 2006), *X. alfalfae*, *X. citri*, *X. fuscans*, (Schaad *et al.*, 2007), *X. dyei* (Young *et al.*, 2010), and *X. maliensis* (Triplett *et al.*, 2015).

In our study, three bacterial isolates were obtained from cankers in symptomatic nectarine trees. Symptoms observed were similar to those produced by *X. arboricola* pv. *pruni*, the causal agent of the bacterial spot disease of stone fruits, and the bacterial isolates, that also showed morphological features similar to *X. arboricola* pv. *pruni*, were subjected to phenotypic and molecular characterization. Results confirmed that the novel isolates belong to genus *Xanthomonas*, but showed that many of their characteristics differed from those of the other species previously described in this genus. Therefore, the objective of this work was to characterize such atypical strains through a polyphasic approach including pathogenicity tests, phenotypic tests, sequencing of 16S rRNA gene, multilocus sequence analysis targeting the housekeeping genes *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*

and *rpoD*, and comparative whole genome analysis based on average nucleotide sequence (ANI).

## 5.3 Materials and Methods

### 5.3.1 Bacterial strains and growth conditions

In this study, three new *Xanthomonas* isolates (IVIA 3287.1, IVIA 3287.2 and IVIA 3287.3) were obtained in 2007 from symptomatic nectarines (*Prunus persica* var. *nectarina*) of the cultivar Lourdes found in trees located in one orchard in Murcia (Spain). They were recovered from cankers in the trunk of the trees after three days incubation at 25°C in yeast peptone glucose agar (YPGA) medium. The colonies were purified three times in YPGA and deposited in bacterial collections with accession numbers CFBP 8353 (IVIA 3287.1), CFBP 8354 (IVIA 3287.2) and CFBP 8355 (IVIA3287.3).

The three novel isolates were characterized together with 20 strains of *X. arboricola* pv. *pruni* and ten strains of other *Xanthomonas* species (Supplementary Table S5.1), all of them previously stored at -80°C in 30% (v/v) glycerol. Prior to performing the different analysis, the bacteria were grown alternatively on YPGA medium or Luria-Bertani (LB) agar or trypticase soy broth agar (TSBA), at different conditions depending on the test.

### 5.3.2 Pathogenicity tests

Two different pathogenicity tests were carried out. First, inoculation on detached leaves of peach GF-305 (*Prunus persica*) was performed according to Randhawa & Civerolo (1985). Bacterial suspensions adjusted at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> were prepared in 10 mM phosphate buffered saline (PBS) from 48h cultures grown on YPGA medium. Leaves were surface sterilized and then a 100-fold dilution of the bacterial suspension was used to inoculate the leaves in the abaxial side. Inoculation was performed by infiltration using a syringe without a needle and applying gentle and steady pressure until the mesophyll tissue was water-soaked. The leaves were placed on 0.5% water agar plates and incubated at 28°C. Three leaves per isolate were inoculated in two independent experiments. The presence or absence of typical symptoms was recorded from 5 to 10 days post inoculation (dpi).

Secondly, the novel isolates were also inoculated in one year old GF-305 plants cultivated in a greenhouse. Six leaves per plant were inoculated, three on the abaxial surface by infiltration as described for the detached leaves and three on the adaxial side by the infiltration of bacterial suspensions at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> into the mesophyll using a syringe fitted with a needle. Two plants were inoculated with each isolate. Plants were incubated in a growth chamber at 30°C and 16 h photoperiod, and the presence or absence of symptoms was evaluated through 28 dpi. In both assays, negative and positive controls were included using sterile distilled water or a suspension of *X. arboricola* pv. *pruni* strain ISPAVE B4, respectively.

Additionally, leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants were inoculated with bacterial suspensions of the novel

isolates at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>, to test for the hypersensitive reaction (HR), according to Schaad and Stall (1988).

### 5.3.3 Serological tests and PCR analysis

Standard serological tests and PCR protocols routinely used for the identification of *X. arboricola* pv. *pruni*, were initially used to identify the novel isolates, since they were isolated from *Prunus* spp.

Two different serological tests were performed with the novel isolates. First, indirect immunofluorescence using a polyclonal antibody obtained from *X. arboricola* pv. *pruni* (As69V2) at different concentrations (1:1000, 1:2000, 1:4000 and 1:5000). Secondly, the novel isolates were analyzed with a prototype of lateral flow immunoassay developed for the detection of *X. arboricola* pv. *pruni* using two other polyclonal antibodies generated from this pathogen (2626.1-WC and 2626.1-HT) (López-Soriano *et al.*, 2017).

PCR analyses were performed following two protocols used for *X. arboricola* pv. *pruni* detection and identification. Bacterial DNA was extracted from pure cultures obtained after 48 h incubation in YPGA medium at 25°C, using a simple DNA extraction method (Llop *et al.*, 1999). Real time PCR protocols using primers targeting an ABC transporter protein coding gene (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011) and the virulence effector XopE3 (Garita-Cambroner *et al.* 2017) were performed. In all the reactions, *X. arboricola* pv. *pruni* strain ISPAVE B4 was used as positive control.

### 5.3.4 Sequence analysis of 16S rRNA gene

16S rRNA gene sequences of the three novel isolates were retrieved from the draft genomic sequences by BLASTn searches (Altschul *et al.*, 1990). 16S rRNA genes of the novel isolates were aligned with those of the type strains of the species retrieved from RDP database (<http://rdp.cme.msu.edu/>) or from the draft genomic sequences of CFBP 4644<sup>T</sup> (*X. melonis*), CFBP 4691<sup>T</sup> (*X. theicola*) and CFBP 4924<sup>T</sup> (*X. axonopodis*). Alignment (using ClustalW) and phylogenetic tree reconstruction (using Neighbor-joining method; 100 bootstrap) were conducted using Mega version 7 (Kumar *et al.*, 2016).

### 5.3.5 Multilocus sequence analysis

A multilocus sequence typing scheme based on the partial sequences of *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* genes, which has been previously determined as useful for characterizing new species of *Xanthomonas* (Young *et al.*, 2008, 2010), was performed. PCR amplifications were carried out in a 50 µL volume containing 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100 [pH 9.0]); 0.2 µM of each primer; 1.25 U Taq DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain); 0.2 mM each dNTP (Biotools Madrid, Spain); 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1.0 µg/µL of DNA template. All PCR reactions were performed in an ABI 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster Urban district, CA, USA) with an initial denaturation at 94°C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 2 min, and a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were sequenced at STAB VIDA (Lisbon, Portugal), and edited using BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 2011). Sequences of the four housekeeping genes used for MLSA analysis of the *Xanthomonas* species that



belong to the phylogenetic group 2 (Young *et al.* 2008) were obtained from the National Center for Biotechnology Information database (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), and included in the analysis. Sequences obtained were trimmed to the following sizes: *dnaK*, 890 positions; *fyuA*, 653 positions; *gyrB*, 848 positions and *rpoD*, 843 positions. Then, sequences were concatenated to give a total length of 3,234 nucleotide positions. ClustalW version 1.83 (Goujon *et al.*, 2010) was used for all alignments and the program MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) was used to determine the best model of evolution for Maximum Likelihood analysis (ML) based on the Akaike's information criterion (AIC) (Posada & Buckley, 2004). For the concatenated gene dataset TN93+G model was selected and Maximum likelihood trees, using 1,000 bootstrap re-samplings, were generated using MEGA 6.0. A similarity matrix of the concatenated sequences of the novel isolates and all the other *Xanthomonas* species was calculated with Mega 6.0. Average values with standard deviations for all pairwise comparisons were obtained.

### **5.3.6 Comparative whole genome analysis based on average nucleotide sequence**

Genomic DNA was extracted from the novel isolates using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega). Whole genomes were sequenced using the Illumina technology on a MiSeq instrument. Libraries of genomic DNA were performed using the Kit Nextera XT (Illumina, USA). Paired-end reads of 2 x 100 bp were assembled in contigs using SOAPdenovo 1.05 (Li *et al.*, 2010b) and Velvet 1.2.02 (Zerbino and Birney, 2008). Annotation was performed using EuGene-PP

(Sallet *et al.*, 2014) with the genome of strain Xoc BLS256 from *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola* as reference.

Draft genomes of the novel isolates were compared with each other and with the type strains of all described *Xanthomonas* species. The average nucleotide identity based on blast algorithm (ANIb) was calculated for each pairwise comparison using Jspecies software (Richter and Rossello-Mora, 2009). By definition, two strains having an ANIb value above the 95% threshold belong to the same species (Richter and Rossello-Mora, 2009).

### 5.3.7 Phenotypic characterization

Phenotypic characterization of the novel isolates was performed using the miniaturized tests API 20 NE and API 50 CH (bioMérieux). Bacterial strains were cultured on YPGA medium at 25°C for 48 h. API 20 NE strips were inoculated with bacterial suspensions at OD<sub>600</sub> 0.5 from 48 h old colonies from plates of YPGA medium according to manufacturer's instructions and incubated at 25°C for 48 h. For API 50 CH strips, the bacterial suspensions were prepared in medium C (Dye, 1968) at OD<sub>600</sub> 0.5 and the inoculated strips were incubated at 25°C for 96 h. The tests were repeated twice and performed also with strains of different species of *Xanthomonas* in order to compare with the novel isolates (Table 3).

Additionally, the metabolism of carbon compounds showed by the novel isolates was evaluated using the BIOLOG GN2 microplate system (Biolog INC., USA) as described by other authors (Verniere *et al.*, 1993; Garita-Cambronero *et al.*, 2016c) and compared to 24 strains of *X. arboricola* pathovars *corylina*, *juglandis*, *populi* and *pruni*, which were also included in the analysis. Briefly, bacterial strains

were cultured on Luria Bertani (LB) 2.0% agar plates for 48 h at 27°C. Subsequently, bacterial colonies were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) ( $OD_{600} = 0.3$ ) and 150  $\mu$ l of each suspension were inoculated into the BIOLOG GN2 microplates. Absorbance was measured at 570 nm using a Labsystems Multiskan RC spectrophotometer (Fisher Scientific, Waltham, USA) after 48 h incubation at 27°C. Three independent assays, including two microplates per isolate and three reads per well, were performed. Means from the reads were calculated and compared to determine the level of substrate utilization related to a negative control with no bacteria added. The utilization of the carbon compound was considered positive if the mean was 1.6 times higher than the negative control and negative when the mean was 1.3 times lower (Garita-Cambronero *et al.*, 2016c). Due to the presence of variable reactions among the evaluated strains, only the reactions with positive or negative results in the three independent assays were considered as valid. For the analysis, the results obtained were scored to a binary form for each compound as 0 (no utilization of the carbon source) and 1 (utilization of the carbon compound). Similarity among the strains was calculated by using the Jaccard's coefficient and then, results were subjected to UPGMA cluster analysis. Finally, the reliability of the obtained tree was determined using the Cophenetic Correlation Coefficient. All the analyses were computed on NTSYS 2.11T (Exeter Software, Setauket, NY) and graphically represented using Dendroscope software (Huson *et al.* 2007).

Fatty acids profiles of the novel isolates were generated following the protocol described by Roselló *et al.* (2006). Bacterial cultures were grown on trypticase soy broth agar (TSBA) at 28°C for 24 h. Whole-cell fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained in four steps: saponification, methylation, extraction and sample cleaning (Sasser, 1990). Finally, samples were analysed by gas chromatography

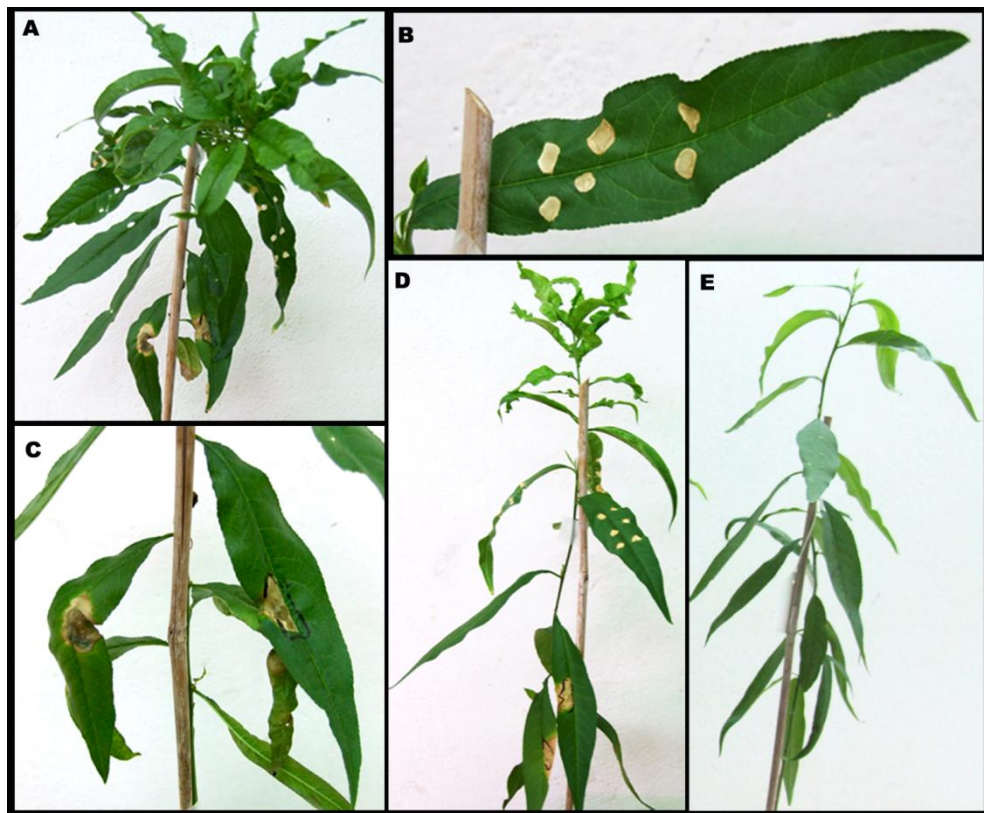
(Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph, Agilent Technologies, Palo Alto, California). FAMES extractions and chromatographic runs were performed twice for each bacterial strain.

## 5.4 Results and discussion

### 5.4.1 Pathogenicity tests

On detached leaves of GF-305 peach plants, the novel isolates produced similar symptoms to those caused by *X. arboricola* pv. *pruni*. On the adaxial side of the leaves brown spots were observed at 7 dpi, which evolved to bigger and dark lesions after 10 dpi. Some exudates were also observed on the abaxial surface. In whole plants of GF-305 inoculated with the novel isolates, small necrotic spots were observed at 5 dpi which after became bigger. Some leaves showed severe necrotic lesions at 12 dpi causing in some cases leaf dieback, confirming their pathogenicity on *Prunus* spp. (Fig. 1). Quite similar symptoms were observed on detached leaves and whole plants inoculated with the *X. arboricola* pv. *pruni* strain ISPAVE B4, but not in the negative controls. Colonies showing the same morphological type as the inoculated isolates were recovered from the diseased tissues.

Finally, the three novel isolates obtained from nectarine were able to elicit a HR on tomato and tobacco leaves in 24 h and 72 h, respectively, confirming their pathogenicity.



**Fig. 1. Symptoms caused by the novel isolates in GF-305 peach plants.** (A) Plant inoculated with the novel isolate CFBP 8353 using two types of bacterial infiltration. (B) Detail of the leaf lesions caused by the inoculation on the abaxial side. (C) Detail of the necrotic spot caused by the inoculation on the adaxial surface of the leaves. (D) Positive control, GF-305 peach plant inoculated with *X. arboricola* pv. *pruni* strain ISPAVE B4. (E) Negative control, GF-305 peach plant inoculated with sterile distilled water.

#### 5.4.2 Serological tests and PCR analysis

The novel isolates were analyzed with immunofluorescence and a lateral flow immunoassay, using in both methods polyclonal antibodies obtained from *X.*

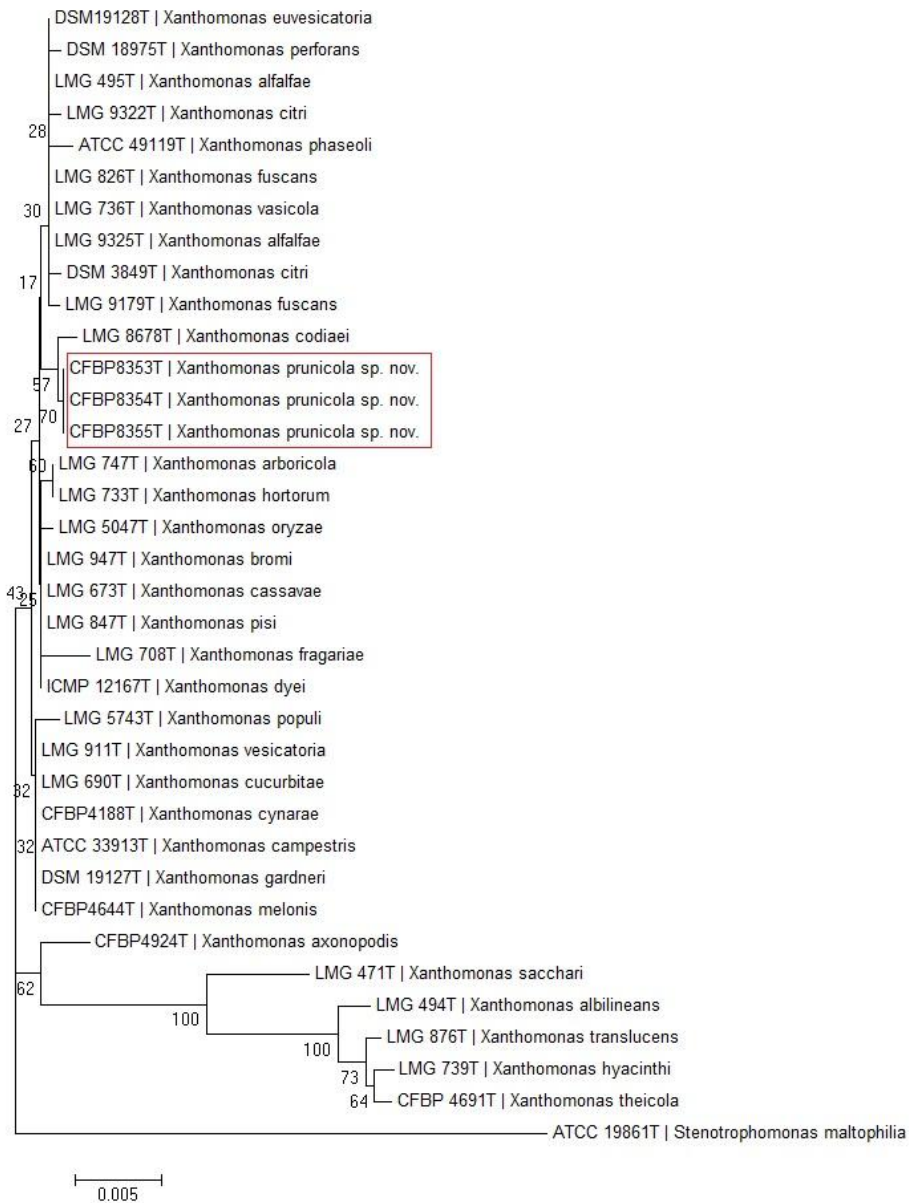
*arboricola* pv. *pruni*. In the immunofluorescence assay, different concentrations of the same antibody (As69V2) were used, obtaining negative results in all cases. The novel isolates were also negative with the lateral flow immunoassay, a method that has been recently developed for the detection of *X. arboricola* pv. *pruni* in symptomatic field samples of *Prunus* spp. (López-Soriano *et al.*, 2017).

The differences were also confirmed by the PCR results. Isolates were analyzed with two different real time PCR protocols for the detection of *X. arboricola* pv. *pruni* (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011; Garita-Cambronero *et al.*, 2017). No amplification was observed with either of the two protocols.

Results obtained with serological tests and real time PCR analysis confirmed that the isolates pathogenic to nectarine could not be considered as strains of *X. arboricola* pv. *pruni*.

### 5.4.3 Sequence analysis of 16S rRNA gene

The 16S rRNA sequences from the three novel isolates were 100% identical. Blastn analysis on NCBI showed that this three isolates clearly belong to *Xanthomonas* genus and share 99% similarities with other *Xanthomonas* species (*X. vesicatoria*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. citri*, *X. campestris*, *X. arboricola*) (results not shown). Phylogenetic analysis of the 16S sequences of types strains of *Xanthomonas* species showed that these strains belonged to the group 2 of the genus as defined by Young *et al.*, (2008) (Fig. 2).

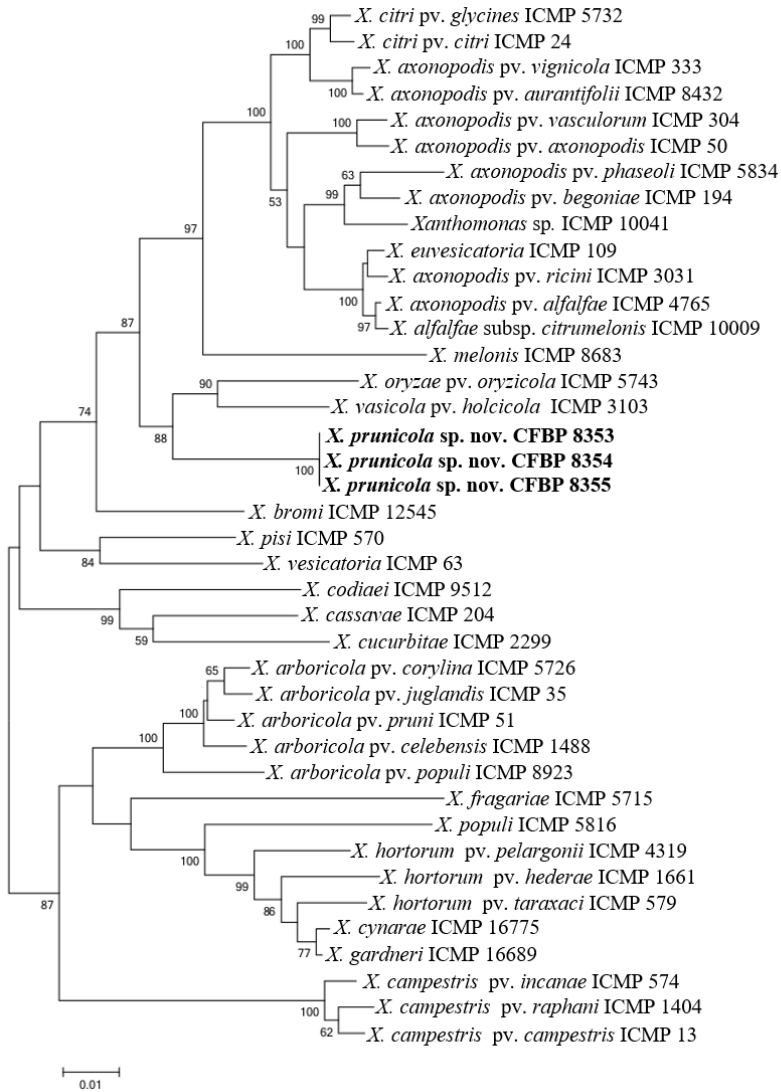


**Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree reconstructed from 16S rDNA sequences of type strains of *Xanthomonas*.** Bootstraps values (100 replicates) superior to 50% are displayed. The novel strains display similar sequences belonging to group 2 of *Xanthomonas* genus (Young *et al.*, 2008).

#### 5.4.4 Multilocus sequence analysis

Maximum likelihood analysis of the concatenated nucleotide sequences (3,234 nucleotide positions) showed that all the strains representing the *Xanthomonas* species according to Young *et al.* (2008) were grouped in agreement with the taxonomical classification of the species of the genus. Bootstrap values for most species branch nodes exceeded 90%. The three strains analyzed here were clustered together in a distinct group separated from the other species described in *Xanthomonas* (Fig. 3) and showed a 100% of nucleotide sequence similarity (Table 1). The mean nucleotide similarity among this group and the known species of *Xanthomonas* was  $93.4 \pm 0.3\%$  and its closest related species were *X. vasicola* pv. *holcicola* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* which expressed a similarity values of  $94.98 \pm 0.34\%$  and  $94.64 \pm 0.35\%$ , respectively (Table 1). All the similarity values obtained between the group of the novel isolates and the other *Xanthomonas* species were lower than 96% which is the cutoff point proposed by Young *et al.*, (2008) for the species differentiation, thus confirming this group of strains as a new species of *Xanthomonas*.





**Fig. 3. Maximum likelihood analysis of the concatenated partial nucleotide sequences of *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* genes representing the phylogenetic position of the novel isolates within the *Xanthomonas* genus. Novel isolates appear in bold and the remaining strains are a selection of reference strains of *Xanthomonas* reported in Young *et al.* (2008). Bootstrap values (1,000 replicates) are shown over or below the branches.**

**Table 1. Similarity (%) between sequences of concatenated nucleotides of *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* (3234 bases) of the novel isolates with other *Xanthomonas* species.**

	<i>X. prunicola</i> sp. nov		<i>X. prunicola</i> sp. nov.
<i>X. alfalfae</i>	94.03 ± 0.42	<i>X. fragariae</i>	90.78 ± 0.57
<i>X. arboricola</i>	93.94 ± 0.38	<i>X. gardneri</i>	93.06 ± 0.48
<i>X. axonopodis</i>	93.67 ± 0.39	<i>X. hortorum</i>	92.64 ± 0.46
<i>X. bromi</i>	93.97 ± 0.46	<i>X. melonis</i>	92.33 ± 0.50
<i>X. campestris</i>	90.82 ± 0.54	<i>X. oryzae</i>	94.64 ± 0.35
<i>X. cassavae</i>	92.38 ± 0.43	<i>X. pisi</i>	94.54 ± 0.41
<i>X. citri</i>	93.86 ± 0.41	<i>X. populi</i>	90.99 ± 0.56
<i>X. codiae</i>	91.60 ± 0.48	<i>X. vasicola</i>	94.98 ± 0.34
<i>X. cucurbitae</i>	92.21 ± 0.51	<i>X. vesicatoria</i>	93.17 ± 0.47
<i>X. cynarae</i>	93.17 ± 0.49	<i>X. prunicola</i> sp. nov.	100
<i>X. euvesicatoria</i>	94.14 ± 0.41		

#### 5.4.5 Comparative whole genome analysis based on average nucleotide sequence

ANIb values between novel isolates were higher than 99.95% confirming that the three strains should be classified in the same species. All ANIb values in pairwise comparisons with type strains of already described species were far below the 95% delineation cutoff. In accordance with MLSA results, the highest ANIb values were obtained with *X. oryzae* (90.88 - 91.13%) and *X. vasicola* pv. *holcicola* (90.75 - 90.92%) (Table 2). The ANI calculation support the MLSA conclusion that the three novel isolates represent a novel species within *Xanthomonas* group 2 clade whose closest relative species are *X. oryzae* and *X. vasicola*.

**Table 2. ANiB values (%) obtained by pairwise comparisons between the novel isolates and all described *Xanthomonas* species.**

	<i>X. prunicola</i> sp. nov. CFBP8353 <sup>T</sup> *		<i>X. prunicola</i> sp. nov. CFBP8353 <sup>T</sup> *
<i>X. albilineans</i> CFBP 2523 <sup>T</sup>	75.64 - 75.92	<i>X. gardneri</i> ATCC 19865 <sup>T</sup>	86.16 - 86.39
<i>X. alfalfae</i> CFBP 7686 <sup>T</sup>	89.29 - 89.40	<i>X. hortorum</i> CFBP4925 <sup>T</sup>	86.21 - 86.31
<i>X. arboricola</i> CFBP 2528 <sup>T</sup>	86.66 - 86.69	<i>X. hyacinthi</i> CFBP1156 <sup>T</sup>	78.19 - 78.20
<i>X. axonopodis</i> CFBP 4924 <sup>T</sup>	89.13 - 89.26	<i>X. melonis</i> CFBP4644 <sup>T</sup>	85.05 - 85.30
<i>X. bromi</i> CFBP 1976 <sup>T</sup>	88.83 - 89.30	<i>X. maliensis</i> M97 <sup>T</sup>	81.35 - 81.48
<i>X. campestris</i> ATCC 33913 <sup>T</sup>	84.47 - 84.58	<i>X. oryzae</i> ATCC 35933 <sup>T</sup>	90.88 - 91.13
<i>X. cassavae</i> CFBP 4642 <sup>T</sup>	85.94 - 86.09	<i>X. perforans</i> CFBP7293 <sup>T</sup>	89.35 - 89.52
<i>X. citri</i> LMG 9322 <sup>T</sup>	89.20 - 89.40	<i>X. pisi</i> CFBP4643 <sup>T</sup>	87.33 - 87.38
<i>X. codiaei</i> CFBP 4690 <sup>T</sup>	85.54 - 85.87	<i>X. populi</i> CFBP1817 <sup>T</sup>	85.54 - 85.86
<i>X. cucurbitae</i> CFBP2542 <sup>T</sup>	84.46 - 85.06	<i>X. sacchari</i> CFBP4641 <sup>T</sup>	77.57 - 77.70
<i>X. cynarae</i> CFBP4188 <sup>T</sup>	86.18 - 86.31	<i>X. theicola</i> CFBP4691 <sup>T</sup>	77.90 - 78.15
<i>X. euvesicatoria</i> LMG 27970 <sup>T</sup>	89.25 - 89.34	<i>X. translucens</i> CFBP 2054 <sup>T</sup>	77.96 - 78.27
<i>X. dyei</i> CFBP7245 <sup>T</sup>	86.19 - 86.14	<i>X. vasicola</i> CFBP2543 <sup>T</sup>	90.75 - 90.92
<i>X. fragariae</i> LMG 25863	85.50 - 85.96	<i>X. vesicatoria</i> ATCC 35937 <sup>T</sup>	85.94 - 86.00
<i>X. fuscans</i> CFBP6165 <sup>T</sup>	89.29 - 89.45	<b><i>X. prunicola</i> sp. nov.</b>	100.00
		<b>CFBP8353<sup>T</sup></b>	

\* Reciprocal values of ANiB between the compared species are shown.

### 5.4.6 Phenotypic characterization

Phenotypic characteristics obtained with API 20 NE and API 50 CH tests showed that the novel isolates can be differentiated from other members of the genus *Xanthomonas* by the results observed in nine tests (Table 3). Especially significant were the differences observed in the assimilation of mannitol and D-arabinose, that were positive in the novel strains and negative in the rest of *Xanthomonas* strains with the exception of *X. oryzae* pv. *oryzae* which showed a weak positive

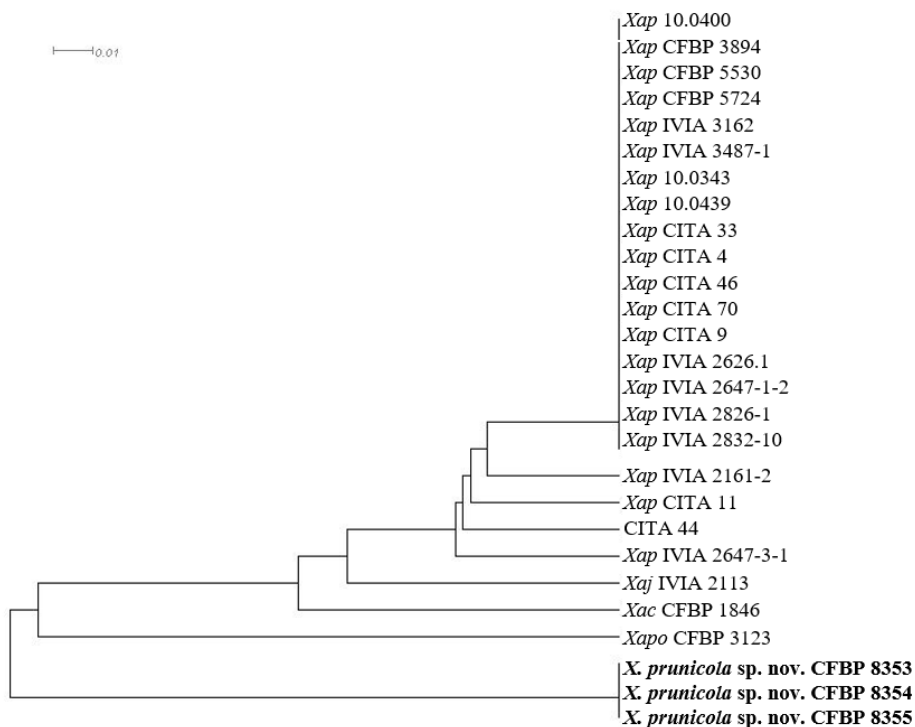
reaction with the second carbohydrate. Both phenotypic characters are useful to distinguish the novel isolates from the other species of *Xanthomonas*. It is remarkable the differences between the novel isolates and *X. arboricola* pv. *pruni* both affecting *P. persica*.

**Table 3. Phenotypic characteristics that differentiate three novel isolates from other *Xanthomonas* reference strains.**

Taxa: 1, *Xanthomonas prunicola* sp. nov.; 2, *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP 2528<sup>T</sup>; 3, *X. arboricola* pv. *populi* CFBP 3123<sup>PT</sup>; 4, *X. arboricola* pv. *pruni* CFBP 3894<sup>PT</sup>; 5, *X. campestris* pv. *campestris* CFBP 5241<sup>T</sup>; 6, *X. cynarae* CFBP 4188<sup>T</sup>; 7, *X. hortorum* pv. *hederae* CFBP 4925<sup>T</sup>; 8, *X. oryzae* pv. *oryzae* CFBP 2532<sup>T</sup>; 9, *X. vasicola* pv. *holcicola* CFBP 2543<sup>T</sup>; w, weakly positive.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b><u>In API 20NE:</u></b>									
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mannitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b><u>In API 50CH:</u></b>									
D-arabinose	+	-	-	-	-	-	-	w	-
L-arabinose	-	-	-	-	-	+	-	-	-
N-acetylglucosamine	-	-	w	w	-	w	-	+	w
Salicin	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-fucose	+	+	w	w	w	+	-	-	-
L-fucose	+	-	w	-	+	w	-	-	w

Analysis of the carbon metabolic profile using the BIOLOG GN2 microplate system showed that the three novel isolates presented a metabolic pattern that is different to the strains of *X. arboricola*, as represented in the dendogram obtained from the similarity analysis (Fig. 4). The three strains pathogenic to nectarine formed a homogeneous group that was distinct from the other *X. arboricola* strains, some of them causal agents of bacterial spot disease on *Prunus* species. Fifteen carbon sources compounds were utilized by the three novel isolates, whereas 41 carbon sources were not used and 39 showed variable reaction and, therefore, were considered as not informative. According to this profile, they differed from the strains of *X. arboricola* in the ability to catabolize gentibiose, cis-aconitic acid and L-alaninamide.



**Fig. 4. Comparative cluster analysis of the carbon compound utilization profile of novel isolates of *Xanthomonas* and those of *X. arboricola* according to the BIOLOG GN2 microplate system.** Cluster analysis was constructed based on 57 informative substrates. Data were computed using the UPGMA model. Reliability of the tree was determined by the Cophenetic Correlation Coefficient ( $r = 0.988$ ). Novel isolates appear in bold.

Fatty acids profiles of the novel isolates were typical of *Xanthomonas*. They were very similar to those obtained with the strain ISPAVE B4 of *X. arboricola* pv. *pruni*, and to the profiles determined for other *Xanthomonas* species according to Saddler and Bradbury (2005). The predominant fatty acids were iso  $C_{15:0}$ , summed feature 3 ( $C_{16:1} \omega 7c$  and/or iso  $C_{15:0}$  2-OH), anteiso  $C_{15:0}$  and  $C_{16:0}$ .

All the results presented in this study showed that the three isolates pathogenic to nectarine belong to the genus *Xanthomonas*. The polyphasic approach used to identify these isolates included phenotypic methods (API 20 NE and API 50 CH tests, BIOLOG and fatty acids profile) and molecular analysis (16S rRNA sequencing, MLSA and ANI values). The results obtained confirmed that these strains form a homogeneous group distinct from the other *Xanthomonas* species, and fulfilled the recommended criteria for the definition of a novel species (Stackebrandt *et al.*, 2002). It is therefore proposed that the novel isolates be designated as a new species of the genus *Xanthomonas*, and the name *Xanthomonas prunicola* sp. nov. is proposed.

### 5.5 Description of *Xanthomonas prunicola* sp. nov.

*Xanthomonas prunicola* (pru.ni.col), meaning inhabitant of species of *Prunus*.

Bacterial cells are Gram-negative, non-spore-forming, strictly aerobic, straight rods and motile by a single polar flagellum. Colonies grown on YPGA medium for 48 h at 25°C are circular, smooth, slightly convex, mucoid, 2-3 mm in diameter and produce the yellow xanthomonadin pigment. They are catalase-positive, oxidase-negative, urease-negative, esculin-positive and do not reduce nitrates. In the API 20NE (bioMérieux) system, they are positive for  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activity, gelatin and the assimilation of glucose, mannose, mannitol, N-acetylglucosamine, maltose, malic acid and trisodium citrate but they are negative for the other tests of the strip. In the API 50CH (bioMérieux), D-arabinose, esculin, D-fucose and L-fucose are utilized. Using BIOLOG GN2 microplates, the strains show metabolic activity on the following carbon sources: D-cellobiose, D-fructose, gentibiose,  $\alpha$ -D-glucose, D-mannose, D-psicose, sucrose, D-trehalose, cis-aconitic-

acid,  $\alpha$ -keto-glutaric-acid, succinic acid, bromosuccinic acid, L-alaninamide, L-glutamic acid and glycyl-L-aspartic acid. The strains lack metabolic activity on:  $\alpha$ -cyclodextrin, N-acetyl-D-galactosamine, adonitol, L-arabinose, i-erythritol, m-inositol, D-mannitol, D-melobiose, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, acetic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic-acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid,  $\gamma$ -hidroxybutyric acid,  $\rho$ -hidroxy phenylacetic acid, itaconic acid,  $\alpha$ -keto valeric acid, sebacic acid, glucuronamide, L-asparagine, L-histidine, L-leucine, L-phenylalanine, L-pyroglutamic acid, D-serine,  $\gamma$ -amino butyric acid, inosine, uridine, thymidine, phenylethyl-amine, putrescine, 2-aminoethanol, 2-3 butanediol, D.L- $\alpha$ -glycerol phosphate,  $\alpha$ -D-glucose, D-glucose-6-phosphate. The predominant fatty acids are (in decreasing order): iso  $C_{15:0}$ , summed feature 3 ( $C_{16:1}$   $\omega 7c$  and/or iso  $C_{15:0}$  2-OH), anteiso  $C_{15:0}$ ,  $C_{16:0}$ , iso  $C_{17:0}$  and iso  $C_{17:1}$   $\omega 9c$ , iso  $C_{11:0}$ ,  $C_{12:0}$  3-OH, iso  $C_{13:0}$  3-OH,  $C_{15:0}$ , iso  $C_{16:0}$ ,  $C_{14:0}$ , iso  $C_{11:0}$  3-OH,  $C_{17:1}$   $\omega 7c$ ,  $C_{10:0}$ , unknown fatty acid of equivalent chain-length (ECL) 11 799,  $C_{18:1}$   $\omega 9c$ ,  $C_{18:1}$   $\omega 7c$  and, as a minor component, anteiso  $C_{17:0}$ .

Strains do not react with the polyclonal antibodies As69V2, 2626-WC and 2626-HT designed for the specific detection of *X. arboricola* pv. *pruni* in a immunofluorescence test and lateral flow immunoassay, respectively.

PCR analyses give negative results using the *X. arboricola* pv. *pruni* primers advised for its identification (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011; Garita-Cambronero *et al.*, 2017).

Strains are clearly differentiated from all other *Xanthomonas* spp. based on a concatenated sequence of *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoD* genes and ANI values obtained by whole genome comparisons.



Strains are pathogenic to *P. persica*, producing necrotic spots after inoculation on detached leaves and whole plants. Additionally, they elicit a hypersensitive reaction when inoculated in tobacco and tomato leaves.

The type strain is IVIA 3287.1 (CFBP 8353<sup>T</sup>)

## 5.6 Acknowledgements

This work was supported by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) research program (project RTA2011-00140-C03-00). P. López-Soriano was supported by a fellowship provided by the INIA (FPI-INIA). We especially thank Clara Morente, Carmina Salcedo and María Teresa Gorris for their excellent technical work, and Marco Scortichini for kindly sending *X. arboricola* pv. *pruni* reference strain. The ANAN platform (Angers, France) is acknowledged for providing facilities for genome sequencing. Martial Briand is acknowledged for IT support for genome analysis.



## **5.7 Supporting information**



**S5.1 Table. Details of strains used in this study.**

Strain <sup>*</sup>	Species	Host	Year of isolation	Origin	Other collection accession numbers <sup>*</sup>
CFBP 8353 <sup>T</sup>	Novel isolate	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	2007	Spain	
CFBP 8354	Novel isolate	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	2007	Spain	
CFBP 8355	Novel isolate	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	2007	Spain	
CITA 44 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i>	<i>Prunus mahaleb</i>	2009	Spain	
CFBP 1846 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	<i>Corylus avellana</i>	1975	France	
CFBP 2528 <sup>T†</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	<i>Juglans regia</i>	1956	New Zealand	ATCC 49083, ICMP 35, LMG 747, NCPPB411
IVIA 2113 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	<i>Juglans regia</i>	2010	Spain	
CFBP 3123 <sup>PT†‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i>	<i>Populus x euramericana</i>	1979	The Netherlands	ICMP 8923, LMG 12141
CFBP 3894 <sup>PT†‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	1953	New Zealand	ATCC 19316, ICMP 51, LMG 852, NCPPB 416
CFBP 5530 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus persica</i>	1989	Italy	CFBP 5530
CFBP 5724 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus amygdalus</i>	Unknown	USA	CFBP 5724
10.0343 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus laurocerasus</i>	2010	The Netherlands	
10.0400 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus laurocerasus</i>	2010	The Netherlands	
10.0439 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus laurocerasus</i>	2010	The Netherlands	
CITA 4 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus persica</i>	2004	Spain	
CITA 9 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus persica</i>	2008	Spain	
CITA 11 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus persica</i>	2008	Spain	
CITA 33 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus amygdalus</i>	2009	Spain	
CITA 46 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus persica</i>	2009	Spain	
CITA 70 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>P. persica</i> x <i>P. amygdalus</i>	2010	Italy	
IVIA 2626.1 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	2002	Spain	

IVIA 2647-1-2 <sup>†</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	2002	Spain	
IVIA 2647-3-1 <sup>†</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	2002	Spain	
IVIA 2826.1 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	2003	Spain	
IVIA 2832.10 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	2003	Spain	
IVIA 3161.2 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus amygdalus</i>	2006	Spain	
IVIA 3162 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus amygdalus</i>	2006	Spain	
IVIA 3487.1 <sup>‡</sup>	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	2008	Spain	
CFBP 5241 <sup>T†</sup>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	1957	United Kingdom	ATCC 33913, ICMP 13, LMG 568, NCPPB 528
CFBP 4188 <sup>T†</sup>	<i>X. cynarae</i>	<i>Cynara scolymus</i>	1996	France	ICMP 16775
CFBP 4925 <sup>T†</sup>	<i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i>	<i>Hedera helix</i>	1994	USA	ICMP 453, ICPB XH5, LMG 733, NCPPB 939
CFBP 2532 <sup>T†</sup>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	1965	India	ATCC 35933, ICMP 3125, LMG 5047, NCPPB 3002
CFBP 2543 <sup>T†</sup>	<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	<i>Sorghum vulgare</i>	1969	New Zealand	ICMP 3103, LMG 736, NCPPB 2417

\* ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA; CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, France; CITA: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Montañana, Zaragoza, España; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Lincoln, New Zealand; ISPAVE: Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Roma, Italy; IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia, España; LMG: Laboratorium voor Mikrobiologie, Universiteit Gent, Gent, Belgium; NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, UK.

<sup>†</sup> Strains included in the API 20 NE and API 50 CH tests.

<sup>‡</sup> Strains included in the BIOLOG assay.

## **Capítulo 6**

### **Discusión general**





## Discusión general

La mancha bacteriana es una de las enfermedades más graves que afectan a los frutales de hueso y al almendro. Está causada por la bacteria *X. arboricola* pv. *pruni*, patógeno que está considerado como organismo de cuarentena tanto por la UE como por la EPPO. En los últimos años se han producido muchos brotes de esta enfermedad en varios países de Europa, entre los que se encuentra España, por lo que se trata de una enfermedad emergente en este continente. Es por tanto necesario aumentar nuestro conocimiento sobre este patógeno para poder desarrollar y mejorar estrategias de control efectivas. Como ocurre con la mayoría de las bacteriosis de plantas, la mancha bacteriana es muy difícil de controlar una vez establecida, por lo que dichas estrategias deberán ir destinadas en primer lugar a la prevención de la enfermedad, tomando las medidas necesarias para evitar o reducir nuevas introducciones, y en segundo lugar, deberán centrarse en minimizar los costes derivados de la enfermedad, reduciendo su incidencia y limitando su diseminación a nuevas áreas.

Uno de los pilares sobre los que se sustenta una buena estrategia de control preventivo es la disposición de métodos de detección eficientes, que permitan un diagnóstico de la enfermedad rápido y preciso para poder tomar, en el menor tiempo posible, las medidas necesarias para su control. En ese sentido, como primer objetivo de esta tesis, se ha desarrollado un prototipo de tiras de flujo lateral que permite la rápida detección de *X. arboricola* pv. *pruni* en muestras de campo naturalmente infectadas y proporciona una herramienta alternativa a los métodos tradicionales de diagnóstico.

Las tiras de flujo lateral se desarrollaron a partir de dos anticuerpos policlonales previamente obtenidos a partir de *X. arboricola* pv. *pruni* (2626-WC y 2626-HT). El

uso de cada uno de esos anticuerpos por separado no permitía una detección específica del patógeno mediante test ELISA, observándose reacciones cruzadas con otras especies de *Xanthomonas* como *X. campestris* pv. *campestris*, *X. hortorum* pv. *pelargonii*, *X. axonopodis* pv. *vitians*, *X. vesicatoria* o *X. cynarae* (López *et al.*, 2010; Palacio-Bielsa *et al.*, 2012). Sin embargo, su uso combinado en las tiras de flujo lateral, uno de ellos conjugado con nanopartículas de carbono (2626-WC) y el otro fijo en la línea de ensayo de la tira (2626-HT), permite una detección más específica de *X. arboricola* pv. *pruni*. Esta diferencia de especificidad observada entre el test ELISA y las tiras de flujo lateral usando los mismos anticuerpos podría deberse a que en cada técnica serológica intervienen distintos antígenos, que hacen que en unos casos se produzcan reacciones cruzadas con cepas de otras especies y en otros casos no. En nuestro caso, las tiras de flujo lateral dieron resultado positivo con las 87 cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* analizadas, procedentes de nueve países de tres continentes distintos y aisladas en los principales huéspedes de la bacteria. Aún así, también se obtuvo resultado positivo con cuatro cepas de *X. arboricola* pv. *corylina*, agente causal de la mancha y necrosis bacteriana del avellano (Lamichhane y Varvaro, 2014). Sin embargo, el hecho de que las cepas de este patovar nunca se hayan aislado en especies del género *Prunus* no limita la fiabilidad práctica de las tiras de flujo lateral como herramienta eficaz para la detección específica de *X. arboricola* pv. *pruni*.

Las tiras de flujo lateral han demostrado su fiabilidad y precisión para el análisis de muestras sintomáticas y los resultados obtenidos son comparables a los mostrados por dos de las técnicas más utilizadas de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico de bacterias fitopatógenas, como son el aislamiento en medio de cultivo y la PCR en tiempo real. Además presentan una serie de

ventajas, como su sencillez, su bajo coste y su facilidad de uso, por lo que no se necesita personal cualificado ni entrenamiento previo para su empleo. Pero sin duda, su principal ventaja es que permiten su uso directamente en campo, obteniendo con ellas resultados precisos en menos de 15 minutos, lo que le convierte en una excelente herramienta para realizar un diagnóstico preliminar de la mancha bacteriana. Además, permiten descartar la infección por otros patógenos de frutales de hueso que causan síntomas similares como *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*, *P. syringae* pv. *syringae* (López *et al.*, 2012) o incluso el nuevo patógeno descrito en esta tesis *X. prunicola*, cuyas cepas se analizaron con las tiras dando resultado negativo.

En ese sentido, se está pensando en su posible comercialización, para lo que se contactará con distintas empresas del sector del diagnóstico fitopatológico, como por ejemplo la empresa norteamericana Agdia, que ya ha mostrado interés en adquirir los anticuerpos obtenidos en el IVIA para comercializar kits de diagnóstico. El objetivo final es que esta técnica pueda ser aplicada de forma rutinaria por inspectores, viveristas y técnicos. Para ello, será necesario realizar una validación adicional mediante el análisis de muestras naturalmente infectadas de distintos orígenes geográficos y cubriendo toda la gama de huéspedes de la bacteria, además de muestras preparadas con distintas dosis de inóculo según indica la EPPO (EPPO, 2014). Los análisis se deberán realizar en distintos laboratorios para evaluar la robustez de este método.

Otro aspecto fundamental a tener en cuenta para el desarrollo de una estrategia de control eficiente frente a *X. arboricola* pv. *pruni*, es el conocimiento de la diversidad y la epidemiología del patógeno, así como sus rutas de entrada en nuevas áreas, que nos proporcionan información muy valiosa para el diseño de estrategias preventivas encaminadas tanto a evitar nuevas introducciones como a

impedir la diseminación de la bacteria. En ese sentido, como segundo objetivo de esta tesis, se ha evaluado la diversidad genética existente en una colección de 239 cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* aisladas en España, representativas de los distintos brotes de la enfermedad que se han producido en 11 provincias desde que se detectó por primera vez en 2002, con el objetivo de conocer las posibles relaciones entre ellas y su origen en España. Este es el primer estudio en el que se evalúa la diversidad genética de una amplia colección de cepas *X. arboricola* pv. *pruni* aisladas en un solo país. Además, dicha colección contiene prácticamente la totalidad de las cepas que se han aislado en España hasta el año 2013, dado que son las que se han recibido en el Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas del Ministerio de Agricultura desde la primera detección.

*X. arboricola* pv. *pruni* es un patógeno que presenta muy baja diversidad genética entre sus cepas, como ha quedado demostrado en numerosos estudios utilizando diversas metodologías (Zaccardelli *et al.*, 1999; Boudon *et al.*, 2005; Barionovi y Scortichini, 2006; Fischer-Le Saux *et al.*, 2015), por lo que se decidió usar la técnica del MLVA, que había demostrado su gran poder de resolución en anteriores trabajos con esta bacteria (Bergsma-Vlami *et al.*, 2012; Cesbron *et al.*, 2014).

El análisis de la estructura poblacional de la colección de cepas españolas ha mostrado que ésta es muy heterogénea genéticamente, ya que se han clasificado las cepas en 18 grupos genéticos claramente diferenciados. En general, no han podido establecerse relaciones entre la mayoría de las cepas aisladas en las distintas provincias españolas, ya que los análisis comparativos entre ellas mostraron diferencias significativas, sugiriendo que los distintos brotes se han producido como resultado de múltiples introducciones de la bacteria en España. Incluso en algún caso, cepas aisladas en la misma provincia y en el mismo año han

mostrado grandes diferencias a nivel genético. Resulta muy interesante el caso de las cepas aisladas en la provincia de Badajoz en 2002, y que son las responsables del establecimiento inicial del patógeno en España. Estas cepas procedían de cuatro brotes diferentes y mostraron unos perfiles genéticos muy distintos entre sí, lo que podría indicar que cada uno de los brotes tuvo un origen diferente.

Aún así, los resultados del MLVA sí que nos han permitido relacionar en algún caso, cepas aisladas en al menos seis provincias y que mostraban perfiles genéticos muy parecidos, idénticos en algunos casos, indicando que podrían tener el mismo origen. Lo más llamativo es que en todos estos casos la mayoría de las cepas se aislaron en dos viveros de Valencia y Zaragoza, respectivamente, entre los cuales tenemos evidencias de que ha habido intercambio de material vegetal. En ese sentido, aparte del gran poder de resolución del MLVA, ha sido fundamental disponer de información adicional sobre las cepas gracias a los laboratorios de Sanidad Vegetal de las distintas comunidades autónomas, que nos ha permitido conocer, en algunos casos con exactitud, de qué planta procedía cada una de las cepas y si éstas a su vez procedían de un vivero o de otro.

Ello nos permite destacar el papel que juegan los viveros, tanto en la introducción de *X. arboricola* pv. *pruni* en España, constituyendo las principales vías de entrada del patógeno, como en su diseminación a nivel local. En los últimos años se han producido varias intercepciones de material vegetal contaminado en viveros españoles procedentes de otros países (Palacio-Bielsa *et al.*, 2014), principalmente de Italia, donde la enfermedad es endémica en muchas zonas (Battilani *et al.*, 1999). En algunos casos se trataba de plantas asintomáticas con infecciones latentes, ya que esta bacteria puede sobrevivir en varios órganos de la planta sin producir síntomas (Shepard y Zehr, 1994; Palacio-Bielsa *et al.*, 2014; Loreti *et al.*, 2015). Por lo tanto, es muy probable que estas plantas pasen de un

vivero a otro de forma inadvertida, y de ahí a campo, y que solo cuando se den las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad aparezcan los primeros síntomas.

Es conveniente resaltar, que la metodología diseñada también puede ser aplicada al análisis de la relación entre nuevos brotes de la bacteria en España o en otros países europeos, lo que permitiría conocer mejor las vías de diseminación de la bacteria en la UE y por lo tanto, poder diseñar estrategias preventivas más eficientes.

Por otro lado, se intentó evaluar si era posible encontrar un posible origen de las cepas españolas comparándolas con 25 cepas de referencia de *X. arboricola* pv. *pruni* procedentes de ocho países de tres continentes distintos. Los resultados mostraron grandes diferencias entre ellas, no permitiendo de forma clara relacionar nuestras cepas con las del resto de países. Pero también es cierto que nuestro esquema de MLVA, formado principalmente por microsatélites, no es el más adecuado para evaluar las relaciones filogenéticas entre cepas poco relacionadas epidemiológicamente (Pruvost *et al.*, 2014; Leduc *et al.*, 2015; Poulin *et al.*, 2015). Para ese tipo de análisis habría que recurrir a otro tipo de marcadores con una tasa evolutiva más baja, como son los minisatélites (Bui Thi Ngoc *et al.*, 2009a; 2009b). Además, se deberían incluir muchas más cepas de otros países, especialmente de aquellos de los que se importa material vegetal de propagación, tema que deberá ser objeto de futuras investigaciones.

Finalmente, entre la diversidad de cepas de *Xanthomonas* españolas obtenidas en especies de frutales del género *Prunus*, se seleccionaron tres cepas aisladas en una parcela de nectarinos en la provincia de Murcia, región donde nunca se ha detectado *X. arboricola* pv. *pruni*, en la que se observaron árboles con síntomas

similares a los producidos por esta bacteria. Se caracterizaron tres aislados cuyas colonias presentaban un fenotipo típico de *Xanthomonas*. En un primer momento se pensó que dichas cepas pertenecían a *X. arboricola* pv. *pruni*, ya que se habían aislado en una especie del género *Prunus* y los síntomas coincidían con los producidos por este patógeno. Al iniciar el proceso de identificación de las cepas, los primeros análisis basados por un lado, en un test de inmunofluorescencia usando un anticuerpo policlonal obtenido a partir de *X. arboricola* pv. *pruni*, y por otro, en un protocolo de PCR usando iniciadores específicos para este patógeno, resultaron negativos, además el perfil bioquímico basado en test API 20 NE y API 50 CH tampoco coincidía con el de *X. arboricola* pv. *pruni*, por lo que todo hacía indicar que las cepas no solo no pertenecían a este patovar, sino que podía tratarse de una nueva especie. A la vista de estos resultados, y como tercer objetivo de esta tesis, se decidió realizar una caracterización de las tres cepas a través de un estudio polifásico (Kämpfer y Glaeser, 2011) incluyendo una combinación de métodos fenotípicos y técnicas moleculares, que es obligatorio para la correcta descripción de una nueva especie (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2002).

En primer lugar, el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de las tres cepas reveló que éstas pertenecen al género *Xanthomonas*, sin embargo, el bajo poder de resolución de este método debido a la naturaleza conservadora de este gen, no permite la clasificación a nivel de especie en este género (Richter y Rosselló-Mora, 2009; Kämpfer y Glaeser, 2011). En ese sentido, las tres cepas se analizaron con las dos técnicas más utilizadas actualmente para definir una nueva especie bacteriana y que sustituyen a la ya obsoleta hibridación ADN-ADN como técnicas de referencia en estudios taxonómicos (Goris *et al.*, 2007; Richter y Rosselló-Mora, 2009). Por un lado, el análisis multilocus basado en los genes *dnaK*, *fyuA*,

*gyrB* y *rpoD* (Young *et al.*, 2008), que se ha usado con éxito en la descripción de otras especies de *Xanthomonas* (Young *et al.*, 2010), y por otro, los valores de ANI (Konstantinidis y Tiedje, 2005) obtenidos al comparar el genoma de las nuevas cepas con el de otras especies de *Xanthomonas*.

Los resultados de las técnicas moleculares unidos a los perfiles bioquímicos obtenidos en la caracterización fenotípica, confirman claramente que las tres cepas aisladas de nectarino constituyen una nueva especie dentro del género *Xanthomonas*, para la que se ha propuesto el nombre de *Xanthomonas prunicola*, dado que se desconocen otras características diferenciales de la misma y solo se ha aislado de nectarino.

Sin embargo es muy posible que esta especie esté también presente en otras zonas o incluso en otros huéspedes y que posiblemente se haya identificado erróneamente como *X. arboricola* pv. *pruni* al tratarse de una especie de *Xanthomonas* aislada de *Prunus*. En este sentido es interesante señalar que por tratarse de un organismo de cuarentena, que no había sido detectado previamente en Murcia, los análisis para su correcta identificación, fueron exhaustivos desde su detección, mientras que en otros países o zonas el diagnóstico se realiza en base a un menor número de técnicas. La utilización de los protocolos de PCR en tiempo real de Palacio-Bielsa *et al.* (2011) y de Garita-Cambronero *et al.* (2017), que resultan negativos para esta nueva especie, son dos técnicas rápidas que nos permiten descartar su identidad como *X. arboricola* pv. *pruni*.

Respecto a la posible gravedad de la enfermedad causada por *X. prunicola*, los resultados de las inoculaciones realizadas en melocotonero demostraron que las cepas son capaces de producir síntomas inequívocos de infección, confirmando de



esta manera su poder patógeno, aunque la gravedad de los síntomas observados en la plantación de nectarino no fue alarmante. Sin embargo, la prudencia aconseja no considerar estos datos como definitivos, en tanto en cuanto no se disponga de nueva información sobre esta bacteria en nuevas variedades, especies y localizaciones geográficas con distintas condiciones medioambientales.

Trabajos anteriores han demostrado que es frecuente encontrar en frutales del género *Prunus*, cepas atípicas de *X. arboricola* diferentes de *X. arboricola* pv. *pruni* cohabitando en los mismos huéspedes, si bien es cierto que la gran mayoría de esas cepas se caracterizan por su escasa virulencia, ya que no son capaces de producir enfermedad en especies de dicho género. Los análisis filogenéticos llevados a cabo por Garita-Cambronero *et al.* (2016a; 2016b; 2016c; 2017) con una selección de esas cepas atípicas, confirmaron que pertenecen a *X. arboricola*, aunque no forman parte de ninguno de los patovares descritos en esta especie. Aparte de estas cepas no patógenas, en esta tesis se ha confirmado que es posible encontrar otras cepas de *Xanthomonas* que sí que son capaces de producir enfermedad en frutales del género *Prunus* y que además no pertenecen a la especie *X. arboricola*, como es el caso de las de *X. prunicola*. Como en principio los daños económicos producidos por esta nueva especie no parecen tan graves como los ocasionados por *X. arboricola* pv. *pruni*, nos podemos encontrar ante un escenario similar al descrito para otras especies de *Xanthomonas* de reconocido poder patógeno como *X. citri* subsp. *citri*, *X. fragariae* o *X. populi*, en los que a partir del mismo huésped (cítricos, fresa y chopo), se han ido descubriendo otras especies que, aún siendo patógenas, no se caracterizan por ocasionar graves daños en sus huéspedes ni generar grandes pérdidas económicas. Se trata de *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (Graham y Gottwald, 1990; Schaad *et al.*, 2007), agente causal de la mancha bacteriana de los cítricos, y que es una enfermedad

menor en este grupo de plantas, *X. arboricola* pv. *fragariae* (Janse *et al.*, 2001), responsable de la mancha foliar de la fresa, pero cuyas cepas muestran escasa virulencia (Vandroemme *et al.*, 2013; Fischer-Le Saux *et al.*, 2015) y *X. arboricola* pv. *populi* (De Kam, 1984), agente causal de la necrosis de la corteza del chopo y que está considerado como un patógeno oportunista (Haworth y Spiers, 1992). En cualquier caso, sería conveniente que en trabajos posteriores se evaluara la capacidad de infección de las cepas de esta nueva especie en campo, así como comprobar su poder patógeno en otras especies, tanto de frutales de hueso como de almendro.

En conclusión, los trabajos presentados en esta memoria aportan información valiosa que puede ser de gran ayuda a la hora de desarrollar nuevas estrategias de control frente a *X. arboricola* pv. *pruni*, tanto para su prevención, evitando nuevas introducciones principalmente a través de material vegetal asintomático, como para su diagnóstico en campo de una manera rápida y eficaz. Además, con la descripción de una nueva especie de *Xanthomonas*, se abre la puerta a futuros estudios acerca de este patógeno y del impacto que puede tener tanto en los frutales del género *Prunus*, como en otros géneros de plantas.

## **Capítulo 7**

### **Conclusiones**



## Conclusions

1. The lateral flow immunoassay developed in this study can be used as an alternative screening tool for a rapid and reliable on-site diagnosis of the bacterial spot disease caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in symptomatic field samples. It combines the advantages of enough specificity and sensitivity, low cost, and rapid and simple operation, allowing non-experienced users to obtain reliable results in less than 15 minutes.
2. The specificity and sensitivity showed by the lateral flow immunoassay is good enough for an accurate detection of *X. arboricola* pv. *pruni*, since the only cross-reaction observed was with *X. arboricola* pv. *corylina*, a pathogen never reported in *Prunus* species.
3. Important advantages of the developed lateral flow immunoassay over other diagnostic techniques for *X. arboricola* pv. *pruni* are that sensitivity is not affected by the presence of potential inhibitors in leaf extracts from the different *Prunus* hosts assayed, and that it is able to detect VBNC cells of the pathogen.
4. Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis is an efficient tool to assess the genetic diversity of *X. arboricola* pv. *pruni* strains at small spatio-temporal scales, such as those represented by the Spanish provinces in a period of eleven years.

5. The outbreaks caused by *X. arboricola* pv. *pruni* in Spain are the result of multiple introductions of this pathogen, mainly by the importation of contaminated plant material through the nurseries.
6. Spanish nurseries also contribute to the local dissemination of *X. arboricola* pv. *pruni* by the exchange of asymptomatic plant material, that may be latently infected since this pathogen can survive endophytically in the plant without causing symptoms. This fact shows that visual inspections of typical symptoms are insufficient to ascertain their sanitary status.
7. Phenotypic and molecular characterization of three bacterial strains isolated from symptomatic nectarines with symptoms similar to those caused by *X. arboricola* pv. *pruni* has confirmed that they constitute a new species of the genus *Xanthomonas*.
8. The novel strains are pathogenic for *Prunus*, causing necrotic lesions when inoculated on detached leaves and whole peach plants, thus confirming their pathogenicity. The name *Xanthomonas prunicola* has been proposed for the new species.

## **Bibliografía general**





**Aarrouf J, Garcin A, Lizzi Y, Maâtaoui ME.** 2008. Immunolocalization and histocytopathological effects of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on naturally infected leaf and fruit tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Phytopathology* **156**: 338-345.

**Abdi H.** 2007. Metric multidimensional scaling (MDS): Analyzing distance matrices. En: *Encyclopedia of measurement and statistics* (Salkind, N ed), pp: 1-13. Sage, Thousand Oaks, CA.

**Achtman M.** 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology* **62**: 53-70.

**Akhtar MA, Rahber-Bhatti MH, Haque MI.** 1995. Bacterial spot of almond caused by *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in Pakistan. *Pakistan Journal of Phytopathology* **7**: 88-89.

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.

**Álvarez AM.** 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 339-366.

**Álvarez AM, Benedict AA, Mizumoto CY, Hunter JE, Gabriel DW.** 1994. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* **84**: 1449-1457.

**Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P.** 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 535-544.

**Anuchin AM, Mulyukin AL, Suzina NE, Duda VI, El-Registan GI, Kaprelyants AS.** 2009. Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology. *Microbiology* **155**: 1071-1079.

**Arrieta-Ortiz ML, Rodríguez-R LM, Pérez-Quintero AL, Poulin L, Díaz AC, Arias Rojas N, Trujillo C, et al.** 2013. Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151. *PLoS ONE* **8**: e79704.

**Ballard EL, Dietzgen RG, Sly LI, Gouk C, Horlock C, Fegan M.** 2011. Development of a Bio-PCR protocol for the detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Plant Disease* **95**: 1109-1115.

**Balloux F, Lugon-Moulin N.** 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**: 155–165.

**Barionovi D, Scortichini M.** 2006. Assessment of integron gene cassette arrays in strains of *Xanthomonas fragariae* and *X. arboricola* pvs. *fragariae* and *pruni*. *Journal of Plant Pathology* **88**: 279-284.

**Barionovi D, Scortichini M.** 2008. Integron variability in *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains. *FEMS Microbiology Letters* **288**: 19-24.

**Battilani P, Rossi V, Saccardi A.** 1999. Development of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* epidemics on peaches. *Journal of Plant Pathology* **81**(3): 161-171.

**Bazzi C, Mazzucchi U.** 1980. Epidemia di *Xanthomonas pruni* su susino. *Informatore Fitopatologico* **30**: 11-17.

**Bazzi C, Stefani E, Minardi P, Mazzucchi U.** 1990. Suscettibilità comparativa del susino a *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Informatore Agrario* **46**: 71-74.

**Benson G.** 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* **27**: 573–580.

**Bergsma-Vlami M, Martin W, Koenraadt H, Teunissen H, Pothier JF, Duffy B, van Doorn J.** 2012. Molecular typing of Dutch isolates of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* isolated from ornamental cherry laurel. *Journal of Plant Pathology* **94**(Supplement 1): S1.29-S1.35.

**Berthier Y, Verdier V, Guesdon JL, Chevrier D, Denis JB, Decoux G, Lemattre M.** 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:851-859.

**Biondi E, Dallai D, Brunelli A, Bazzi C, Stefani E.** 2009. Use of a bacterial antagonist for the biological control of bacterial leaf/fruit spot of stone fruits. *IOBC Bulletin* **43**: 277-281.

**Boonham N, Glover R, Tomlinson J, Mumford R.** 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **121**: 355-363.

**Borges CD, Vendruscolo CT.** 2008. Xanthan synthesized by strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: production, viscosity and chemical composition. *Bioscience Journal* **23**: 67-73.

**Boudon S, Manceau C, Nottéghem JL.** 2005. Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology* **95**: 1081-1088.

**Bradbury JF.** 1984. Genus II. *Xanthomonas*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg NR, Holt JG, eds) Vol.1, pp: 199-210, Williams & Wilkins. Baltimore, USA.

**Bradbury JF.** 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB international, Farnham Royal, United Kingdom.

**Bragard C, Verhoyen M.** 1993. Monoclonal-antibodies specific for *Xanthomonas campestris* bacteria pathogenic on wheat and other small grains, in comparison with polyclonal antisera. *Phytopathologische Zeitschrift* **139**: 217-228.

**Braun-Kiewnick A, Altenbach D, Oberhänsli T, Bitterlin W, Duffy B.** 2011. A rapid lateral-flow immunoassay for phytosanitary detection of *Erwinia amylovora* and on-site fire blight diagnosis. *Journal of Microbiological Methods* **87**: 1-9.

**Bui Thi Ngoc L, Vernière C, Jarne P, Brisse S, Guérin F, Boutry S, Gagnevin L, Pruvost O.** 2009a. From local surveys to global surveillance: three high-throughput genotyping methods for epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1173-1184.

**Bui Thi Ngoc L, Vernière C, Vital K, Guérin F, Gagnevin L, Brisse S, Ah-You N, Pruvost O.** 2009b. Fourteen minisatellite markers for population studies of the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *Molecular Ecology Resources* **9**: 125-127.

**Bühlmann A, Dreo T, Rezzonico F, Pothier JF, Smits THM, Ravnikar M, Frey JE, Duffy B.** 2014. Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental Microbiology* **16**: 2112-2125.

**Bühlmann A, Pothier JF, Tomlinson JA, Frey JE, Boonham N, Smits THM, Duffy B.** 2013. Genomics-informed design of loop-mediated isothermal amplification for detection of phytopathogenic *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* at the intraspecific level. *Plant Pathology* **62**: 475-484.

**Burkholder WH, Starr MP.** 1948. The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* **38**: 494-502.

**Cambra M, López MM.** 1978. Titration of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* antibodies by using enzyme labeled anti-rabbit  $\gamma$ -globulines (ELISA indirect method). En: *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, ed. Station Pathologie Végétale, INRA Angers, pp: 327-331.

**Cesbron S, Pothier J, Gironde S, Jacques MA, Manceau C.** 2014. Development of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Xanthomonas arboricola* pathovars. *Journal of Microbiological Methods* **100**: 84-90.

**Civerolo EL, Sasser M, Heike C, Burbage D.** 1982. Selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Plant Disease* **66**: 39-43.

**Coletta-Filho HD, Takita MA, Alves de Souza A, Aguilar-Vildoso CI, Machado MA.** 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4091–4095.

**Craig L, Li J.** 2008. Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current Opinion in Structural Biology* **18**: 267–77.

**Craig L, Pique ME, Tainer JA.** 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 363–378.

**Dallai D, Dondini L, Giovanardi D, Stefani, E.** 2012. Elicitation of resistance to the bacterial canker of stone fruits with copper glucohumates. En: *1st International Congress on Bacterial Diseases of Stone Fruits and Nuts, Zurich, Switzerland*, pp: 27.

**Dallai D, Parkinson N, Giovanardi D, Stefani E.** 2009. Population studies of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* and new strategies to its control in peach orchards. *Journal of Plant Pathology* **91**: S4.57.

**Davis C.** 2014. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **103**: 9-17.

**De Boer SH, López MM.** 2012. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. *Annual Review of Phytopathology* **50**: 197-218.

**De Kam M.** 1984. *Xanthomonas campestris* pv. *populi*, the causal agent of bark necrosis in poplar. *European Journal of Plant Pathology* **90**: 13-22.

**Del Campo R, Russi P, Mara P, Mara H, Peyrou M, Ponce de León IP, Gaggero C.** 2009. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiology Letters* **298**: 143-148.

**Denoeud F, Vergnaud G.** 2004. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. *BMC Bioinformatics* **5**: 1–12.

**Dhavantari BN.** 1971. Overwintering sources of inoculum of bacterial spot of peach (*Xanthomonas pruni*) in southwestern Ontario. *Proceedings of the Canadian Phytopathological Society* **37**: 21-30.

**Donat V, Biosca EG, Peñalver J, López MM.** 2007. Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 1639–1649.

**Dowson DW.** 1939. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* **100**: 177–193.

**Duglosch KM, Parker IM.** 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptative evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**: 431-449.

**Dunegan JC.** 1932. The bacterial spot disease of the peach and other stone fruits. *Technical Bulletin US Department of Agriculture*, Washington, DC, USA, No. **273**: 53.

**Du Plessis HJ.** 1984. Scanning electron microscopy of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in plum petioles and buds. *Journal of Phytopathology* **109**: 277-284.

**Du Plessis HJ.** 1986. Systemic migration and establishment of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in plum leaves and twigs. *Journal of Phytopathology* **116**: 221-227.

**Du Plessis HJ.** 1987. Canker development on plum shoots following systemic movement of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* from inoculated leaves. *Plant Disease* **12**: 1078-1080.

**Du Plessis HJ.** 1988. Bacterial spot disease of stone fruits: overview of findings. *Deciduous Fruit Grower* **38**: 128-132.

**Dye DW.** 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia* .1. The "amylovora" group. *New Zealand Journal of Science* **11**: 590-607.

**Dye DW, Bradbury JF, Goto M, Hayward AC, Lelliott RA, Schroth MN.** 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotypes. *Review of Plant Pathology* **59**: 153-168.

**Dye DW, Lelliott RA.** 1974. Genus II. *Xanthomonas*. En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Buchanan RE, Gibbons NE, eds), pp: 243-249, 8th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.



**Edstrom JP.** 2007. Colusa Orchard Newsletter. University of California. Cooperative Extension Colusa County.

Online: [http://cecolusa.ucdavis.edu/newsletterfiles/Orchard\\_Topics9672.pdf](http://cecolusa.ucdavis.edu/newsletterfiles/Orchard_Topics9672.pdf)

**Essakhi S, Cesbron S, Fischer-Le Saux M, Bonneau S, Jacques MA, Manceau C.** 2015. Phylogenetic and variable-number tandem-repeat analyses identify nonpathogenic *Xanthomonas arboricola* lineages lacking the canonical type III secretion system. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 5395-5410.

**Estoup A, Guillemaud T.** 2010. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* **19**: 4113-4130.

**European Food Safety Authority (EFSA).** 2014. Scientific opinion on pest categorisation of *Xanthomonas arboricola* pv . *pruni* (Smith , 1903). *EFSA Journal* **12**: 1-25.

**European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).** 2004. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*. *EPPO Bulletin* **34**: 179-181.

**European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).** 2006. Standards PM 7/64. Diagnostics *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *EPPO Bulletin* **36**: 129-133.

**European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).** 2009. First report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in the Netherlands on ornamental *Prunus laurocerasus*. *EPPO Reporting Service* **9**: 2009/178.

**European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).** 2014. Standards PM 7/98(2). Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* **44**(2): 117-147.

**European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).** 2017. EPPO Plant Quarantine Data Retrieval system. Online: <https://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>

**Excoffier L, Laval G, Schneider S.** 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**: 47-50.

**FAO.** 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations statistics division. Online: <http://www.faostat3.fao.org>

**Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* **186**: 1518-1530.

**Ferreira-Tonin M, Rodrigues-Neto J, Harakava R, Lanza Destéfano SA.** 2012. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial rpoB gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP. *International Journal of Systematic Bacteriology* **62**: 1419-1424.

**Fischer-Le Saux M, Bonneau S, Essakhi S, Manceau C, Jacques MA.** 2015. Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones that are distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 4651-4668.

**Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA.** 2012. PHYLOViZ: Phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* **13**: 87.

**Garcin A, Bresson J.** 2009. Sensibilité des arbres à noyaux au *Xanthomonas*. Bilan de 8 ans d'expérimentation. *Infos CTIFL* **254**: 30-35.

**Garcin A, Bresson J, Fabresse M, Neyrand S.** 2008. Orchard susceptibility of stone fruit cultivars to *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. IOBC, Working Group "Integrate plant protection in stone fruit". *IOCB/WPRS Bulletin* **37**:91-95.

**Garcin A, Herreman T.** 2014. Sensibilité varietal des fruits à noyau au *Xanthomonas*. Bilan de 12 ans d'expérimentation. *INFOS CTIFL* **304**: 41-47.

**Garcin A, Rouzet J, Notteghem JL.** 2005. *Xanthomonas* des arbres fruitiers à noyau. *Éditions CTIFL, Paris, France*, pp: 95.

**Garcin A, Vibert J, Leclerc L.** 2011. *Xanthomonas* sur pêcher: étude des conditions d'infection (1re Partie). Développement de l'outil. *INFOS CTIFL* **268**: 26-33.

**Garita-Cambronero J, Palacio-Bielsa A, López MM, Cubero J.** 2016a. Draft genome sequence for virulent and avirulent strains of *Xanthomonas arboricola* isolated from *Prunus* spp. in Spain. *Standards in Genomic Sciences* **11**: 12.

**Garita-Cambronero J, Palacio-Bielsa A, López MM, Cubero J.** 2016b. Draft genome sequence of two strains of *Xanthomonas arboricola* isolated from *Prunus persica* which are dissimilar to strains that cause bacterial spot disease on *Prunus* spp. *Genome Announcements* **4**: e00974-16.

**Garita-Cambronero J, Palacio-Bielsa A, López MM, Cubero J.** 2016c. Comparative genomic and phenotypic characterization of pathogenic and non-pathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* reveals insights into the infection process of bacterial spot disease of stone fruits. *PLoS ONE* **11**(8): e0161977.

**Garita-Cambronero J, Palacio-Bielsa A, López MM, Cubero J.** 2017. Pan-genomic analysis permits differentiation of virulent and non-virulent strains of *Xanthomonas arboricola* that cohabit *Prunus* spp. and elucidate bacterial virulence factors. *Frontiers in Microbiology* **8**: 573.

**Garita-Cambronero J, Sena-Vélez M, Palacio-Bielsa A, Cubero J.** 2014. Draft genome sequence of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strain Xap33, causal agent of bacterial spot disease on almond. *Genome announcements* **2**: e00440-14.

**Gasperini C, Bazzi C, Mazzucchi U.** 1984. Autumn inoculation of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* through leaf scars in plum trees in the Po valley. *Phytopathologia Mediterranea* **23**: 60-62.

**Ghezzi JI, Steck TR.** 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 203-208.

**Golmohammadi M, Cubero J, López MM, Llop P.** 2013. The viable but non-culturable state in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a reversible state induced by low nutrient availability and copper stress conditions. *Journal of Life Sciences* **7**: 1019-1029.

**Goodman CA, Hattingh MJ.** 1986. Transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in plum and apricot nursery trees by budding. *HortScience* **21**: 995-996.

**Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM.** 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**:81-91.

**Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, López R.** 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* **38**: W695–W699.

**Graham JH, Gottwald TR.** 1990. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. *Phytopathology* **80**: 190-196.

**Hajri A, Pothier JF, Fischer Le-Saux M, Bonneau S, Poussier S, Boureau T, Duffy B, Manceau C.** 2012. Type three effector gene distribution and sequence analysis provide new insights into the pathogenicity of plant-pathogenic *Xanthomonas arboricola*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 371-384.

**Hall T.** 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Bioscience* **2**: 60-61.

**Hammerschlag FA.** 1988. Screening peaches in vitro for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Journal of American Horticultural Sciences* **113**: 164-166.

**Hammerschlag FA, Werner DJ, Ritchie DF.** 1994. Stability of bacterial leaf spot resistance in peach regenerants under in vitro, greenhouse and field conditions. *Euphytica* **76**: 101-106.

**Haworth RH, Spiers AG.** 1992. Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *populi* from stem lesions on *Salix matsudana* X *alba* 'Aokautere' in New Zealand. *European Journal of Forest Pathology* **22**: 247-251.

**Hayward AC.** 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature (London)* **186**: 405-406.

**Hodgetts J, Karamura G, Johnson G, Hall J, Perkins K, Beed F, Nakato V, et al.** 2015. Development of a lateral flow device for in-field detection and evaluation of PCR-based diagnostic methods for *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, the causal agent of banana xanthomonas wilt. *Plant Pathology* **64**: 559-567.

**Holtz B, Doll D, Duncan R, Edstrom J, Michailides T, Adaskaveg J.** 2013. Bacterial spot on almond found in the San Joaquin Valley. Almond Digest. University of California Cooperative Extension. San Joaquin County, CA. Online: <http://www.ipm.ucdavis.edu/PDF/MISC/168605.pdf>

**Hori K, Matsumoto S.** 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* **48**: 424–434.

**Hulme PE.** 2009. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* **46**: 10-18.

**Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R.** 2007. Dendroscope: an interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC bioinformatics* **8**: 460.

**Irey M, Gottwald TR, Graham JH, Riley TD, Carlton G.** 2006. Post-hurricane analysis of citrus canker II: predictive model estimation of disease spread and area

potentially impacted by various eradication protocols following catastrophic weather events. *Plant Health Prog* doi: 10.1094/PHP-2006-0822-1001-RS.

**Jacques MA, Arlat M, Boulanger A, Boureau T, Carrère S, Cesbron S, Chen NWG et al.** 2016. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology* **54**: 163–187.

**Janse JD, Rossi MP, Gorkink RFJ, Derks JHJ, Swings J, Janssens D, Scortichini M.** 2001. Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria* (x) *ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology* **50**:653-665.

**Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M et al.** 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142**: 1881-1893.

**Jindal KK, Sharma RC, Gupta VK.** 1989. Chemical control of bacterial leaf spot and gummosis caused by *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in almond (*Prunus dulcis*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* **59**: 754-755.

**Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW.** 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 755-762.

**Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW.** 2006. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 925-927.

**Kalinowski ST.** 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* **5**: 187-189.

**Kämpfer P, Glaeser SP.** 2011. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasic approach revisited. *Environmental Microbiology* **14**(2): 291-317.

**Kawaguchi A.** 2014. Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains in Japan revealed by DNA fingerprinting. *Journal of General Plant Pathology* **80**: 366-369.

**Kawaguchi A, Inoue K, Inoue Y.** 2014. Biological control of bacterial spot on peach by non-pathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. *Journal of General Plant Pathology* **80**: 158-163.

**Klement Z, Farkas GL, Lovrekovich L.** 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* **54**: 474-477.

**Kogure K, Simidu U, Taga N.** 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **25**: 415-420.

**Koike H.** 1964. The aluminium-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. *Phytopathology* **55**: 317-319.

**Konstantinidis K, Tiedje JM.** 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 2567-2592.

**Kumar S, Stecher G, Tamura K.** 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**(7): 1870-1874.



**Lai CJ, Chen SY, Lin IH, Chang CH, Wong HC.** 2009. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology* **135**: 118-124.

**Lamichhane JR.** 2014. *Xanthomonas arboricola* diseases of stone fruit, almond, and walnut trees: progress toward understanding and management. *Plant Disease*, **98**: 1600-1610.

**Lamichhane JR, Varvaro L.** 2014. *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: current status and future perspectives for its management. *Plant Pathology* **63**: 243-254.

**Lane CR, Hobden E, Walker L, Barton VC, Inman AJ, Hughes KJD, Swan H, Colyer A, et al.** 2007. Evaluation of a rapid diagnostic field test kit for identification of *Phytophthora* species, including *P. ramorum* and *P. kernoviae* at the point of inspection. *Plant Pathology* **56**: 828-835.

**Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seelinger HPR, Clark WA (ed).** 1975. *International code of nomenclature of bacteria*. 1975 Revision. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

**Lazo GR, Gabriel DW.** 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* **77**: 448-453.

**Leduc A, Traoré YN, Boyer K, Magne M, Grygiel P, Juhasz CC, Boyer C, et al.** 2015. Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in Mali and Burkina Faso. *Environmental Microbiology* **17**: 4429-4442.

**Lelliot RA, Stead DE.** 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell, Oxford, United Kingdom.

**Leoni C.** 2004. Manejo integrado de enfermedades en duraznero. Mancha bacteriana o bacteriosis del duraznero (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*). En: *Seminario de actualización técnica en el cultivo del duraznero*, pp: 19-26. Serie Actividades de Difusión No. 381. INIA. Las Brujas, Uruguay.

**Levinson G, Gutman GA.** 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 203-221.

**Li Y, Hu Y, Bolund L, Wang J.** 2010a. State of the art *de novo* assembly of human genomes from massively parallel sequencing data. *Human Genomics* **4**: 271–277.

**Li R, Zhu H, Ruan J, Qian W, Fang X, Shi Z, Li Y, et al.** 2010b. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Research* **20**(2): 265-272.

**Lindstedt BA.** 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* **26**: 2567-2582.

**Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C, López MM.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* **37**: 23- 31.

**López MM.** 2000. Otras bacteriosis de los frutales. En: *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*, pp: 47-48. SEF-Mundi Prensa, Madrid, Spain.

**López MM, Bertolini E, Marco-Noales E, Llop P, Cambra M.** 2006. Updated molecular tools for detection of plant pathogenic bacteria and viruses. En:

*Molecular diagnostics: current technology and applications* (Rao JR, Fleming CC, Moore JE, eds), pp: 1-46. Horizon Bioscience, Wymondham, United Kingdom.

**López MM, Peñalver J, Morente MC, Quesada JM, Navarro I, López-Soriano P, Ferrante P, Scortichini M, Roselló M, Palacio-Bielsa A.** 2012. Evaluation of the efficiency of a conventional PCR protocol for the diagnosis of bacterial spot disease caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in stone fruits and almond. *Journal of Plant Pathology* **94** (Supplement 1): S1.75-S1.82.

**López MM, Roselló M, Palacio-Bielsa A.** 2010. Diagnosis and detection of the main bacterial pathogens of stone fruit and almond. *Journal of Plant Pathology* **92**(Supplement 1): S1.57-S1.66.

**López-Soriano P, Boyer K, Cesbron S, Morente MC, Peñalver J, Palaco-Bielsa A, Vernière C, López MM, Pruvost O.** 2016. Multilocus variable number of tandem repeat analysis reveals multiple introductions in Spain of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, the causal agent of bacterial spot disease of stone fruits and almond. *PLoS ONE* **11**(9): e0163729.

**López-Soriano P, Noguera P, Gorris MT, Puchades R, Maquieira A, Marco-Noales E, López MM.** 2017. Lateral flow immunoassay for on-site detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in symptomatic field samples. *PLoS ONE* **12**(4): e0176201.

**Loreti S, Pucci N, Perez G, Catara V, Scortichini M, Bella P, Ferrante P, Giovanardi D, Stefani E.** 2015. Detection and identification of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* from symptomless plant material: results of an Italian test performance study. *EPPO Bulletin* **45**: 41-51.

**Lu H, Patil P, Van Sluys MA, White FF, Ryan RP, Dow JM, Rabinowicz P, et al.** 2008. Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* **3**(11): e3828.

**Maalej S, Denis M, Dukan S.** 2004. Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. *Microbiology* **150**: 181-187.

**Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M et al.** 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* **13**: 614–29.

**Marchi G, Cinelli T, Surico G.** 2011. Bacterial leaf spot caused by the quarantine pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on cherry laurel in central Italy. *Plant Disease* **95**: 74.

**Martínez-Calvo J, Conejero A, Badenes ML, Llácer G, Cunill M, Durán S, Torrents J et al.** 2011. Los programas de mejora genética de frutales en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). II. Melocotonero. *Revista de Fruticultura* **15**: 12-29.

**Mayer L, Tondo Vendruscolo C, Padilha da Silva W, Vorhölter FJ, Becker A, Pühler A.** 2011. Insights into the genome of the xanthan-producing phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 109 by comparative genomic hybridization. *Journal of Bacteriology* **155**: 40-49.

**McLaren GF, Vanneste JL, Marshall RR.** 2005. Sulphur as an alternative to copper for the control of bacterial blast of nectarine fruit. *New Zealand Plant Protection* **58**: 96-100.

**Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigné S, Durand K, Fouteau S, Barbe V, Manceau C et al.** 2011. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 67.

**Mensi I, Vernerey MS, Gargani D, Nicole M, Rott P.** 2014. Breaking dogmas: the plant vascular pathogen *Xanthomonas albilineans* is able to invade non-vascular tissues despite its reduced genome. *Open Biology*, **4**:130116.

**Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA).** 2015a. Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente 2015. Online: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica>.

**Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA).** 2015b. Guía de gestión integrada de plagas, enfermedades y malas hierbas en frutales de hueso.

**Molinaro A, Evidente A, Lo Cantore P, Iacobellis NS, Bedini E, Lanzetta R, Parrilli M.** 2003. Structural determination of a novel O-chain polysaccharide of the lipopolysaccharide from the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *European Journal of Organic Chemistry* **12**: 2254–2259.

**Morales G, Llorente I, Montesinos E, Moragrega C.** 2016. Basis for a predictive model of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* growth and infections in host plants. *Acta horticulturae ISHS*, 1149.

**Mwangi M, Bandyopadhyay R, Ragama P, Tushemereirwe WK.** 2007. Assessment of banana planting practices and cultivar tolerance in relation to management of soilborne *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Crop Protection*, **26**: 1203-1208.

**Myung IS, Moon SY, Jeong IH, Lee SW, Ra DS.** 2010a. A new disease, bacterial fruit rot of jujube, caused by *Xanthomonas arboricola* in Korea. *New Disease Reports* **22**: 12-Article 12.

**Myung IS, Jeong IH, Moon SY, Lee SW, Shim HS.** 2010b. A new disease, arboricola leaf spot of bell pepper, caused by *Xanthomonas arboricola*. *Plant Disease* **94**: 271-271.

**Naushad S, Adeolu M, Wong S, Sohail M, Schellhorn HE, Gupta RS.** 2015. A phylogenomic and molecular marker based taxonomic framework for the order Xanthomonadales: proposal to transfer the families Algiphilaceae and Solimonadaceae to the order Nevskiales ord. nov. and to create a new family within the order Xanthomonadales. *Antonie van Leeuwenhoek* **107**: 467-485.

**Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ.** 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* **7**: 303-324.

**Noguera P, Posthuma-Trumpie GA, van Tuil M, van der Wal FJ, de Boer A, Moers APHA, Van Amerongen A.** 2011. Carbon nanoparticles in lateral flow methods to detect genes encoding virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**: 831-838.

**Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T.** 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **28**: 1-7.

**O'Farrell B.** 2009. Evolution in lateral flow-based immunoassay systems. En: *Lateral flow immunoassay* (Wong RC, Tse HY, eds.), pp: 1-33. Humana Press, New York, USA.

**O'Keefe M, Crabbe P, Salden M, Wichers J, van Peteghem C, Kohen F, Pieraccini G, et al.** 2003. Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. *Journal of Immunological Methods* **278** (1-2): 117-126.

**Oliver JD.** 1993. Formation of viable but nonculturable cells. En: *Starvation in bacteria* (Kjelleberg S, ed.), pp: 239-272. Plenum Press, New York, USA.

**Oliver JD.** 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. En: *Nonculturable microorganisms in the environment* (Colwell RR, Grimes DJ, eds.), pp: 277-300. ASM Press, Washington DC, USA.

**Oliver JD.** 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* **43**: 93-100.

**Olmos A, Bertolini E, Cambra M.** 2008. Validación de métodos de detección y diagnóstico de patógenos y costes de la especificidad y sensibilidad. *Boletín SEF* **63**: 7-11.

**Pagani MC.** 2004. An ABC transporter protein and molecular diagnoses of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* causing bacterial spot of stone fruits. Raleigh,

North Carolina, USA: North Carolina State University, PhD thesis. Online, <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/4540/1/etd.pdf>.

**Pagani C, Galione A, Delpiano F.** 1997. Avances en el control de bacteriosis (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) en durazneros. En: *Resultados sobre protección vegetal en frutas*. INIA, Serie Actividades de Difusión No. 150, Las Brujas, Uruguay.

**Palacio-Bielsa A, Cambra MA, Cubero J, Garita-Cambronero J, Roselló M, Lopez MM.** 2014. La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*), una grave enfermedad emergente en España. *Phytoma-España* **259**: 36-42.

**Palacio-Bielsa A, Cubero J, Cambra MA, Collados R, Berruete IM, López MM.** 2011. Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 89-97.

**Palacio-Bielsa A, Lopez MM, Peñalver J, Morente C, Cubero J, Garita-Cambronero J, Sabuquillo P, et al.** 2015a. La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) en España y Sudamérica. *Phytoma-España* **271**: 21-28.

**Palacio-Bielsa A, López-Soriano P, Bühlmann A, Van Doorn J, Pham K, Cambra MA, Berruete IM et al.** 2015b. Evaluation of a real time PCR and a loop mediated isothermal amplification for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in plant tissue samples. *Journal of Microbiological Methods* **112**: 36-39.



**Palacio-Bielsa A, Pothier JF, Roselló M, Duffy B, López MM.** 2012. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology* **94**(Supplement 1): S1.135- S1.146.

**Palacio-Bielsa A, Roselló M, Cambra MA.** 2010a. La mancha bacteriana de los frutales de hueso en almendro (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*). *Revista de Fruticultura* **7**: 18-27.

**Palacio-Bielsa A, Roselló M, Cambra MA, López MM.** 2010b. First report on almond in Europe of bacterial spot disease of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Plant Disease* **94**:786.

**Panič M, Jovanovič O, Antonijević D, Miladinović Z.** 1998. The first appearance of bacterial plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Yugoslavia. *Zaštita bilja* **49**: 285-294.

**Park SY, Lee YS, Koh YJ, Hur JS, Jung JS.** 2010. Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* by PCR using primers based on DNA sequences related to the *hrp* genes. *The Journal of Microbiology* **48**: 554-558.

**Parkinson N, Cowie C, Heeney J, Stead D.** 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**: 264–274.

**Peñalver J, Quesada JM, Roselló M, Llop P, Morente MC, López MM.** 2008. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de un protocolo de PCR para el diagnóstico de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. En: *XIV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, Lugo, Spain*, pp: 163.

**Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Couloux A, Darrasse A et al.** 2012. Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC genomics* **13**: 658.

**Posada D, Buckley TR.** 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* **53**: 793-808.

**Postgate JR.** 1967. Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress. En: *Advances in microbial physiology* (Rose AH, Wilkinson J, eds.), pp: 1-21. Academic Press, London, United Kingdom.

**Postgate JR.** 1969. Viable counts and viability. *Methods in Microbiology* **1**: 611-628.

**Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A.** 2009. Lateral flow immunoassay, its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**: 569-582.

**Pothier JF, Pelludat C, Bünter M, Genini M, Vogelsanger J, Duffy B.** 2010. First report of the quarantine pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on apricot and plum in Switzerland. *Plant Pathology* **59**: 404.

**Pothier JF, Pagani MC, Pelludat C, Ritchie DF, Duffy B.** 2011c. A duplex-PCR method for species and pathovar level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Microbiological Methods* **86**: 16-24.

**Pothier JF, Pflüger V, Ziegler D, Tonolla M, Vogel G, Duffy B.** 2011b. MALDI-TOF mass spectrometry: applications for rapid bacterial identification and phylogenetic analysis. *Phytopathology* **101**: S145.

**Pothier JF, Vorhölter FJ, Blom J, Goesmann A, Pühler A, Smits TH, Duffy B.** 2011a. The ubiquitous plasmid pXap41 in the invasive phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: complete sequence and comparative genomic analysis. *FEMS Microbiology Letters* **323**: 52–60.

**Poulin L, Grygiel P, Magne M, Gagnevin L, Rodriguez-R LM, Forero Serna N, Zhao S et al.** 2015. New multilocus variable-number tandem-repeat analysis tool for surveillance and local epidemiology of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak of rice caused by *Xanthomonas oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**: 688-698.

**Pourcel C, Vergnaud G.** 2011. Strain typing using Multiple “Variable Number of Tandem Repeat” Analysis and genetic element CRISPR. En: *Molecular microbiology: Diagnostic principles and practice* (Persing DH, Tenover FC, Tang YW, Nolte FS, Hayden RT, et al., eds), pp: 179–197. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.

**Pruvost O, Magne M, Boyer K, Leduc A, Tourterel C, Drevet C, Ravigné V, et al.** 2014. A MLVA genotyping scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage. *PLoS ONE* **9**(6): e98129.

**Qian W, Han ZJ, He C**, 2008. Two-component signal transduction systems of *Xanthomonas* spp.: a lesson from genomics. *Molecular plant-microbe interaction* **21**: 151-161.

**Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P et al.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 665- 677.

**Rademaker JLW, Louws FJ, de Bruijn FJ.** 1998. Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. En: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FL, eds.), pp: 1-26. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Randhawa PS, Civerolo EI.** 1985. A detached-leaf bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Phytopathology* **75**: 1060-1063.

**Randhawa P, Civerolo E.** 1986. Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* with pruniphage and epiphytic bacteria on detached peach leaves. *Phytopathology* **76**: 549-553.

**Restrepo S, Duque M, Tohme J, Verdier V.** 1999. AFLP fingerprinting: An efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology (UK)* **145**: 107-114.

**Richter M, Rosselló-Mora R.** 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Science* **106**(45): 19126-19131.

**Ridé M.** 1969. Bactéries phytopathogènes et maladies bactériennes des végétaux. En: *Les bactérioses et les viroses des arbres fruitiers* (Bourgin CVM, ed). Ponsot, Paris, France.

**Rigano LA, Maran MR, Castagnar AP, Amarala AM, Vojnov AA.** 2010. Rapid and sensitive detection of citrus bacterial cancer by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation method. *BMC Microbiology* **10**: 176.

**Ritchie DF.** 1995. Bacterial spot. En: *Compendium of stone fruit diseases* (Ogawa JM, Zehr EI, Bird GW, Ritchie DF, Uriu K, Uyemoto JK, eds), pp: 50-52. American Phytopathological Society, Saint Paul, MN, USA.

**Ritchie DF.** 1999. Sprays for control of bacterial spot of peach cultivars having different levels of disease susceptibility. *Fungicide Nematicide Tests* **54**: 63.

**Roselló M.** 2007. Detección de bacterias fitopatógenas de cuarentena y caracterización de aislados relacionados, en frutales de la Comunitat Valenciana. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Valencia, España.

**Roselló G, Bonaterra A, Badosa E, Francés J, Montesinos L, Mora I, Daranas N, Montesinos E.** 2014. *Lactobacillus plantarum*, nuevos agentes de biocontrol de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. En: *XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Lérida, Spain, pp: 103.

**Roselló M, Peñalver J, Llop P, Gorris MT, Chartier R, García F, Montón C et al.** 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology* **28**: 30-41.

**Roselló M, Santiago R, Cambra MA, García-Vidal C, Morente C, López MM.** 2007. Outbreaks of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Spain, pp: 4. En: Diagnostic and monitoring of bacterial diseases of stone fruits and nuts. COST Action873 WG1/WG2 Joint Meeting, Angers, France.

**Roselló M, Santiago R, Palacio-Bielsa A, García-Figueres F, Montón C, Cambra MA, López MM.** 2012. Current status of bacterial spot of stone fruits and almond caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Spain. *Journal of Plant Pathology* **94** (Supplement 1): S1.15-S1.21.

**Rozsak BD, Colwell RR.** 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* **51**: 365-379.

**Rudolph K.** 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. En: *Xanthomonas* (Swings JG, Civerolo EL, eds), pp: 193-264. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

**Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Van Sluys MA, Bogdanove AJ, Maxwell Dow J.** 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, **9**: 344-355.

**Saddler GS, Bradbury JF.** Genus I. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187<sup>AL</sup> emend. Vauterin, Hoste, Kersters and Swings, 1995, 483. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, eds), pp: 63-90. 2nd edn, vol 2, part B. Springer, New York, USA.

**Safenkova IV, Pankratova GK, Zaitsev IA, Varitsev YA, Vengerov YY, Zherdev AV, Dzantiev BB.** 2016. Multiarray on a test trip (MATS): rapid multiplex

immunodetection of priority potato pathogens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**: 6009-6017.

**Safenkova IV, Zaitsev IA, Pankratova GK, Varitsev YA, Zherdev AV, Dzantiev BB.** 2014. Lateral flow immunoassay for rapid detection of potato ring rot caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* **50** (6): 675-682.

**Safenkova IV, Zherdev AV, Dzantiev BB.** 2012. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay, a case study with potato virus X. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**: 1595-1605.

**Sallet E, Gouzy J, Schiex T.** 2014. EuGene-PP: a next generation automated annotation pipeline for prokaryotic genomes. *Bioinformatics* **30**: 2659–2661.

**Sasser M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. En: *Methods in Phytobacteriology* (Klement Z, Rudolf K, Sands DC, eds), pp: 199-204. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.

**Sawada H, Kunugi Y, Watauchi K, Kudo A, Sato T.** 2011. Bacterial spot, a new disease of grapevine (*Vitis vinifera*) caused by *Xanthomonas arboricola*. *Japanese Journal of Phytopathology* **77**: 7-22.

**Schaad NW, Jones JB, Lacey H.** 2001. *Xanthomonas*. En: *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (Schaad NW, Jones JB, Chun W, eds), pp: 175-200, 3rd Ed. APS Press, St. Paul, MN, USA.

**Schaad NW, Postnikova E, Lacey GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, et al.** 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

(ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al. 1989 sp. nov. nom. rev., *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nom. nov., *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al. 1935) sp. nov. nom. rev., and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1897) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **28**: 494-518.

**Schaad NW, Postnikova E, Lacey G, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, et al.** 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus - Erratum. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 690-695.

**Schaad NW, Postnikova E, Lacey GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, et al.** 2007. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 893-897.

**Schaad NW, Stall RE.** 1988. *Xanthomonas*. En: *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (Schaad NW, ed), pp: 81-91, 2nd Ed. APS Press, St. Paul, MN, USA.

**Scortichini M.** 2008. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* detection. En: *Annual COST 873 Meeting, Athens*, pp: 14.



**Scortichini M.** 2010. Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. *Journal of Plant Pathology*, **92**: S73-S78.

**Scortichini M, Janse JD, Rossi MP, Derks JHJ.** 1996. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* strains from different hosts by pathogenicity tests and analysis of whole-cell fatty acids and whole-cell proteins. *Journal of Phytopathology* **144**: 69-74.

**Shepard DP, Zehr EI.** 1994. Epiphytic persistence of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* on peach and plum. *Plant Disease* **78**: 627-629.

**Shepard DP, Zehr EI, Bridges WC.** 1999. Increased susceptibility to bacterial spot of peach trees growing in soil infested with *Criconebella xenoplax*. *Plant Disease* **83**: 961-963.

**Silva-Vasconcellos FC, de Oliveira AG, Lopes-Santos L, de Oliveira-Beranger AP, Torres-Celi MV, Simionato AS, Fonteque-Pistori J, et al.** 2014. Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agricultural Sciences* **5**: 71-76.

**Simeone AM.** 1990. Observation on cultivar susceptibility to natural infections of *Xanthomonas pruni* in a plum collection. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* **54**: 61-63.

**Simeone AM, Scortichini M.** 2005. Suscettibilità di cultivar di albicocco nei confronti della batteriosi *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* ne`ll Agro romano. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* **67**: 52-54.

**Smith E.** 1903. Observations on a hitherto unreported bacterial disease, the cause of which enters the plant through ordinary stomata. *Science* **17**: 456-457.

**Socquet-Juglard D, Duffy B, Pothier JF, Christen D, Gessler C, Patocchi A.** 2013. Identification of a major QTL for *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* resistance in apricot. *Tree Genetics and Genomes* **9**: 409–421.

**Soria J, Pisano J.** 2014. Variedades de duraznero y nectarina para El Uruguay. En: Manual del Duraznero. La Planta y la Cosecha. Boletín de Divulgación No. 108. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Uruguay.

**Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X et al.** 2002. Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1043–1047.

**Stackebrandt E, Goebel BM.** 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:846-849.

**Stead DE, Sellwood JE, Wilson J, Viney I.** 1992. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **72**: 315-321.

**Stefani E.** 2010. Economic significance and control of bacterial spot/canker of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Plant Pathology* **92**(Supplement 1): S1.99-S1.103.

**Stolp H, Starr MP.** 1964. Bacteriophage reaction and speciation on phytopathogenic xanthomonads. *Phytopathologische Zeitschrift* **51**: 442-478.

**Swings JG, Vauterin L, Kersters K.** 1993. The bacterium *Xanthomonas*. En: *Xanthomonas* (Swings JG, Civerolo EL, eds), pp: 121-156. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

**Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-9.

**Temple TN, Johnson KB.** 2011. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease* **95**: 423-430.

**Temple TN, Stockwell VO, Johnson KB.** 2008. Development of a rapid detection method for *Erwinia amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Horticulturae* **793**: 497-503.

**Thornton CR, Groenhof AC, Forrest R, Lamotte R.** 2004. A one-step, immunochromatographic lateral flow device specific to *Rhizoctonia solani* and certain related species, and its use to detect and quantify *R. solani* in soil. *Phytopathology* **94**: 280-288.

**Tindall BJ.** 2014. The family name *Solimonadaceae* Losey *et al.* 2013 is illegitimate, proposals to create the names '*Sinobacter soli*' comb. nov. and '*Sinobacter variicoloris*' contravene the Code, the family name *Xanthomonadaceae* Saddler and Bradbury 2005 and the order name *Xanthomonadales* Saddler and Bradbury 2005 are illegitimate and notes on the application of the family names

*Solibacteraceae* Zhou *et al.* 2008, *Nevskiaceae* Henrici and Johnson 1935 (Approved Lists 1980) and *Lysobacteraceae* Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) and order name *Lysobacteriales* Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) with respect to the classification of the corresponding type genera *Solibacter* Zhou *et al.* 2008, *Nevskia* Famintzin 1892 (Approved Lists 1980) and *Lysobacter* Christensen and Cook 1978 (Approved Lists 1980) and importance of accurately expressing the link between a taxonomic name, its authors and the corresponding description/circumscription/emendation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 293-297.

**Tjou-Tam-Sin NNA, van de Bilt JLJ, Bergsma-Vlami M, Koenraadt H, Westerhof J, van Doorn J, Pham KTK, Martin WS.** 2014. First report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in ornamental *Prunus laurocerasus* in the Netherlands. *Plant Disease* **96**: 759.

**Trébaol G, Gardan L, Manceau C, Tanguy JL, Tirilly Y, Boury S.** 2000. Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* sp. nov., a new species that causes bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1471-1478.

**Triplett LR, Verdier V, Campillo T, Van Malderghem C, Cleenwerck I, Maes M, Deblais L, et al.** 2015. Characterization of a novel clade of *Xanthomonas* isolated from rice leaves in Mali and proposal of *Xanthomonas maliensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* **107**: 869-81.

**Vandroemme J, Cottyn B, Pothier JF, Pfluger V, Duffy B, Maes M.** 2013. *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*: what's in a name? *Plant Pathology* **62**: 1123-1131.

**Van Belkum A, Scherer S, Van Alphen L, Verbrugh H.** 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 275-293.

**Van den Mooter M, Swings J.** 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features from 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**: 348-369.

**Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J.** 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 472-489.

**Vauterin L, Rademaker J, Swings J.** 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* **90**: 677-682.

**Vauterin L, Swings J, Kersters K.** 1991. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *Journal of General Microbiology* **137**: 1677-1687.

**Vernière C, Pruvost O, Civerolo EL, Gambin O, Jacquemoud-Collet JP, Luisetti J.** 1993. Evaluation of the biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 243-249.

**Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, Keim P.** 2006. Effect of repeat copy number on Variable-Number Tandem Repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology* **188**: 4253-4263.

**Ward L, Harpe S, Clover G.** 2010. Development of a LAMP assay for *Xylella fastidiosa*. *MAF Biosecurity New Zealand Technical Paper*. Paper No: 2010/14.

**Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, et al.** 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**: 463-464.

**Weichart DH.** 1999. Stability and survival of VBNC cells – conceptual and practical implications. En: *Microbial biosystems: new frontiers* (Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P, eds.). Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

**Weisheng L, Jiayan Z, Xuefu J.** 1996. Identification of the resistance to *Xanthomonas pruni* in plum germplasm resources of China. *China Fruits* **1**: 9-11.

**Williams KP, Kelly DP.** 2013. Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 2901-2906.

**Yang N, Reighard G, Ritchie D, Okie W, Gasic K.** 2013. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to bacterial spot (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) in peach. *Tree Genetics & Genomes* **9**: 573-586.

**Yang P, Vauterin L, Vancanneyt M, Swings J, Kersters K.** 1993. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* **16**: 47-71.

**Young JM.** 1977. *Xanthomonas pruni* in almond in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **20**: 105-107.

**Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Panagopoulos CG, Robb CF.** 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **21**: 153-177.

**Young JM, Park DC, Shearman HM, Fargier E.** 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* **31**: 366-377.

**Young JM, Wilkie JP, Park DC, Watson DRW.** 2010. New Zealand strains of plant pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of *Xanthomonas dyei* sp. nov. *Plant Pathology* **59**: 270-281.

**Zaccardelli M, Ceroni P, Mazzucchi U.** 1999. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Plant Pathology* **81**: 173-179.

**Zaccardelli M, Consiglio MF, Mazzucchi U.** 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in symptomless peach trees in winter. *Phytopathologia Mediterranea* **34**: 199-203.

**Zaccardelli M, Malaguti S, Bazzi C.** 1998. Biological and epidemiological aspects of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on peach in Italy. *Journal of Plant Pathology* **80**(2): 125-132.

**Zaccardelli M, Saccardi A, Gambin E, Mazzucchi U.** 1992. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control. *Phytopathologia Mediterranea* **31**: 133-140.

**Zaccardelli M, Saccardi A, Gambin E, Minardi P, Mazzucchi U.** 1994. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control. En: *Proceedings VIII International Conference on Plant Pathogenic bacteria, Paris, France*, pp: 875-878.

**Zehr EI, Shepard DP, Bridges WC.** 1996. Bacterial spot of peach as influenced by water congestion, leaf wetness duration, and temperature. *Plant Disease* **80**: 339-341.

**Zerbino DR, Birney E.** 2008. Velvet: Algorithms for *de novo* short read assembly using De Bruijn graphs. *Genome Research* **18**: 821-829.

**Zhao S, Poulin L, Rodriguez-R LM, Serna NF, Liu SY, Wonni I, Szurek B, Verdier V, Leach JE, He YQ, Feng JX, Koebnik R.** 2012. Development of a variable number of tandem repeats typing scheme for the bacterial rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Phytopathology* **102**: 948-956.

**Zimmerman R, Iturriaga R, Becker-Birck J.** 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Applied and Environmental Microbiology* **36**: 926-935.