

Bacteriología en el INIA/CSIC: utilidad de las técnicas ómicas para el control de enfermedades provocadas por bacterias en planta

JAIME CUBERO, SARA CUESTA-MORRONDO, PILAR SABUQUILLO, LAURA HERNÁNDEZ-ESCRIBANO, CRISTINA REDONDO Y LETICIA MARTÍN

Grupo de Bacteriología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC). Crta de La Coruña Km 7,5. 28040 Madrid

✉ cubero@inia.es

Introducción

Las tecnologías de secuenciación masiva han permitido profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos que median las interacciones de las bacterias con las plantas, y muy especialmente de aquellas que son fitopatógenas. En los últimos años estas técnicas han contribuido además a descubrir los componentes de la microbiota vegetal y el efecto de ésta sobre los cultivos, identificando dentro de la misma, en ocasiones, bacterias no patógenas taxonómicamente muy cercanas a cepas que causan enfermedad. El grupo de Bacteriología en el INIA/CSIC ha utilizado estas tecnologías para desentrañar diversos aspectos de la patogenicidad y virulencia de bacterias mediante análisis de genómica y transcriptómica comparativas, y además, ha realizado estudios sobre la microbiota presente en diversos sistemas, incluyendo plantas o insectos vectores transmisores de bacterias.

Nuestra vocación es la investigación aplicada sustentada por un trabajo básico previo, y así por ejemplo, nuestros estudios de genómica han servido para el diseño de estrategias de detección de patógenos y diagnóstico de enfermedades importantes para la agricultura europea.

Genómica y transcriptómica comparativas en modelos de *Xanthomonas*

La especie *Xanthomonas arboricola* incluye numerosos patovares caracterizados por afectar diferentes especies de plantas huésped de forma específica. Nuestros pri-



Grupo de Bacteriología en el INIA/CSIC. De izquierda a derecha, arriba: Jaime Cubero y Cristina Redondo. Abajo: Pilar Sabuquillo, Leticia Martín, Laura Hernández-Escribano y Sara Cuesta-Morrondo.

meros estudios en *X. arboricola* comenzaron con el patovar pruni (Xap) que infecta *Prunus* spp. y que tiene gran importancia en melocotonero, albaricoquero, ciruelo o el almendro. Con genomas obtenidos mediante las primeras tecnologías de secuenciación masiva disponibles, fuimos capaces de identificar aquellos genes que diferenciaban cepas patógenas y no patógenas de *Xanthomonas* residentes en estas especies vegetales (Garita-Cambroneiro *et al.* 2016, 2017). Inicialmente a partir de genomas incompletos obtenidos mediante la tecnología IonTorrent, pudimos determinar que los sistemas de secreción (SST) y particularmente efectores del SST3, diferenciaban claramente cepas patógenas y no patógenas de *Xanthomonas* en *Prunus*. Además, encontramos diferencias en otros

elementos del genoma involucrados en la síntesis de sensores ambientales, adhesinas fimbriales y no fimbriales, enzimas pectolíticas y celulolíticas y detectamos secuencias particulares en la proteína principal del flagelo (Garita-Cambroneiro *et al.* 2016, 2017). Estos resultados se han ampliado recientemente cuando hemos aplicado nuevas técnicas de secuenciación y combinado secuencias largas (PacBio) y cortas (Illumina) para obtener ensamblajes híbridos (Cuesta-morrondo *et al.* 2022). Además, se han incluido en los análisis a los patovares corylina (Xac) y juglandis (Xaj) de *X. arboricola*, que afectan avellano y nogal, respectivamente (Garita-Cambroneiro *et al.* 2018; Cuesta-morrondo *et al.* 2022). En todos los casos nuestra intención es además relacionar los resultados

de genómica con el comportamiento fenotípico de las bacterias (Garita-Cambronero *et al.* 2019; Sabuquillo and Cubero 2021).

Los resultados de genómica comparativa nos han permitido además identificar dienas de PCR para el desarrollo de un método de detección más específico para Xap que ha sido adoptado dentro del protocolo recomendado por la "European and Mediterranean Plant Protection Organization" (EPPO/OEPP). Igualmente, en la actualidad se están abordando estrategias similares para Xac y Xaj, que serán validadas utilizando los criterios de especificidad y sensibilidad de EPPO (Catara *et al.* 2021).

Mediante RNAseq y transcriptómica comparativa, el grupo de Bacteriología del INIA/CSIC realiza estudios de diferentes situaciones en los procesos de infección. Por ejemplo, se están analizando los contrastes a nivel de expresión génica entre cepas patógenas y no patógenas aisladas de un mismo huésped o se evalúan los mecanismos que rigen los procesos de agregación y formación de biopelículas o el efecto de la luz y oscuridad en Xap, Xaj y Xac. En la mayoría de los casos, estos estudios incluyen análisis de secuenciación masiva y una fase de validación de los resultados mediante qRT-PCR sobre genes representativos en todos estos procesos. Nuestros estudios van dirigidos a aumentar el conocimiento de los procesos de infección para el desarrollo de métodos de control de estas bacteriosis.

Microbiota asociada a plantas y a vectores transmisores de bacterias

El grupo de Bacteriología del INIA/CSIC además está interesado en el estudio de la microbiota de las plantas, para observar su efecto en la salud de las mismas y como herramienta para la selección de posibles agentes de biocontrol. De esta manera, ha participado en un consorcio mundial para el análisis de la microbiota y el microbioma de los cítricos a nivel global, determinándose los géneros de bacterias que forman parte del "core microbiome" y las características funcionales del mismo, e infiriendo su potencial efecto positivo sobre el cultivo (Xu *et al.* 2018). En el grupo, además, se están realizando actividades similares para el análisis de la microbiota de las especies

de *Prunus* y su posible influencia en el desarrollo o no de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro. Asimismo, los estudios van también dirigidos a la selección de elementos de la microbiota que pudieran ser utilizados en estrategias de control biológico contra enfermedades en estos huéspedes.

Finalmente, en el grupo de Bacteriología del INIA/CSIC estamos interesados en la bacteria *Candidatus Liberibacter* causante de enfermedades como el Huanglongbing o HLB de los cítricos, la "Zebra Chip" en patata o desordenes en zanahoria, chirivía, etc (Pierson *et al.* 2022). En los últimos años hemos caracterizado aislados presentes en España afectando a cultivos como la zanahoria, el apio o la chirivía y ocasionalmente la patata (Ruiz-Padilla *et al.* 2020). En este modelo realizamos estudios de genómica para el desarrollo de nuevas metodologías de detección e identificación y análisis de la microbiota de los psyllidos que transmiten esta bacteria en nuestro país mediante tecnologías de secuenciación por nanoporos. Todo ello tiene como objetivo el alcanzar un mayor conocimiento de *C. Liberibacter* y las enfermedades que produce para poder desarrollar formas eficientes de control.

Los resultados presentados en publicación son parte de proyectos de I+D+i / RTI2018-96018-R-C31, RTA2014-00018-C02-01 y RTA-0008-C04-03-E, financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ "FEDER Una manera de hacer Europa" y el INIA.

Bibliografía

- ▶ Catara V, Cubero J, Pothier JF, Bosis E, Bragard C, Đermić E, Holeva MC, Jacques MA, Petter F, Pruvost O, Robène I, Studholme DJ, Tavares F, Vicente JG, Koebnik R y Costa J. (2021) Trends in Molecular Diagnosis and Diversity Studies for Phytosanitary Regulated *Xanthomonas*. *Microorganisms* 9:862.
- ▶ Cuesta-Morrondo S, Redondo C, Palacio-Bielsa A, Garita-Cambronero J y Cubero J. (2022) Complete Genome Sequence Resources of Six Strains of the Most Virulent Pathovars of *Xanthomonas arboricola* Using Long- and Short-Read Sequencing Approaches. *Phytopathology*, en prensa.
- ▶ Garita-Cambronero J, Palacio-Bielsa A y Cubero J. (2018) *Xanthomonas arboricola* pv. pruni, causal agent of

bacterial spot of stone fruits and almond: its genomic and phenotypic characteristics in the *X. arboricola* species context. *Mol Plant Pathol* 19:2053–2065.

- ▶ Garita-Cambronero J, Palacio-Bielsa A, López MM y 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. *Front Microbiol* 8:573.

- ▶ Garita-Cambronero J, Palacio-Bielsa A, López MM y Cubero J. (2016) 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:e0161977.

- ▶ Garita-Cambronero J, Sena-Vélez M, Ferragud E, Sabuquillo P, Redondo C y Cubero J. (2019) *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: Comparative analysis of two pathogens producing similar symptoms in different host plants. *PLoS One* 14:e0219797.

- ▶ Pierson EA, Cubero J, Roper C, Brown JK, Bock CH y Wang N. (2022) 'Candidatus Liberibacter' Pathosystems at the Forefront of Agricultural and Biological Research Challenges. *Phytopathology* 112:7–10.

- ▶ Ruiz-Padilla A, Redondo C, Asensio A, Garita-Cambronero J, Martínez C, Pérez-Padilla V, Marquinez R, Collar J, García-Méndez E, Alfaro-Fernández A, Asensio-S-Manzanera C, Palomo JL, Siverio F, León L y Cubero J. (2020) Assessment of multilocus sequence analysis (MLSA) for identification of *Candidatus Liberibacter solanacearum* from different host plants in Spain. *Microorganisms* 8:1446.

- ▶ Sabuquillo P y Cubero J. (2021) Biofilm formation in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: Structure and development. *Agronomy* 11: 546.

- ▶ Xu J, Zhang Y, Zhang P, Trivedi P, Riera N, Wang Y, Liu X, Fan G, Tang J, Coletta-Filho HD, Cubero J, Deng X, Ancona V, Lu Z, Zhong B, Roper MC, Capote N, Catara V, Pietersen G, Vernière C, Al-Sadi AM, Li L, Yang F, Xu X, Wang J, Yang H, Jin T y Wang N. (2018) The structure and function of the global citrus rhizosphere microbiome. *Nat Commun* 9:4894.