



Instituto Universitario de Investigación Mixto
Agroalimentario de Aragón
Universidad Zaragoza

CURSO: GESTIÓN INTEGRADA DE PLAGAS PARA ASESORES

BACTERIAS FITOPATÓGENAS

A. Palacio-Bielsa

Zaragoza, 12 de septiembre de 2019



UNIÓN EUROPEA

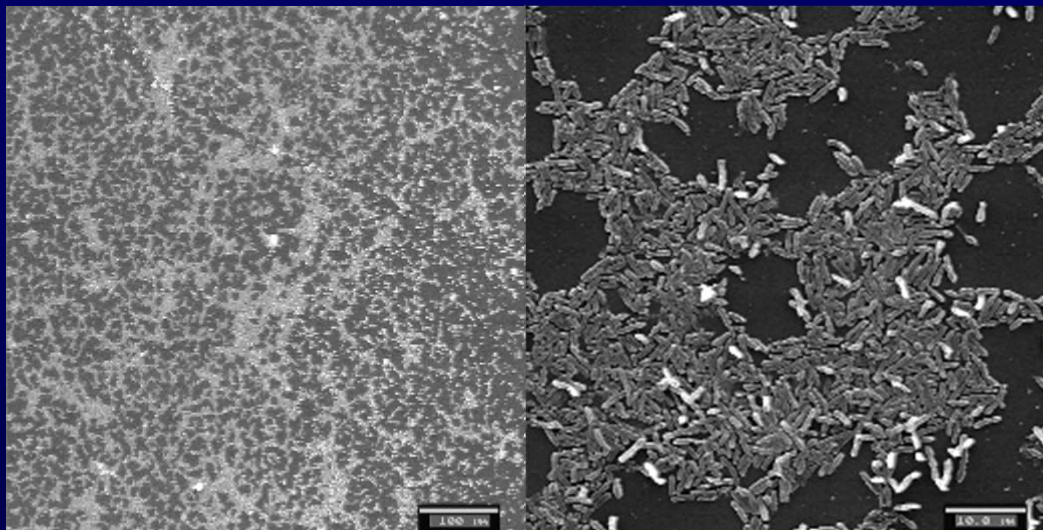
Fondo Europeo Agrícola
de Desarrollo Rural. FEADER

CARACTERÍSTICAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS

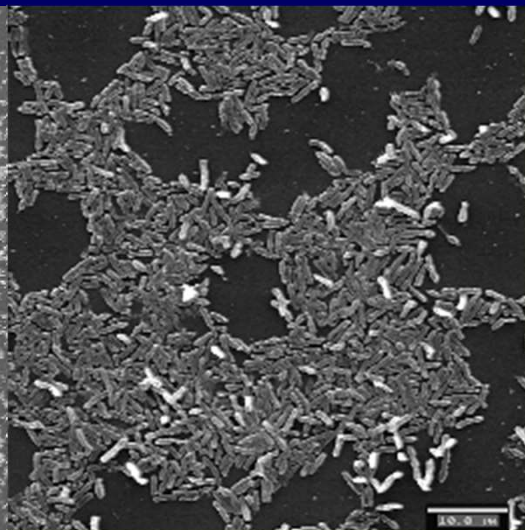
- Causantes de enfermedades en plantas
- Organismos unicelulares procariotas
- Sólo visibles al microscopio (μm)
- Pared celular (Gram positivas y Gram negativas)
- Un único cromosoma, ADN doble hélice, libre en el citoplasma (carecen de verdadero núcleo)
- Escisión binaria (reproducción no sexual)
- Plásmidos (ADN extracromosómico)

Tamaño y morfología

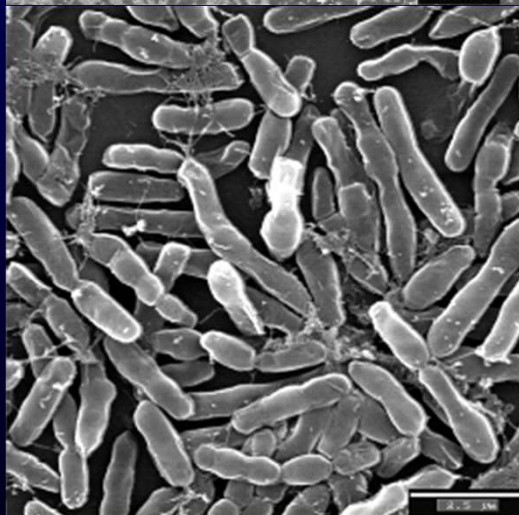
✓ 180 X



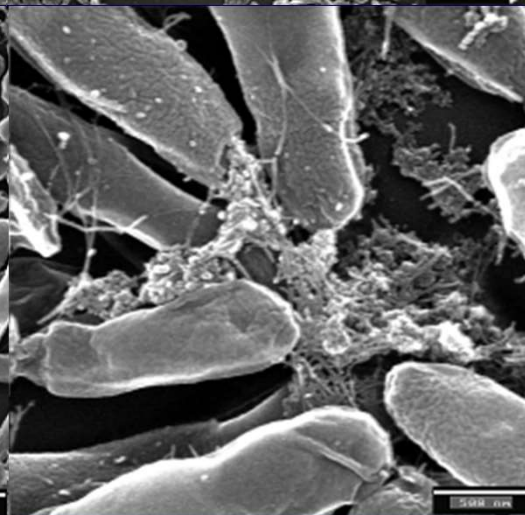
✓ 1800 X



✓ 10000 X



✓ 40000 X



TAXONOMÍA BACTERIAS FITOPATÓGENAS

- **Fenética:** comparación de caracteres morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, serológicos y análisis de similitud o disimilitud.
- **Filogenética (parentesco evolutivo).** Biología molecular: comparación de secuencias genómicas (gen del ARNr 16S baja tasa de mutación, conservado), hibridación ADN/ADN, secuenciación.

Género

Especie (sp.): composición de G+C similar, similitud $\geq 70\%$ en hibridación ADN-ADN y similitud de secuencia en el gen del ARNr 16S $\geq 97\%$

Subespecie (subsp.): variaciones fenotípicas o genéticas consistentes, pero de menor orden.

Rangos infrasubspecíficos: patovar (diferencias en patogenicidad), entre otros.

Más de 60 especies y 300 subespecies y patovares (www.bacterio.net)

• MULTIPLICACIÓN BACTERIANA

Cinética de progresión geométrica respecto al número de células (escisión binaria): 1, 2, 4, 8, 16...

• CRECIMIENTO POBLACIONAL

- ✓ **FASE DE LATENCIA:** Adaptación al huésped
- ✓ **FASE EXPONENCIAL:** Progresión geométrica

Existen factores limitantes: nutrientes, pH, tóxicos, etc.

- ✓ **FASE ESTACIONARIA:** Cese del crecimiento
- ✓ **FASE DE MUERTE:** Cese de viabilidad celular

• CRECIMIENTO COLONIAL

Crecimiento en sustrato sólido a partir de una o unas pocas células

• SUPERVIVENCIA

- ✓ **Interacción bacteria-huésped:** Pueden sobrevivir en tejidos u órganos de plantas (en fase de latencia o activa). Epífitas, endófitas, haces vasculares, semillas.
- ✓ Suelo, agua, plantas no huéspedes (reservorios).

• MECANISMOS DE DISPERSIÓN (CORTA O LARGA DISTANCIA)

- ✓ **NATURALES:** exudados bacterianos, viento, lluvia, insectos vectores, etc.
- ✓ **AGRONÓMICOS:** intercambios de plantas o semillas, herramientas, maquinaria, agua de riego.

Fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*)

Insectos vectores
(polinizadores)





Xylella fastidiosa

© Dr. Doug Cook, UC Davis

Philaenus spumarius

D. O'Shea. <http://www.britishbugs.org.uk>



ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS



ENFERMEDADES BACTERIAS FITOPATÓGENAS

6 síndromes:

- Manchas foliares o en frutos
- Chancros y marchitamientos de plantas leñosas
- Marchitamientos de plantas herbáceas
- Podredumbres blandas
- Hiperplasias y proliferaciones (tumores)
- Roñas o costras



Pseudomonas syringae pv. *pisii*

Xanthomonas vesicatoria



Xanthomonas arboricola* pv. *pruni



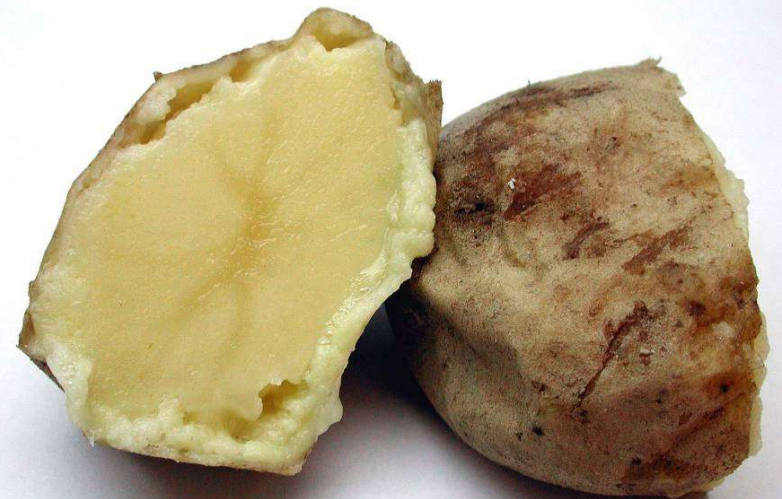
A close-up photograph of a tree trunk. The bark is brown and textured. A vertical crack runs down the center, filled with a dark, resinous substance. A small, dark insect with a reddish-brown thorax is visible on the bark near the crack. The background is filled with green leaves, some in focus and some blurred.

Xanthomonas arboricola* pv. *pruni



Dickeya zeae

***Pectobacterium* spp.**



Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi

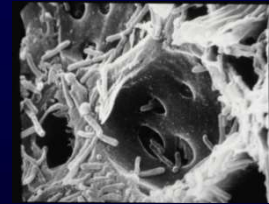


Agrobacterium vitis





Xylella fastidiosa



Síntomas confundibles



Erwinia amylovora



Janus compressus

CRIBADO O PERDIGONADA
(*Stigmina carpophila*)



MANCHA BACTERIANA *Prunus* spp.
Xanthomonas arboricola* pv. *pruni



IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS BACTERIOSIS

- **Consideradas como organismos de cuarentena en la UE (RD 58/2005).** Gravedad de los daños, pueden llegar a imposibilitar el cultivo. Distribución restringida.

Erwinia amylovora, Xanthomonas arboricola pv. *pruni*,
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*,
C. michiganensis subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*,
Xylella fastidiosa

- **Menos graves y ampliamente distribuidas**
Dickeya spp., *Pectobacterium* spp., *Agrobacterium* spp.

CONTROL DE BACTERIOSIS

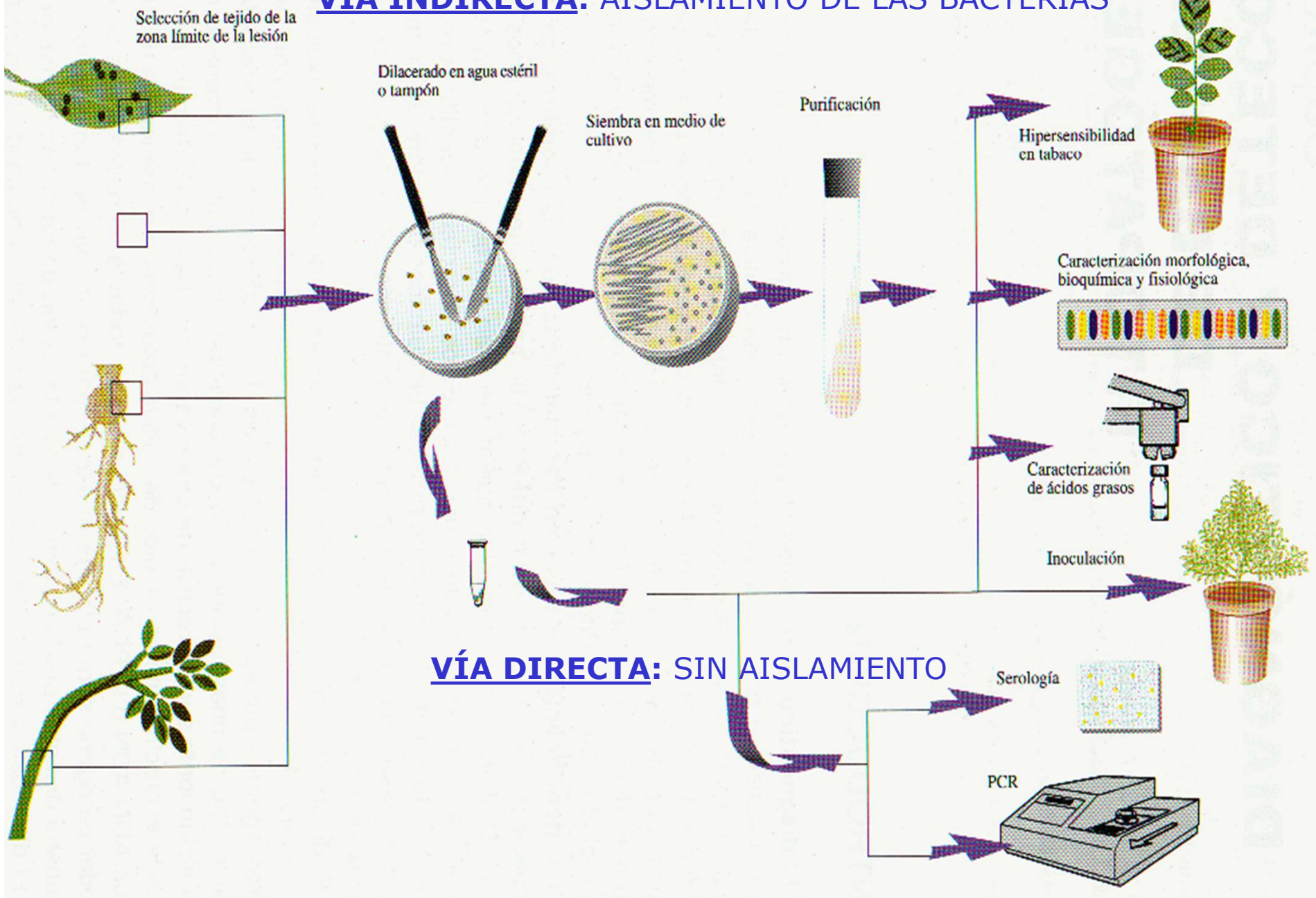
MEDIDAS PREVENTIVAS. Evitar introducción del patógeno en nuevas áreas. Utilización de material vegetal sano certificado (inspección, cuarentena)

MÉTODOS DE LUCHA. Reducir nivel de inóculo y evitar dispersión generalizada. Estrategias integrando diversos aspectos: prácticas culturales, lucha química, control biológico, resistencias genéticas. **Erradicar plantas infectadas**

Esencial diagnóstico precoz y sensible

Protocolo general análisis integrado bacterias fitopatógenas

VÍA INDIRECTA: AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS



PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Dilacerado o lavado en agua o tampón estéril

Lavado interno (sistema vascular)

Enriquecimiento en medios líquidos semiselectivos

AISLAMIENTO DE BACTERIAS

- **Objetivos:**

Conocer la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota.

Obtener colonias separadas (clon para su estudio).

- **Dificultades:**

Mezclas de bacterias patógenas y saprófitas.

En número suficiente, viables y cultivables en el medio seleccionado.

Se requiere de 3 días a varias semanas.

MEDIOS DE CULTIVO

Líquidos o sólidos. Aportan elementos minerales y orgánicos necesarios (extractos vegetales o animales (peptonas, hidrolizado de caseína, extracto de levadura, etc.)

GENERALES:

NA

LPGA

B de King

Levano

SEMI-SELECTIVOS:

CCT (*Erwinia amylovora*)

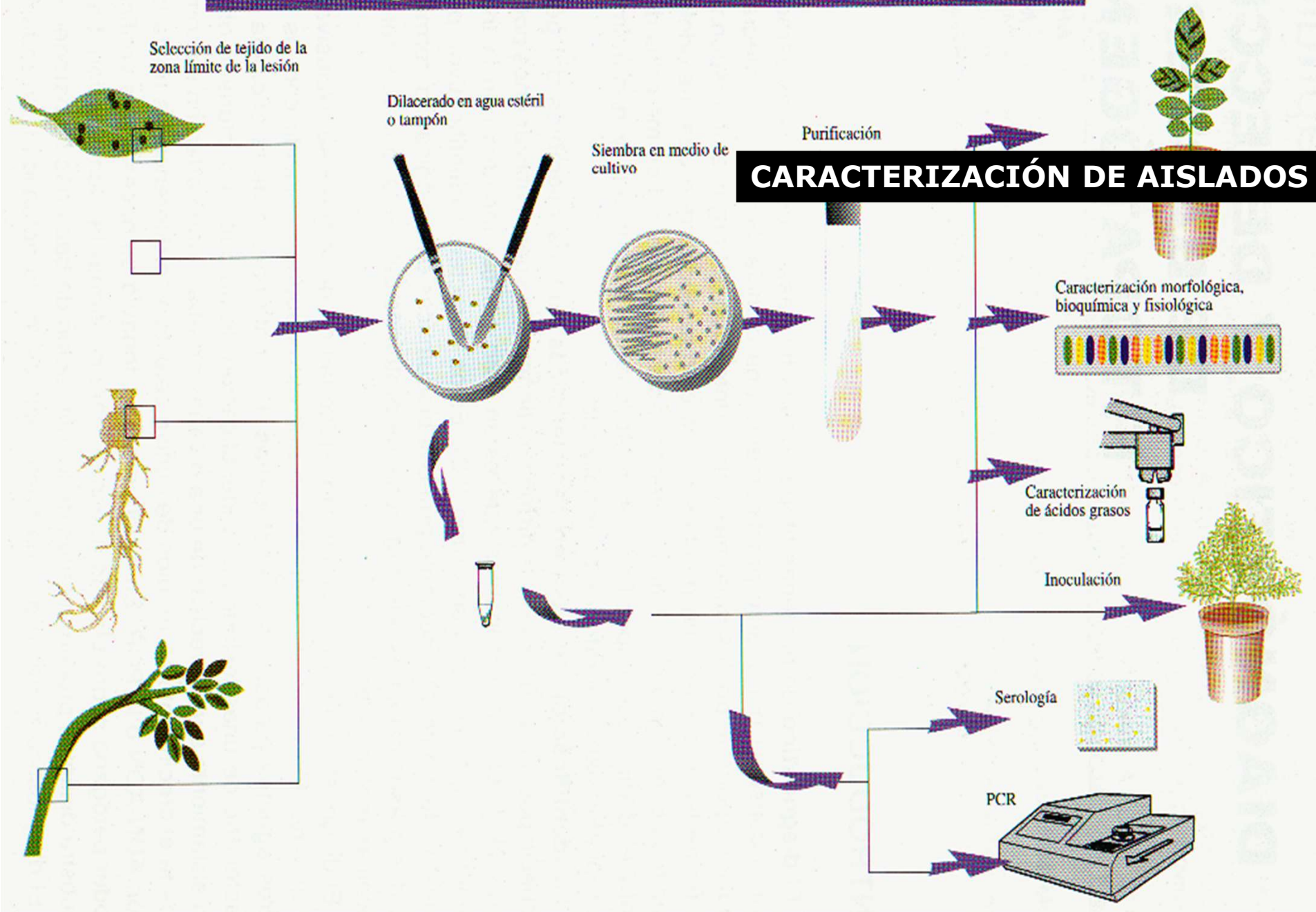
CVP (*Dickeya* spp. y *Pectobacterium* spp.)

SMSA (*Ralstonia solanacearum*)

CKTM (*X. campestris* pv. *vesicatoria*)

NDA (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*)

Diagnóstico de bacterias fitopatógenas.

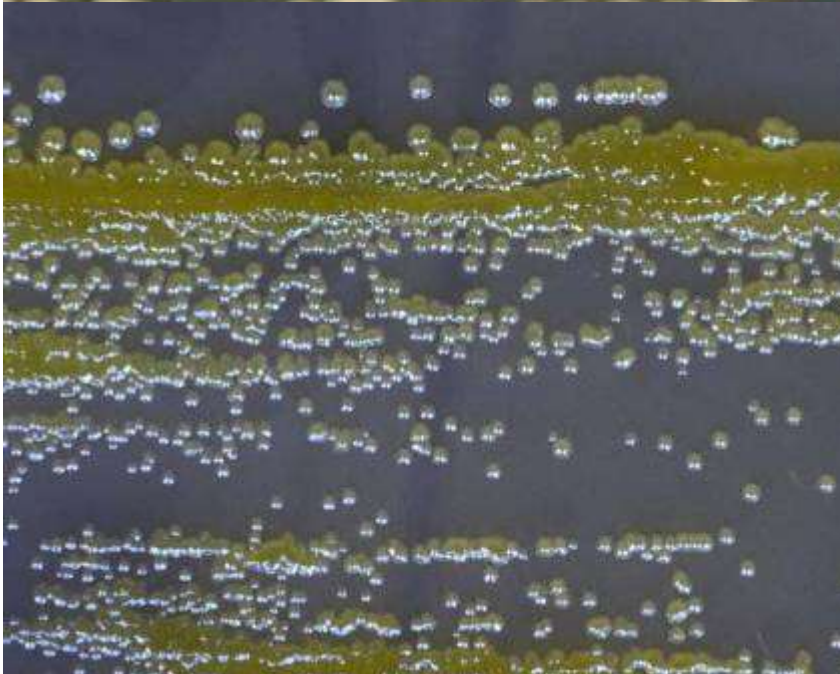


CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS BACTERIANOS

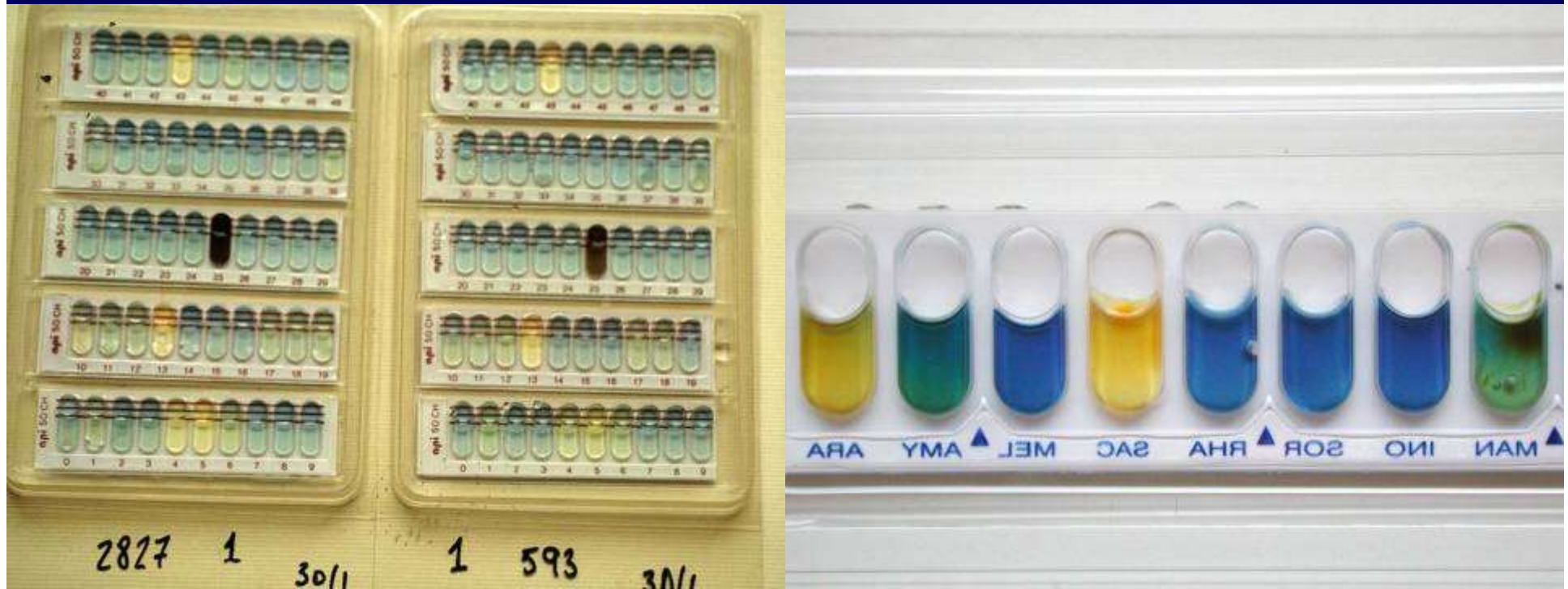
(cultivo axénico)

- **Morfología de las colonias** (polimorfismo): forma, color, pigmentos...
- **Características de la célula:** GRAM, flagelos...
- **Bioquímica y fisiológica:** utilización de sustancias y acidificación o alcalinización del medio
- **Composición de ácidos grasos, sensibilidad bacteriófagos**
- **Técnicas serológicas:** ELISA, IF
- **Técnicas moleculares:** PCR

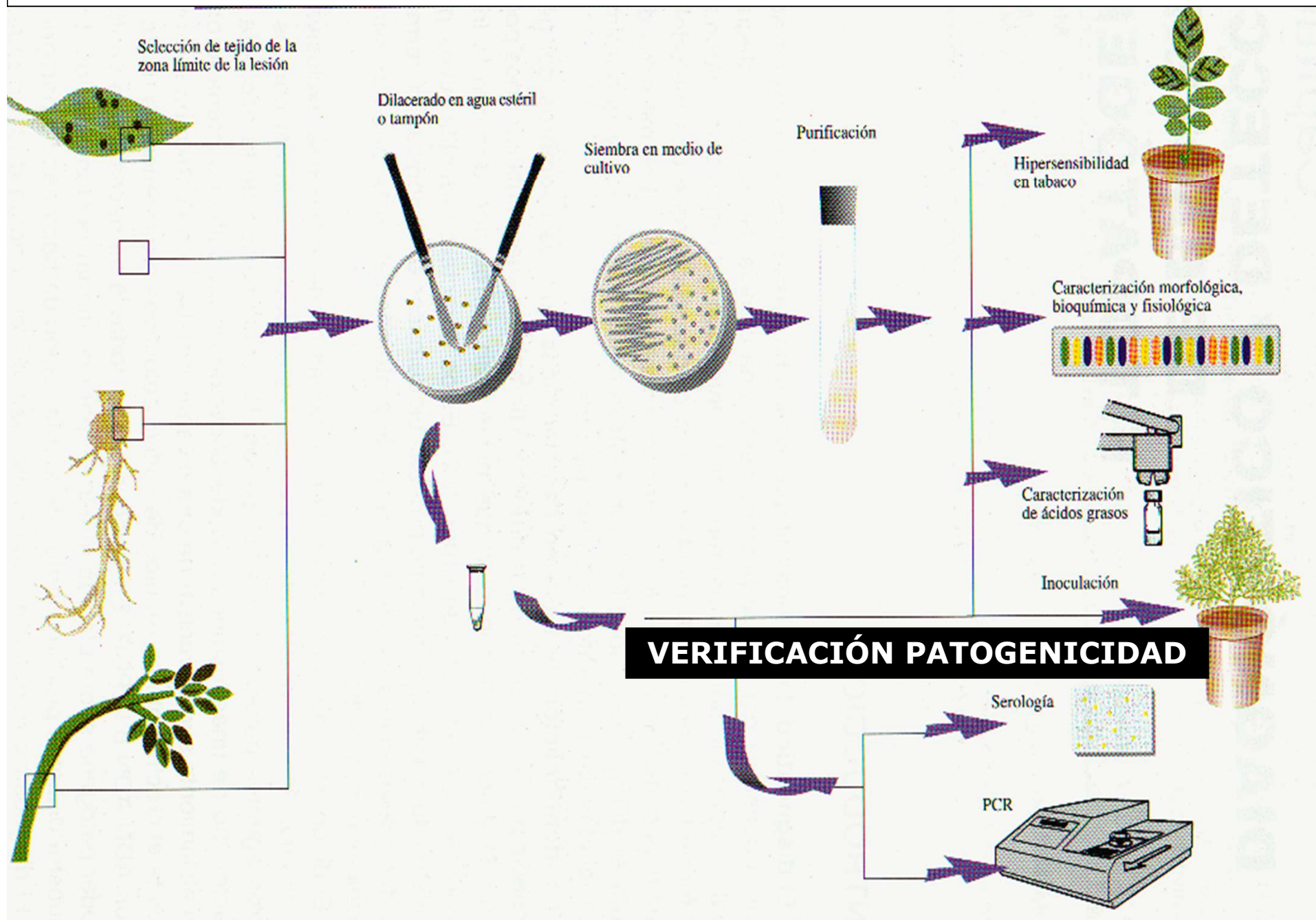
Diferencias morfológicas



Asimilación azúcares (multiprueba API)



Protocolo general análisis integrado bacterias fitopatógenas

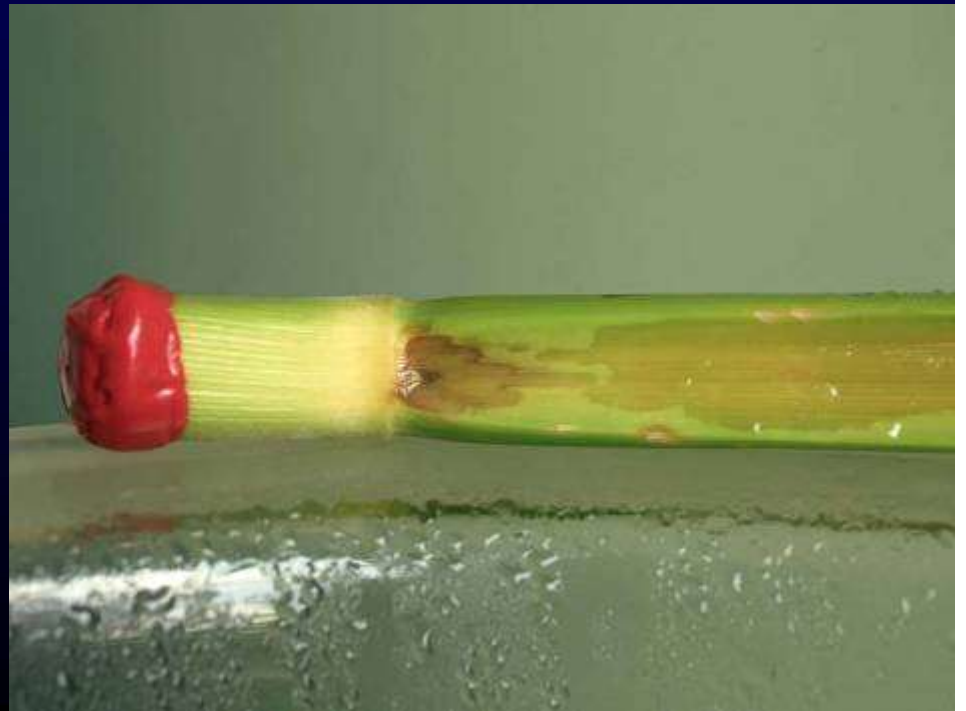


VERIFICACIÓN DE LA PATOGENICIDAD

Postulados de Koch:

Huésped original o alternativo, condiciones favorables para desarrollo de la enfermedad, multiplica la bacteria y produce síntomas.

Reaislar la bacteria inoculada a partir de los síntomas.



Agrobacterium en vid (tumores)



339-26

C58

C58-C1

Bv3

Bv1

Bv2

INOCULACIÓN EN HUÉSPEDES ALTERNATIVOS

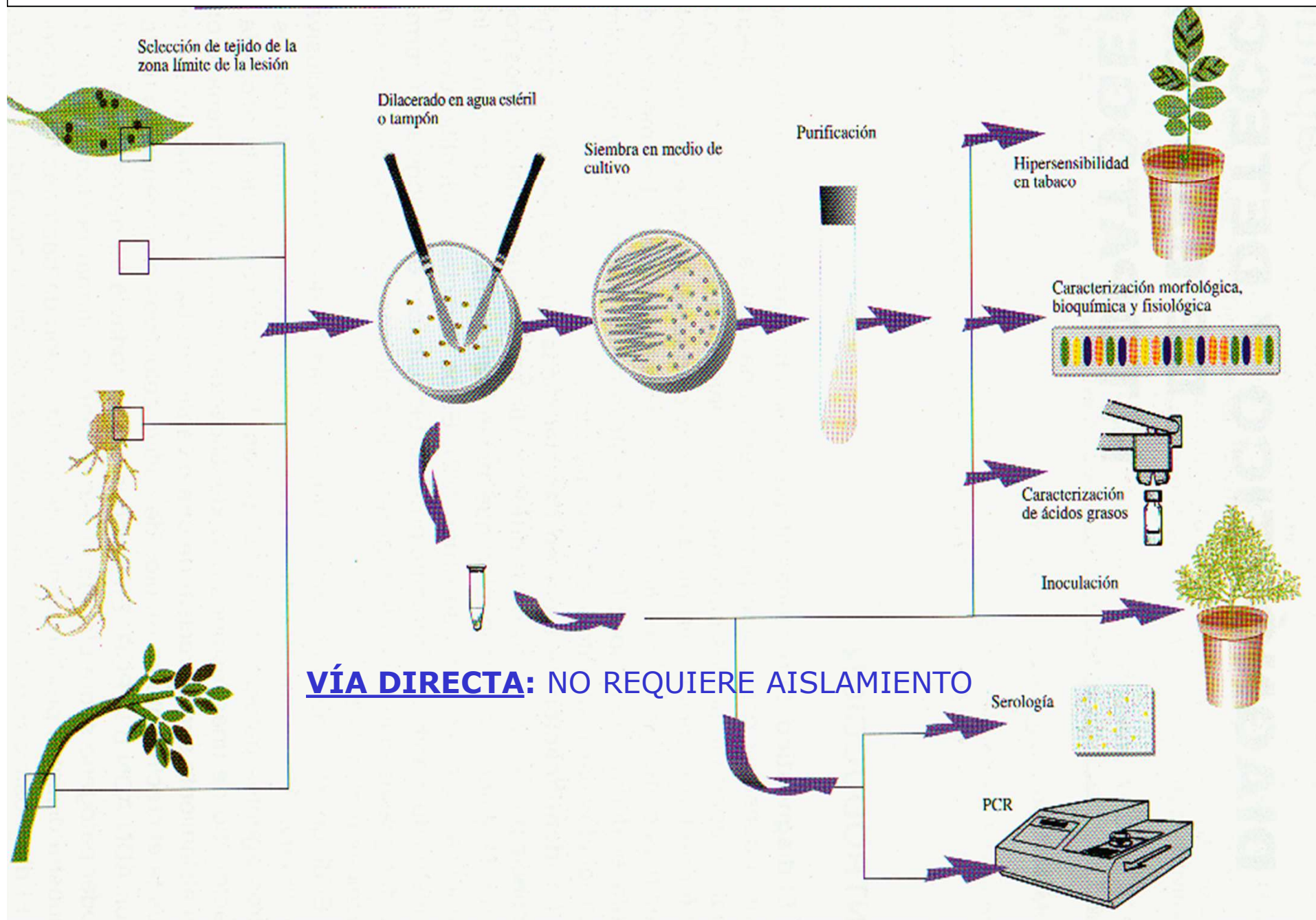
Agrobacterium en tabaco



Agrobacterium en tomate



Protocolo general análisis integrado bacterias fitopatógenas



TÉCNICAS SEROLÓGICAS

- **ELISA** (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- **INMUNOFLUORESCENCIA (IF)**

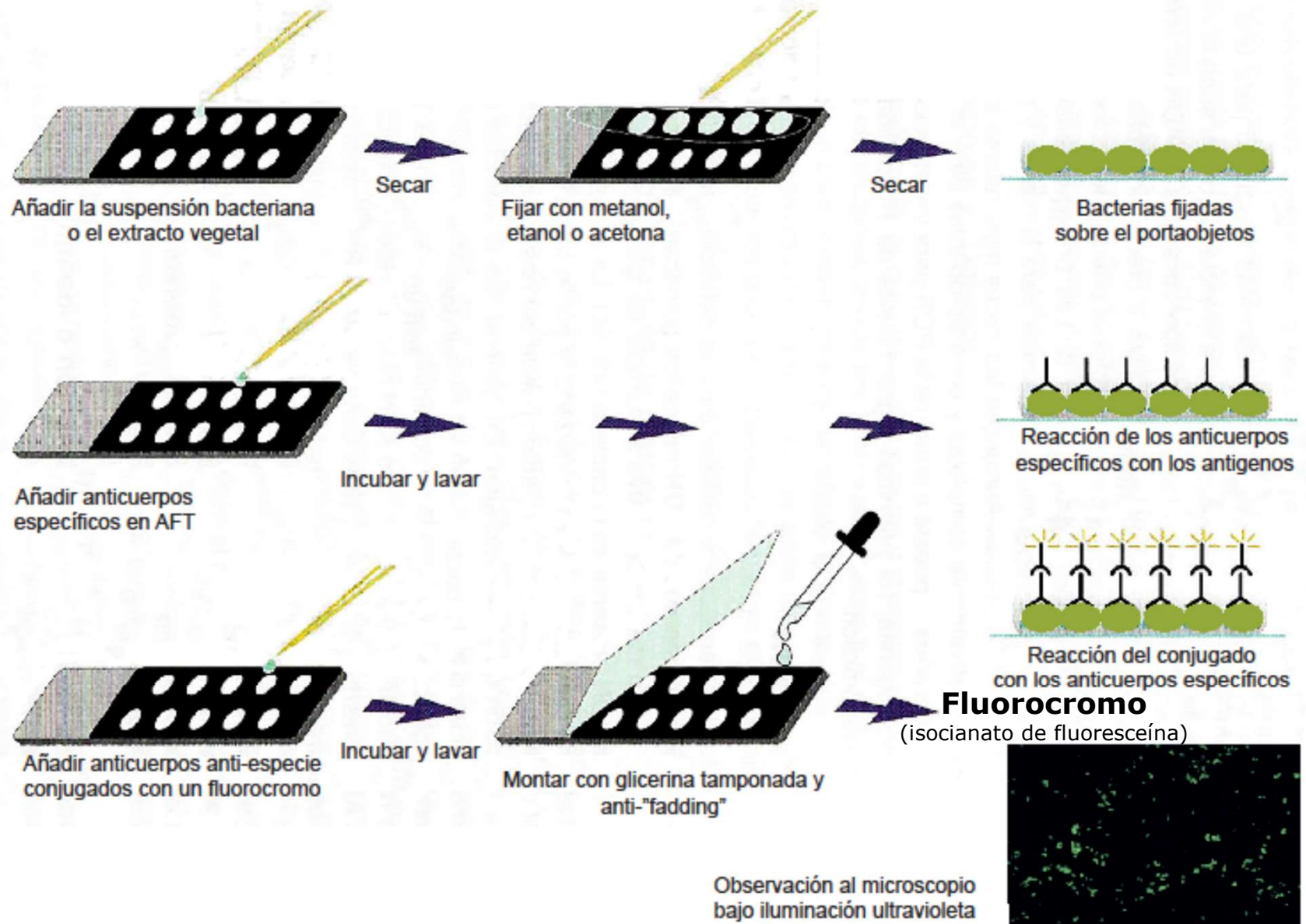
ELISA

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

- Reacción serológica: antígeno-anticuerpo
- Uno de los componentes marcado con una enzima (fosfatasa alcalina)
- Complejo antígeno-anticuerpo se ve revelado añadiendo un sustrato (p-nitrofenilfosfato) que al actuar la enzima produce color amarillo. Cuantificable mediante espectrofotómetro



Inmunofluorescencia

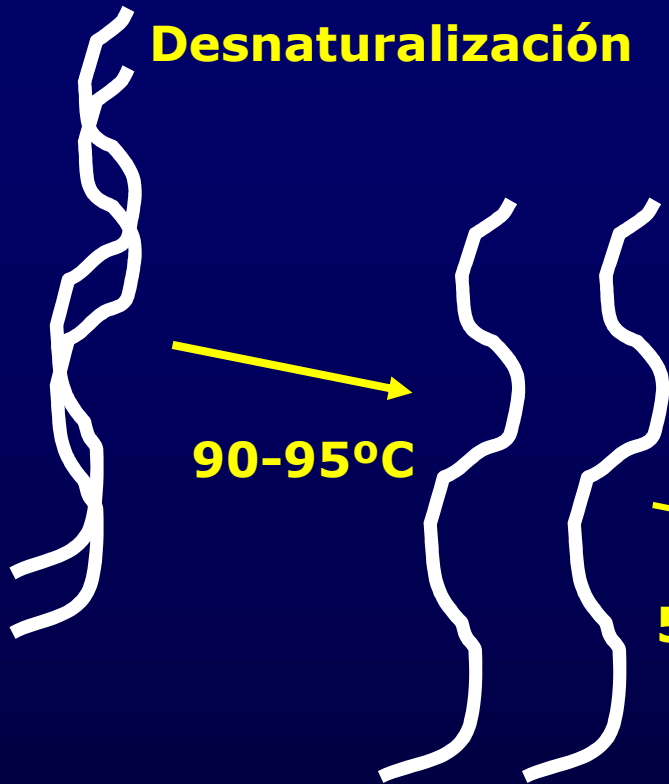


TÉCNICAS MOLECULARES

PCR (*polymerase chain reaction*)

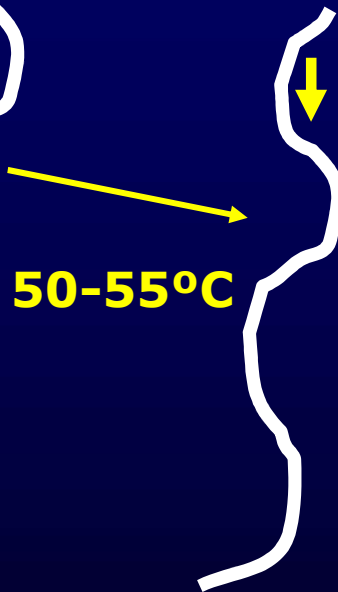
- Síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN.
- Usando como cebadores 2 oligonucleótidos que hibridan con las cadenas del ADN molde flanqueando la región de interés. Secuencias en bases de datos (genes ribosómicos, de patogenicidad/virulencia, plasmídicos)
- Enzima (Taq DNA polimerasa)
- Amplifica exponencialmente un fragmento específico cuyos extremos vienen definidos por los extremos 5' de los cebadores.

Desnaturalización



Apareamiento: Hibridación del molde

Cebadores



**Taq
Tampón
MgCl₂
dNTPs
Agua**

Síntesis del ADN



TERMOCICLADOR



95° C 10´

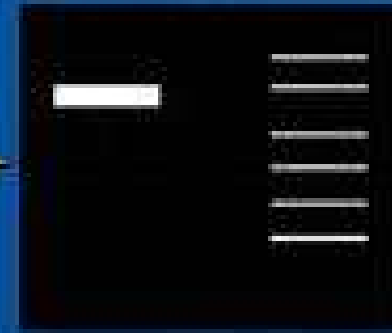
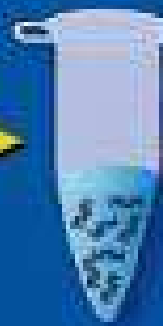
95° C

50° C

72° C

ciclos

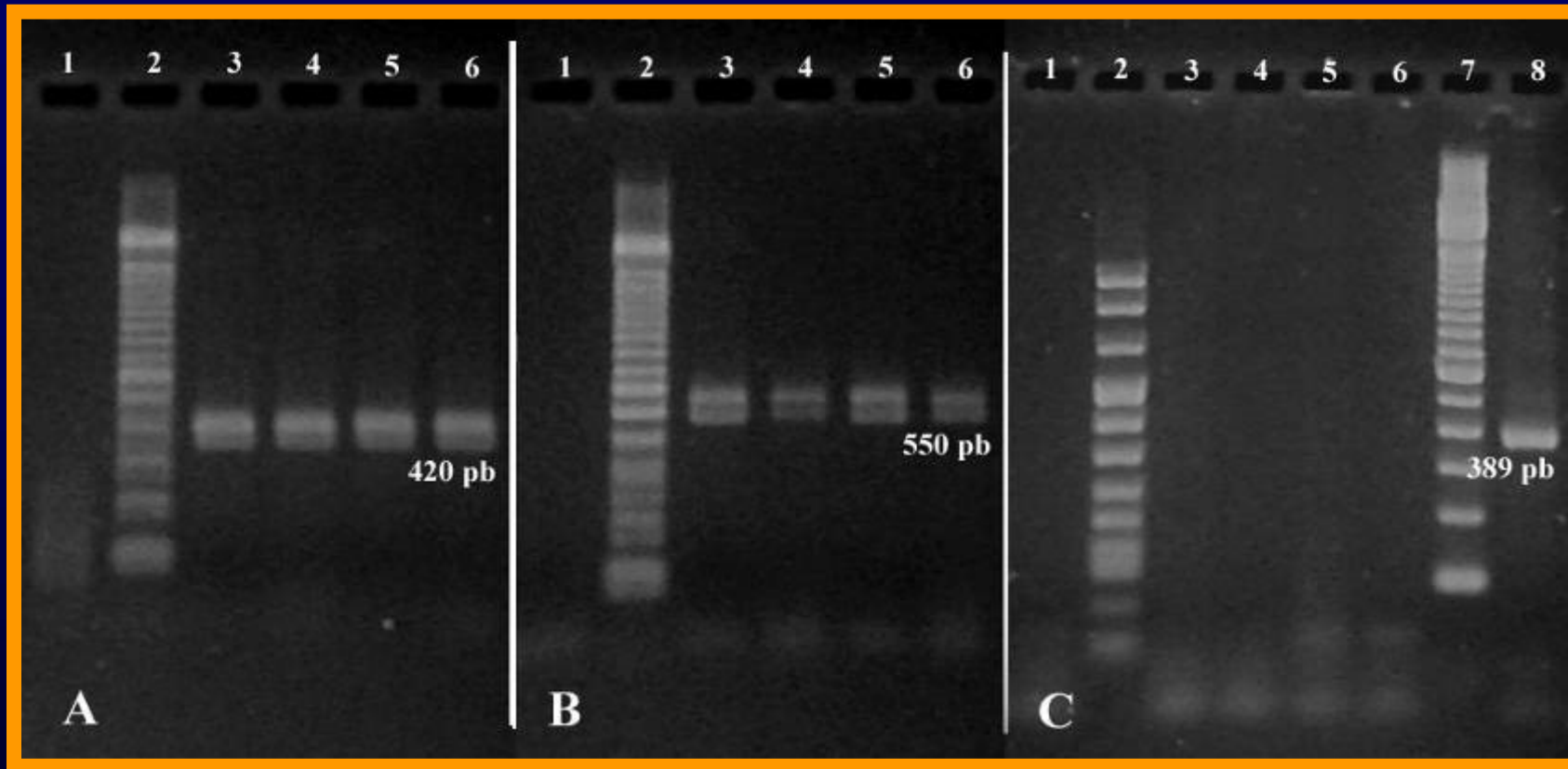
PCR convencional



Amplificación ADN

Electroforesis

Amplificación por PCR de aislados de *Dickeya* spp. y *Pectobacterium* spp. con distintos cebadores



A) *Dickeya* (ADE1/ADE2)

B) *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (EXPCCF/EXPCCR)

C) *P. atrosepticum* (ERWFOR/ATROREV)

Inconvenientes PCR convencional

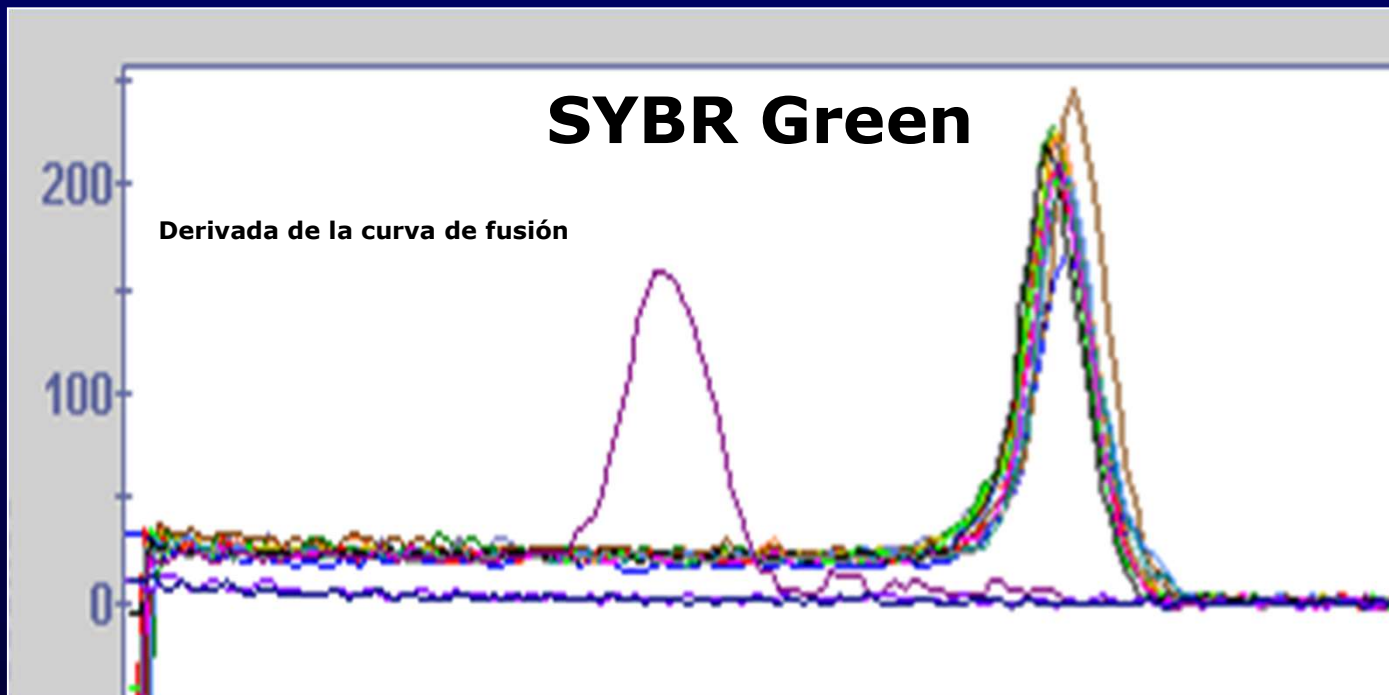
- * Relativamente baja sensibilidad**
- * Electroforesis**
- * Riesgo de contaminación entre muestras**

PCR EN TIEMPO REAL

Utiliza fluorocromos que aumentan la señal emitida en relación directa a los productos de amplificación que se van acumulando (tiempo real). Permiten cuantificación poblaciones patógeno. No requiere manipulación de los productos de amplificación.

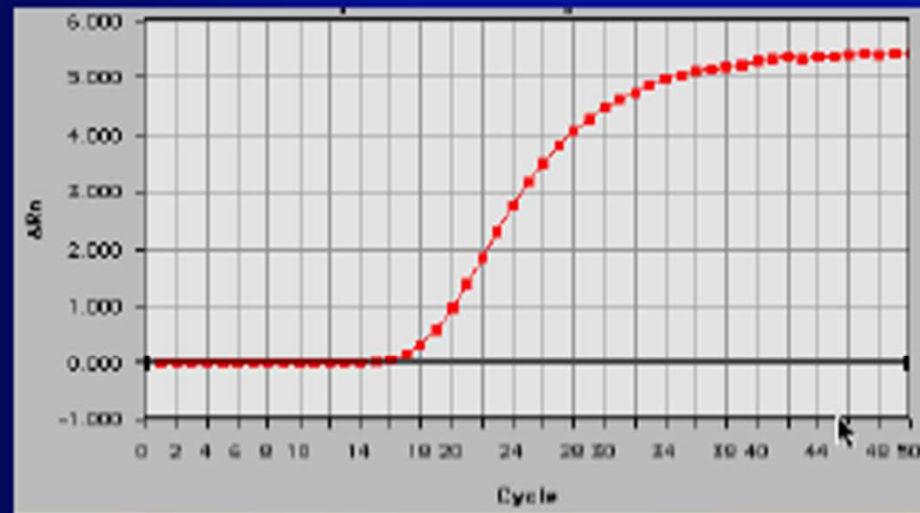
- Fluorocromo (SYBRGreen) que se intercala en el ADN de forma inespecífica. Amplificados se diferencian mediante análisis de curvas de fusión (secuencia).
- Sondas específicas marcadas con un fluoróforo que hibridan con la región interna del fragmento amplificado y liberan fluorescencia proporcionalmente a la cantidad del producto amplificado.

SYBR Green



PCR tiempo real con sonda

Incremento
de
fluorescencia



Ciclo de PCR

CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ El número de bacterias fitopatógenas en España va en aumento. Las entradas se producen fundamentalmente a través del movimiento de material vegetal infectado.
- ✓ Carencia de productos eficaces para el control químico. Se requiere una estrategia integrada, con medidas tendentes a minimizar la sensibilidad del huésped, la diseminación del patógeno y optimizar los tratamientos.
- ✓ Las medidas preventivas son esenciales para evitar su introducción y diseminación. Aplicación de normativa fitosanitaria vigente y diagnóstico rápido con técnicas sensibles.
- ✓ La gravedad de los daños producidos está influenciada por el propio patógeno, el huésped, las condiciones climáticas y, en algunos casos, los vectores.

