



CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *Xanthomonas fragariae*, AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA ANGULAR DE LA FRESA EN MÉXICO

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Xanthomonas fragariae*, CAUSAL AGENT OF THE ANGULAR LEAF SPOT ON STRAWBERRY IN MEXICO

Luz de L. Saavedra-Romero, Sergio Aranda-Ocampo*,
Daniel L. Ochoa-Martínez y Alma A. Lira-Vargas

Postgrado de Fitosanidad-Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. km 36.5 Carretera Federal México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Tel. 01 (595) 95 20 200 y 01 (55) 5804 5900.

Autor para correspondencia (saranda@colpos.mx)

RESUMEN

Xanthomonas fragariae es el agente causal de la mancha angular de la hoja en el cultivo de fresa (*Fragaria × ananassa* Duch) en México. El objetivo de este estudio fue caracterizar e identificar las bacterias aisladas basadas en la caracterización fisiológica, bioquímica, morfológica y en pruebas de patogenicidad y genética por PCR. Se aislaron colonias de bacterias con morfología similar a la descrita para *X. fragariae* a partir de tejido foliar de diferentes genotipos de fresa en Cd. Guzmán, Jalisco, México con síntomas de manchas angulares acuosas en el área adaxial, exudado en nervaduras primarias y secundarias y manchas necróticas. Los resultados de la caracterización de los aislamientos bacterianos los identificaron como *X. fragariae*, lo cual fue confirmado por el análisis genético con la amplificación del gen *hrp* y la amplificación y secuenciación del gen 16S rADN. La inoculación de la cepa *X. fragariae*-22 produjo lesiones angulares y necrosis adyacentes a la nervadura de las hojas en plantas susceptibles de fresa var. Jacona.

Palabras clave: *Fragaria × ananassa* Duch, gen *hrp*, 16S rADN gen, mancha angular de la hoja.

SUMMARY

Xanthomonas fragariae is the causal agent of angular leaf spot in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) in Mexico. The aim of this study was to characterize and identify isolated bacteria based on physiological, biochemical, morphological traits, as well as pathogenicity and genetic tests by PCR. Colonies of bacteria with similar morphology to that described for *X. fragariae* were isolated from leaf tissue of different strawberry genotypes in Cd. Guzmán, Jalisco, Mexico with symptoms of aqueous angular spots on the adaxial area of leaves, exudate in primary and secondary veins and necrotic spots. The results of the characterization of bacterial isolates identified them as *X. fragariae*, which was confirmed by genetic analysis through the amplification of the *hrp* gene, as well as the amplification and sequencing of the 16S rDNA gene. Inoculation of the *X. fragariae*-22 strain produced angular lesions and necrosis adjacent to the leaf vein on susceptible strawberry plants cv. Jacona.

Index words: *Fragaria × ananassa* Duch, gene *hrp*, gene 16S rDNA, angular leaf spot.

INTRODUCCIÓN

Xanthomonas fragariae es el agente causal de la enfermedad mancha angular de la hoja (MAH), de importancia económica en el cultivo de fresa (*Fragaria × ananassa* Duch). México es el tercer productor de fresa a nivel mundial; los principales estados productores son Baja California, Guanajuato, Jalisco, Estado de México y Michoacán (SIAP, 2015). El primer reporte de *X. fragariae* en México fue en Zamora, Michoacán, con incidencia del 80 % en plantas de fresa de la variedad Aromas (Fernández-Pavía *et al.*, 2014).

X. fragariae fue considerado el único patógeno bacteriano en fresa; sin embargo, en 1993 se reportó una nueva enfermedad en el norte de Italia y Turquía denominada "tizón foliar bacteriano" (TFB) y el agente causal se identificó como *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (*X. a. fragariae*) (Janse *et al.*, 2001; Ustun *et al.*, 2007). Se ha citado que *X. fragariae* y *X. a. fragariae* pueden coexistir en el mismo tejido, ya que ambos patógenos se han aislado con tejido tanto de síntomas de MAH como de TFB (Scortichini y Rossi, 2003).

Actualmente, no existen reportes oficiales de la presencia de *X. a. fragariae* en el cultivo de fresa en México. Se analizaron en laboratorio muestras de tejido foliar de diferentes genotipos de fresa provenientes de Cd. Guzmán, Jalisco, México, con síntomas de manchas angulares acuosas en el área adaxial de las hojas y manchas necróticas en las nervaduras, de las cuales se aislaron colonias bacterianas con características morfológicas similares a las descritas para *X. fragariae*. Por lo anterior, en consideración de que actualmente no existe información de referencia sobre el perfil fenotípico y genético de cepas de *X. fragariae* aisladas de fresa en México, o si se encuentra presente *X. a. fragariae* en los síntomas antes descritos, el

objetivo del presente estudio fue identificar mediante la caracterización fisiológica, bioquímica, morfológica, pruebas de patogenicidad y genético por PCR, las bacterias aisladas de este tejido y comparar los resultados con el perfil descrito para cepas tipo y de referencia de *X. fragariae* y *X. a. fragariae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron muestras de tejido foliar de cinco genotipos de fresa: Frag26.S, Frag29.M, Frag32.D, Frag35.O y Frag38.B, en Ciudad Guzmán, Jalisco, México con síntomas de manchas angulares acuosas, exudado en el margen de las nervaduras y manchas necróticas (Figura 1).

Aislamiento de bacterias y condiciones de cultivo

Hojas de cada genotipo con síntomas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5 %. Porciones de tejido se colocaron en 5 mL de agua destilada estéril; de esta suspensión se sembraron 100 μ L en los medios de cultivo B de King (BK), Agar Nutritivo (AN) y Wilbrink's agar (WA), y se incubaron a 25 ± 1 °C por 5 d.

Caracterización fisiológica, bioquímica y morfológica

Las cepas aisladas de fresa: *X. fragariae*-7 (Frag32.D) y *X. fragariae*-22 (Frag26.S) se caracterizaron fisiológica y bioquímicamente de acuerdo con los procedimientos descritos por Schaad *et al.* (2001) y sensibilidad *in vitro* a antibióticos (Klančnik *et al.*, 2010). La descripción morfológica se realizó en la cepa *X. fragariae*-22 con un microscopio electrónico de barrido JSM-35C® (JEOL LTD, Tokio, Japón), en la unidad de microscopía electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (CP-UME).

Caracterización genética por PCR

La amplificación del gen 16S rADN de las cepas *X.*

fragariae-7 y *X. fragariae*-22 se realizó con el protocolo descrito por Weisburg *et al.* (1991) y las secuencias obtenidas se alinearon con las depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La amplificación del gen *hrp* de *X. fragariae* se realizó con los iniciadores XF9 y XF11 bajo las condiciones de PCR descritas por Roberts *et al.* (1996). Como control negativo se utilizaron las cepas *X. vesicatoria* y *X. phaseoli*, patógenas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), respectivamente.

Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron cinco plantas de fresa var. Jacona susceptible a MAH y se inocularon con la cepa *X. fragariae*-22 por el método descrito por Hildebrand *et al.* (2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisiológica, bioquímica, morfológica, genética y patogenicidad

De los diferentes genotipos de fresa se aislaron 12 colonias pequeñas, las cuales mostraron desarrollo lento a las 24 h y se tornaron amarillas a las 96 h de incubación. El aislamiento fue más eficiente en el medio Wilbrink's agar (WA) que en B de King (BK) y Agar Nutritivo (AN). La caracterización de las cepas *X. fragariae*-7 y *X. fragariae*-22 las identificó como *X. fragariae* con alto porcentaje de similitud con el perfil descrito para la cepa tipo PD885 de *X. fragariae* y diferente de la cepa de referencia PD2780 de *X. a. fragariae* (Cuadro 1).

Ambas cepas difieren de la cepa tipo PD885 de *X. fragariae* en la hidrólisis de almidón (Cuadro 1). La hidrólisis de almidón por *X. fragariae* aislada en México ha sido previamente documentada (Fernández-Pavía *et al.*, 2014). Por otra parte, difieren de la cepa de referencia PD2780 de *X. a.*

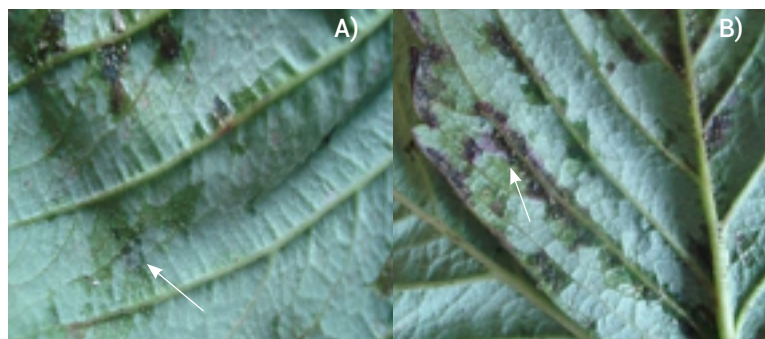


Figura 1. Síntomas foliares en genotipos de fresa. A) Manchas angulares acuosas en el área adaxial de las hojas, B) Manchas necróticas en nervaduras primarias y secundarias.

fragariae en la pudrición de tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L.) (Cuadro 1). Estudios del genoma de *X. a. fragariae* mostraron que utilizan un sistema de secreción tipo II (SST2) para el transporte de proteasas y otras enzimas que degradan la pared de las células de la planta hospedante y que este SST2 es incipiente y no utilizado por poblaciones de *X. fragariae*.

Los resultados en este estudio son congruentes con lo citado por Vandroemme *et al.* (2013a, b), quienes caracterizaron a *X. a. fragariae* como cepas altamente pectinolíticas,

a diferencia de *X. fragariae*. Se destaca que las cepas *X. fragariae*-7 y *X. fragariae*-22 fueron resistentes a la ampicilina (Cuadro 1); este resultado puede aportar información útil para el desarrollo de protocolos con medios de cultivo más selectivos y eficientes para el aislamiento de este patógeno de tejido de fresa; o bien, para otros estudios biotecnológicos. El estudio morfológico de la cepa *X. fragariae*-22 (Figura 2) reveló una topografía celular con la presencia de hebras de apariencia algodonosa (Figura 2B).

Estos resultados coinciden con lo reportado por

Cuadro 1. Caracterización fisiológica y bioquímica de las cepas 7 y 22 aisladas de fresa.

Prueba	Cepa 7	Cepa 22	<i>X. fragariae</i> (PD885) [†]	<i>X. a. fragariae</i> (PD2780) ^{††}
Hipersensibilidad en tabaco	+	+	-	+
Pudrición blanda en tubérculo de papa	-	-	-	+
Hidrólisis de almidón	+	+	-	+
Hidrólisis de esculina	-	-	-	+
Tolerancia a NaCl en AN [*] :				
	+	+	+	nd
	-	-	-	+
	-	-	-	+
Celobiosa	-	-	-	+
Arabinosa	-	-	-	+
Trehalosa	-	-	-	+
Sensibilidad a antibióticos en AN:				
Rifampicina ^{**}	+	+	nd	nd
Cloranfenicol ^{**}	+	+	nd	nd
Estreptomicina ^{**}	+	+	nd	nd
Ampicilina ^{**}	-	-	nd	nd
Ácido nalidíxico [*]	+	+	nd	nd

+: reacción positiva; -: reacción negativa; nd; prueba no determinada; [†]Cepa tipo PD885 de *X. fragariae* (Janse *et al.*, 2001); ^{††}Cepa de referencia PD2780 de *X. a. fragariae* (Ustun *et al.*, 2007). ^{*}Agar nutritivo; ^{**}Concentración 0.2 mg mL⁻¹; ^{*}Concentración 0.03 mg mL⁻¹.

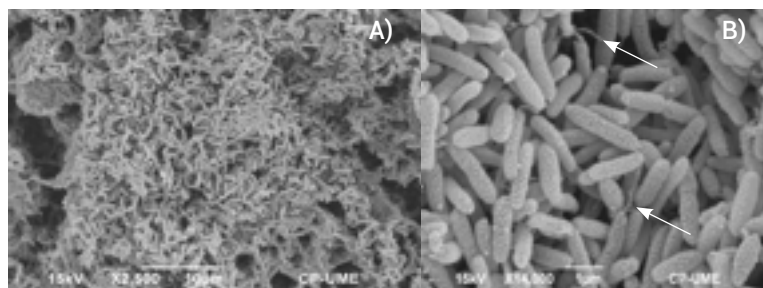


Figura 2. Morfología de las células de la cepa *X. fragariae*-22. A) Células bacilares en una colonia, B) Células bacilares con hebras algodonosas (flechas).

Allan-Wojtas *et al.* (2010), quienes destacan en células de *X. fragariae* estructuras (hebras) que se originan por la producción abundante de polisacáridos extracelulares, principalmente xantana, asociados con los síntomas de manchas acuosas y necrosis.

La inoculación de las cinco plantas de fresa con la cepa *X. fragariae*-22 produjo lesiones angulares y necrosis del tejido adyacente a la nervadura central de las hojas 15 días después de la inoculación; no se observó el desarrollo de síntomas en las plantas testigo (Figura 3). Las colonias bacterianas aisladas a partir de este tejido en medio de cultivo WA mostraron una morfología idéntica a la cepa originalmente inoculada.

Las 12 cepas aisladas amplificaron un fragmento del gen *hrp* de aproximadamente 537 pb. No se obtuvo amplificación con las cepas de *X. vesicatoria* y *X. phaseoli*, patógenas en otras plantas hospedantes (Figura 4). El alineamiento en el GenBank de las secuencias obtenidas de la amplificación del gen 16S rADN de la cepa *X. fragariae*-7 (No. acceso CP016833.1) y *X. fragariae*-22 (No. acceso

HQ223085.1) tuvieron 98 y 100 % de identidad con *X. fragariae*, respectivamente.

Las cepas *X. fragariae*-7 y *X. fragariae*-22 produjeron una respuesta de hipersensibilidad (RH) en tabaco (*Nicotiana benthamiana* L.) (Cuadro 1). Estudios genéticos con la cepa LMG 2586 de *X. fragariae* reveló que ésta alberga el grupo de genes *hrp* que codifican para un distintivo sistema de secreción tipo III, los cuales son esenciales en la virulencia y desarrollo de síntomas en *Xanthomonas* spp. fitopatógenas (Hajri *et al.*, 2009; Vandroemme *et al.*, 2013a). La expresión de los genes *hrp* se evidencia por una RH en poblaciones bacterianas fitopatógenas con una gama de hospedantes específicos y una característica distintiva de *X. fragariae* como patógeno, es su especificidad a *Fragaria* spp. la cual se reconoce como su único hospedante natural (Mirmajlessi *et al.*, 2015; Vandroemme *et al.*, 2013a).

En conclusión, las cepas bacterianas aisladas de diferentes genotipos de fresa se identificaron como *X. fragariae*. La amplificación del gen *hrp* puede ser de gran

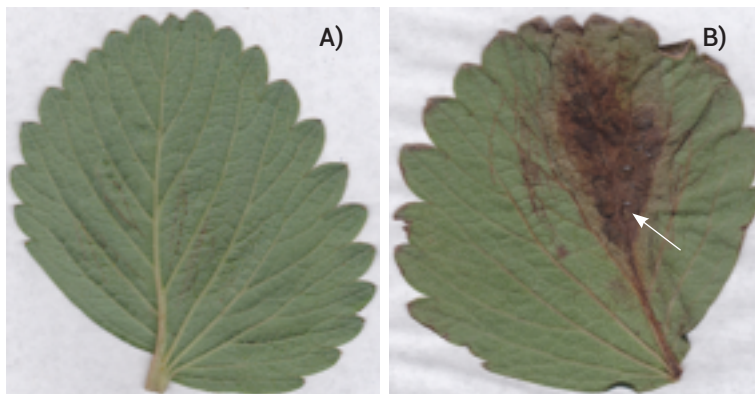


Figura 3. Síntomas en hojas de fresa var. Jacona. A) Testigo, B) Lesiones angulares y necrosis de tejido adyacente a la nervadura central.

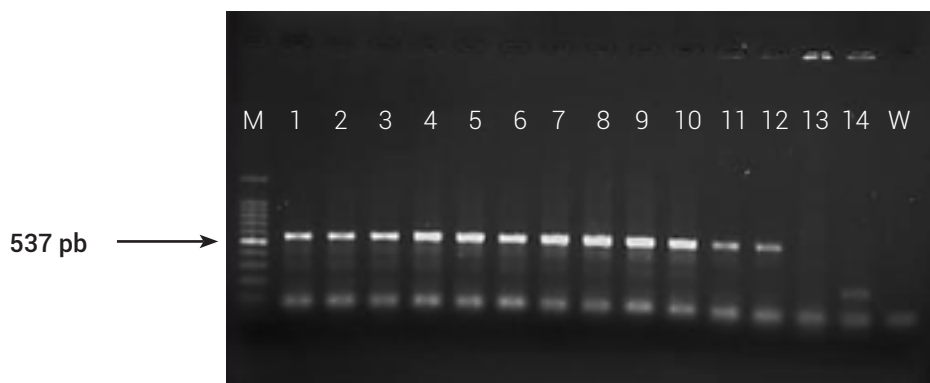


Figura 4. Amplificación del gen *hrp* de 12 cepas aisladas de diferentes genotipos de fresa. M: marcador molecular 100 pb; 1 a 12: 3 (Frag26.S), 6 (Frag26.S), 7 (Frag32.D), 8 (Frag35.O), 14 (Frag38.B), 22 (Frag26.S), 19 (Frag35.O), 21 (Frag32.D), 24 (Frag29.M), 27 (Frag35.O), 28 (Frag35.O), 29 (Frag26.S), 13 (*X. vesicatoria*), 14 (*X. phaseoli*), W (agua).

utilidad para una detección rápida, confiable y específica de este patógeno en México. La inoculación de la cepa *X. fragariae*-22 en plantas susceptibles de fresa confirmó la patogenicidad de los aislamientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Allan-Wojtas P., P. D. Hildebrand, P. G. Braun, H. L. Smith-King, S. Carbyn and W. E. Renderos (2010) Low temperature and anhydrous electron microscopy techniques to observe the infection process of the bacterial pathogen *Xanthomonas fragariae* on strawberry leaves. *Journal of Microscopy* 239:249-258. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03373.x>.
- Fernández-Pavía S. P., G. Rodríguez-Alvarado, E. Garay-Serrano y R. Cárdenas-Navarro (2014) First report of *Xanthomonas fragariae* causing angular leaf spot on strawberry plants in México. *Plant Disease* 98:682. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0691-PDN>.
- Hajri A., C. Brin, G. Hunault, F. Lardeux, C. Lemaire, C. Manceau, T. Boureau and S. Poussier (2009) A «repertoire for repertoire» hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* 4(8):e6632. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006632>.
- Hildebrand P. D., P. G. Braun, W. E. Renderos, A. R. Jamieson, K. B. McRae and M. R. Binns (2005) A quantitative method for inoculating strawberry leaves with *Xanthomonas fragariae*, factors affecting infection, and cultivar reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27:16-24. <http://dx.doi.org/10.1080/07060660509507189>.
- Janse J. D., M. P. Rossi, R. F. J. Gorkink, J. H. J. Derks, J. Swings, D. Janssens and M. Scortichini (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. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00644.x>.
- Klančnik A., S. Piskernik, B. Jeršek and S. S. Možina (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81:121-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>.
- Mirmajlessi S. M., M. Destefanis, R. A. Gottsberger, M. Mänd and E. Loit (2015) PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: a systematic review. *Systematic Reviews* 4:9. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-4053-4-9>.
- Roberts P. D., J. B. Jones, C. K. Chandler, R. E. Stall and R. D. Berger (1996) Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in Summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Disease* 80:1283-1288.
- Schaad N. W., J. B. Jones and W. Chun (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>.
- Scortichini M. and M. P. Rossi (2003) Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* strains and comparison with some other *X. arboricola* pathovars using repetitive PCR genomic fingerprinting. *Journal of Phytopathology* 151:113-119. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00591.x>.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2015) Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por estado. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do (Febrero 2017).
- Ustun N., N. N. A. Tjou-Tam-Sin and J. D. Janse (2007) First report on bacterial leaf blight of strawberry caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* Janse *et al.* in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 89:109-112.
- Vandroemme J., B. Cottyn, S. Baeyen, P. De Vos and M. Maes (2013a) Draft genome sequence of *Xanthomonas fragariae* reveals reductive evolution and distinct virulence-related gene content. *BMC Genomics* 14:829. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-829>.
- Vandroemme J. B. Cottyn, J. F. Pothier, V. Pflüger, B. Duffy and M. Maes (2013b) *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*: what's in a name? *Plant Pathology* 62:1123-1131. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12028>.
- Weisburg W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.