

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

“A genomic perspective of the determinants of pathogenicity, host specificity and plant colonization by *Xanthomonas arboricola*”. Tesis doctoral realizada en el INIA-CSIC y asociada a un programa de doctorado de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

DOCTORANDA: Sara Raquel Cuesta Morrondo

PROGRAMA DE DOCTORADO: Programa de Doctorado en Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados

DIRECTORES: Jaime Cubero Dabrio (INIA-CSIC) y Jerson Garita Cambroneró (ITACyL)

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACIÓN: Esta tesis doctoral se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del INIA-CSIC y fue financiada mediante las Ayudas RTI2018-096018-R-C31 y PID2021-123600OR-C41 financiadas por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y por “ERDF una manera de hacer Europa”. Sara Raquel Cuesta Morrondo fue receptora de una ayuda PRE2019-090846 financiada también por MCIN/AEI y por “ESF Invierte en tu futuro”.

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 14 de enero de 2026. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAB). Universidad Politécnica de Madrid.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Emilio Montesinos Seguí (presidente), Luis Rey Navarro (secretario), Jesús Murillo Martínez, Ester Marco Noales, Joël F. Pothier.

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*. Mención internacional.

RESUMEN

Xanthomonas arboricola es una especie de bacterias asociadas a plantas que incluye tres patovares con un impacto agrícola y económico significativo. *X. arboricola* patovar (pv.) pruni (Xap) causa la mancha bacteriana en especies de *Prunus* spp.; *X. arboricola* pv. juglandis (Xaj) afecta al nogal (*Juglans* spp.), provocando el tizón bacteriano del nogal (WBB), la necrosis apical parda (BAN) y el chancro exudativo vertical (VOC); y *X. arboricola* pv. corylina (Xac) causa el tizón bacteriano del avellano (*Corylus* spp.). Además, la especie comprende otros cuatro patovares de menor relevancia económica que presentan una baja incidencia y distribución: pvs. celebensis, arracaciae, fragariae y zantedeschiae; así como otras cepas sin afiliación a patovar.

El objetivo general de esta tesis ha sido realizar un análisis genómico, complementado con estudios fenotípicos, que no solo proporciona una identificación precisa de las cepas de *X. arboricola*, sino que también permite identificar los mecanismos subyacentes a los procesos de infección y colonización por estas bacterias. Se obtuvieron los genomas completos de dos cepas pertenecientes a cada uno de los patovares más relevantes que mejoraron los ensamblajes previos y permitieron un estudio comparativo exhaustivo de los factores de virulencia implicados en el desarrollo de la enfermedad, en particular los sistemas de secreción y sus sustratos. Este análisis llevó a la identificación de algunos sistemas conservados, incluidos el sistema de secreción tipo II (T2SS) y el sistema de secreción tipo III (T3SS); y también permitió identificar características específicas de cepa o patovar.

Asimismo, los genomas completos facilitaron el estudio de los sistemas de secreción implicados en la competencia interbacteriana. Los resultados mostraron que las cepas analizadas carecían del sistema de secreción tipo VI (T6SS), pero poseían el tipo IV (T4SS) con un conjunto variable de efectores. Además, los análisis funcionales demostraron que el T4SS era efectivo para eliminar competidores bacterianos.

El análisis genómico completo también permitió la reclasificación de dos cepas de *X. arboricola* aisladas de cerezo, previamente consideradas como Xap. El análisis genómico comparativo, complementado con pruebas de patogenicidad y moleculares, reveló que estas cepas pertenecen a la especie *X. arboricola*, pero difieren de Xap, lo que tiene importantes implicaciones para su estatus regulatorio y las estrategias de manejo.

Finalmente, un análisis exhaustivo de los genomas disponibles de *X. arboricola* depositados en GenBank mostró que los genomas de los patovares menos relevantes y los no afiliados se agrupan en dos grupos, G1 y G2, distintos de Xap, Xac y Xaj. Las comparaciones genómicas identificaron diferencias en el contenido de T3SS y en los efectores de tipo III (T3Es) entre los diferentes patovares y grupos. Los resultados indicaron que, mientras Xap, Xaj y Xac portaban T3SS y un amplio repertorio de T3Es, las cepas de G1 presentaban T3SS y un conjunto reducido de T3Es, mientras que las cepas de G2 carecían de este sistema y presentaban un repertorio mínimo de T3Es. Además, también se observaron diferencias en los conjuntos de enzimas hidrolíticas, así como en la capacidad de maceración y en la actividad amilolítica de los diferentes patovares y grupos. Estos resultados, junto con los datos de patogenicidad reportados en la literatura, sugieren que las cepas de G1 y G2 podrían presentar un estilo de vida comensal, aunque algunas cepas podrían comportarse además como patógenos oportunistas en circunstancias adecuadas.

Este estudio contribuye a mejorar la comprensión de la especie *X. arboricola*, destacando la necesidad de dilucidar sus mecanismos de infección y colonización con el objetivo final de desarrollar estrategias de control más efectivas de las enfermedades que causa. Asimismo, se resalta la utilidad de la identificación de estos patógenos basada en genómica para lograr una evaluación de riesgos y regulación más precisa.



La doctoranda, los directores de tesis y los miembros del tribunal después de la defensa. De izquierda a derecha: Luis Rey Navarro (secretario), Jerson Garita Cambroner (codirector), Jaime Cubero Dabrio (codirector), Sara R. Cuesta Morrondo (doctoranda), Emilio Montesinos Seguí (presidente), Jesús Murillo Martínez, Ester Marco Noales, Joël F. Pothier.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTA TESIS DOCTORAL

- 1) Cuesta-Morrondo, S., Redondo, C., Palacio-Bielsa, A., Garita-Cambroner, J., & 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*, 112(8), 1808-1813. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-21-0436-A>

- 2) Cuesta-Morrondo, S., Garita-Cambroner, J., & Cubero, J. (2025). Unraveling the genomic complexity of secretion systems in the most virulent *Xanthomonas arboricola* pathovars. *PLoS One*, 20(9), e0332834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0332834>
- 3) Cuesta-Morrondo, S., Palacio-Bielsa, A., Popovici, T., Obodavtov, A., Garita-Cambroner, J., & Cubero, J. (2026). Revisiting the identification of *Xanthomonas arboricola* strains isolated from cherry in Montenegro through genome analysis and pathogenicity testing. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-25-0168-SC>
- 4) Cuesta-Morrondo, S., Sastre, S., Garita-Cambroner, J., & Cubero, J. Genomic and enzymatic signatures underlying lifestyle diversity in *Xanthomonas arboricola*. ENVIADO A: *Microbial Genomics*

TRABAJOS PUBLICADOS EN COLABORACIONES DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

- 1) Pérez-Quintero, A. L., Rodríguez-R, L. M., Cuesta-Morrondo, S., Hakalová, E., Betancurt-Anzola, D., Valera, L. C. C., ... & Koebnik, R. (2023). Comparative genomics identifies conserved and variable TAL effectors in African strains of the cotton pathogen *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*. *Phytopathology*, 113(8), 1387-1393. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-22-0477-SC>
- 2) Cubero, J., Zarco-Tejada, P. J., Cuesta-Morrondo, S., Palacio-Bielsa, A., Navas-Cortés, J. A., Sabuquillo, P., ... & Garita-Cambroner, J. (2024). New approaches to plant pathogen detection and disease diagnosis. *Phytopathology*, 114(9), 1989-2006. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-23-0366-IA>

Formatted: English (US)

ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

- 1) Cubero, J., Cuesta-Morrondo, S., Sabuquillo Castrillo, M. P., Hernandez-Escribano, L., Redondo, C., & Martín, L. (2022). Bacteriología en el INIA/CSIC: utilidad de las técnicas

ómicas para el control de enfermedades provocadas por bacterias en planta. Grupo de Bacteriología (INIA). Sem@foro.

2) Bielsa, A. P., Berruete, I. M., Cambroner, J. G., Sabuquillo, P., Cuesta-Morrondo, S. , & Cubero, J. (2022). Avances en detección y diagnóstico de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni: agente causal de la mancha bacteriana de" *Prunus* spp.". Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal, (341), 5.

3) Cuesta Morrondo, S. (2024). Disbiosis del microbioma foliar desencadenada por la secreción enzimática dependiente del sistema de secreción tipo II de *Xanthomonas* patógenas oportunistas. Comentarios de Artículos Científicos, Revista de la Sociedad Española de Fitopatología, 60–61.

4) Camañes, G., Palacio-Bielsa, A., Cubero, J., Biosca, E. G., Liu Xu, L., Sánchez Jiménez, L., ... & Vicedo, B. (2025). Estrategias de lucha contra *Xanthomonas* spp. para una agricultura sostenible.