

Primera detección de *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* en chopo en España

IBARRA, N.¹, BERRUETE, I. M.², COLLADOS, R.³, CAMBRA, M. A.³, PALAZÓN, M. L.³, CUBERO, J.⁴, MONTERDE A. M.⁵, LÓPEZ, M. M.⁵, PALACIO-BIELSA, A.²

¹ Unidad de Salud de los Bosques (USB). Dirección General de Gestión Forestal, Caza y Pesca. Gobierno de Aragón. Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

² Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

³ Centro de Sanidad y Certificación Vegetal (CSCV). Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

⁴ Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Ctra. de Moncada a Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia.

⁵ Laboratorio de Bacteriología. Dpto. de Protección Vegetal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. de la Coruña km 7,5, 28040 Madrid.

Resumen

Lonsdalea quercina (ex *Brenneria quercina*) subsp. *populi* es una bacteria recientemente identificada en Hungría y China como una nueva subespecie causante del chancro de la corteza del chopo. Los árboles afectados presentan chancros longitudinales en el tronco, de los que fluyen abundantes exudados espumosos de color blanco y exudados acuosos oscuros que tiñen la corteza. Los chopos afectados muestran un debilitamiento generalizado.

En España se han localizado choperas con síntomas similares y se ha identificado *L. quercina* subsp. *populi* como el agente causal de los mismos. En este trabajo se presenta la primera detección de esta bacteria en España y se describen los métodos de diagnóstico e identificación utilizados. Esta nueva bacteriosis podría tener un impacto económico importante, siendo necesario evaluar las pérdidas causadas y realizar nuevas prospecciones para determinar su distribución en el país.

Palabras clave

Bacteriosis, *Populus x euramericana*, sintomatología, diagnóstico, identificación

1. Introducción

Entre los años 2014 y 2016, en nueve choperas de Aragón (localidades de Alcolea de Cinca, Monzón y Zaidín, ribera del Cinca, provincia de Huesca), se identificaron ejemplares de chopos híbridos *Populus x euramericana* (clones 'I-214' y 'MC') que presentaban chancros longitudinales en el tronco con abundantes exudados espumosos blancos y exudados acuosos oscuros. Al levantar la corteza de las zonas afectadas se observaba además una masa cremosa de color blanquecino (Figura 1). Estos exudados eran claramente visibles durante los meses de verano (junio-septiembre), pero desaparecían en otoño e invierno. Los chancros se localizaban a distintas alturas, pudiendo llegar a alcanzar casi toda la longitud del tronco. Los árboles afectados mostraban un debilitamiento generalizado que afectaba a su crecimiento y a la calidad de la madera.

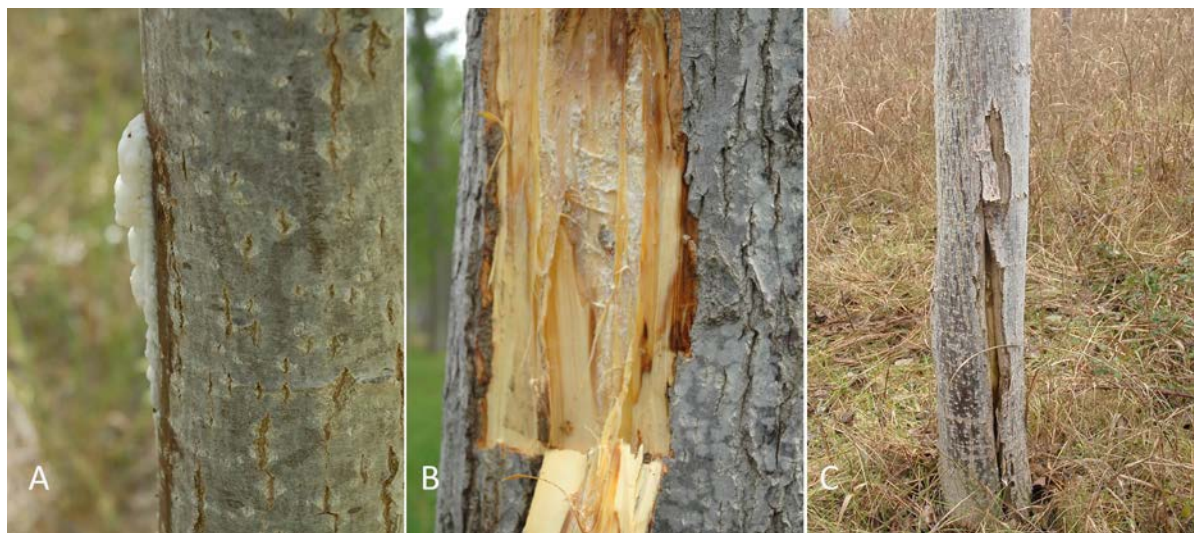


Figura 1. Síntomas de *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* en chopo (*Populus x euramericana*, clon 'I-214') observados en choperas de Aragón. (A) Exudados acuosos oscuros y exudados espumosos de color blanco. (B) Masa cremosa bajo la corteza. (C) Chancros longitudinales en la corteza del tronco (Fotos: Nieves Ibarra y Miguel A. Cambra).

Los síntomas observados son característicos de una enfermedad causada por la bacteria *Lonsdalea quercina* (ex. *Brenneria quercina*) subsp. *populi*, que solo había sido descrita hasta el momento en Hungría (TÓTH et al. 2013) y en China (LI et al. 2014). De todas las muestras analizadas se consiguió aislar bacterias y los análisis realizados permitieron determinar que el agente causal de los síntomas era *L. quercina* subsp. *populi*. Ello supone la primera cita de esta bacteria en España (BERRUETE et al. 2016).

La incidencia de la enfermedad en algunas de las parcelas afectadas se situaba en torno al 30% de los chopos. Serán necesarias nuevas prospecciones para conocer la distribución de esta bacteriosis en las choperas de Aragón.

2. Objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo fue la identificación del agente causal de los síntomas observados en choperas de la Comunidad Autónoma de Aragón.

Además, se abordó el estudio de la evolución de la enfermedad en nuestras condiciones agroambientales mediante el seguimiento de dos choperas afectadas en Aragón a lo largo de un año.

3. Metodología

Se obtuvieron aislados bacterianos de 24 chopos sintomáticos en Aragón (Alcolea de Cinca, Monzón y Zaidín, Huesca) y se estudió una selección representativa de nueve de ellos (Tabla 1). La caracterización de los aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas, moleculares y ensayos de patogenicidad, incluyendo para su comparación tanto la cepa tipo de *L. quercina* subsp. *populi* DSM25466T (TÓTH et al. 2013) como cepas de otras subespecies de *Lonsdalea quercina* y de distintas especies del género *Brenneria* filogenéticamente próximas.

Caracterización de aislados bacterianos. Muestras de los exudados blancos espumosos se resuspendieron en agua destilada estéril y se sembraron en el medio general B de King (KING et al. 1954). Tras 4 días de incubación a 25 °C, se seleccionaron colonias aisladas y se purificaron para su posterior identificación.

Caracterización bioquímica. Se realizaron pruebas bioquímicas convencionales para una identificación preliminar del género bacteriano: reacción de Gram, actividad enzimática de la citocromo-oxidasa, metabolismo de la glucosa por vía oxidativa y/o fermentativa, producción de levano e hidrólisis de esculina y ureasa. Además, se hicieron pruebas adicionales utilizando el sistema API 20E (bioMérieux), realizando las lecturas a las 24 y 48 h de incubación a 25 °C.

Reacción de hipersensibilidad en tabaco. Se infiltraron suspensiones de cultivos bacterianos (10^9 ufc/ml) en el mesófilo de hojas de tabaco (KLEMENT et al. 1964) y se observó la reacción tras 24-48 h.

Identificación molecular. Se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando dos parejas de iniciadores específicos de las subespecies de *Lonsdalea quercina*, diseñados en los operones flagelares de clase II (LqfF/LqfR) y en la subunidad β de la ADN girasa (LqgF/LqgR), respectivamente (SHANG et al. 2015). Se utilizó un tercer protocolo de PCR que amplifica de manera específica *L. quercina* subsp. *populi* mediante iniciadores basados en la secuencia del factor de iniciación IF2 (infBF/infBR) (patente CN103555850 A, 2014). En todos los protocolos se utilizó tanto PCR convencional como su adaptación a PCR en tiempo real con el fluoróforo SYBR Green I.

Además se realizó la secuenciación parcial del ADNr 16S (MARTINEZ-MURCIA et al. 1992) y las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con las de aquellas de especies o subespecies de los géneros *Lonsdalea* y *Brenneria*, y de otras especies filogenéticamente próximas, disponibles en la base de datos del GenBank. Finalmente, se construyó un dendrograma usando el programa MEGA versión 6.06 (TAMURA et al. 2013) siguiendo el método *Maximum likelihood* y el modelo de Tamura-Nei para determinar la similitud entre pares de secuencias.

Verificación del poder patógeno. Las inoculaciones se realizaron en fragmentos de tronco de 30 cm de longitud de chopos híbridos (*P. x euramericana* clon 'I-214') de seis meses de edad (LI et al. 2014). Se realizaron lesiones en la corteza en forma de cruz de unos 5 mm de largo y se depositaron 100 μ l de las suspensiones bacterianas (10^7 ufc/ml) en agua destilada estéril. Los fragmentos inoculados se cubrieron con plástico para mantener una elevada humedad relativa y se incubaron a 28 °C en oscuridad. Los testigos negativos se inocularon con agua destilada estéril. Se observaron los síntomas hasta 15 días tras la inoculación y se realizaron aislamientos de las lesiones para confirmar la presencia de *L. quercina* subsp. *populi*. Para cada aislado bacteriano, se utilizaron tres fragmentos de tronco de chopos que fueron inoculados en dos puntos, realizando así un total de seis réplicas.

1 Tabla 1. Resultados obtenidos para las cepas españolas de chopo y comparación con cepas de subespecies de *Lonsdalea quercina* y especies del género *Brenneria*.
2

Cepa ^a	Huésped	Origen y año aislamiento	Amplificación mediante PCR			Patogénesis en chopo
			LqfF/LqfR	LqgF/LqgR	infBF/infBR	
<i>L. quercina</i> subsp. <i>populi</i> CITA Bq-7, CITA Bq-8, CITA Bq-19	<i>P. x euramericana</i> 'MC'	Alcolea de Cinca (Huesca) (2015)	+	+	+	+
<i>L. quercina</i> subsp. <i>populi</i> CITA Bq-21, CITA Bq-22, CITA Bq-23, CITA 432/14-1	<i>P. x euramericana</i> 'I-214'	Monzón (Huesca) (2014, 2015)	+	+	+	+
<i>L. quercina</i> subsp. <i>populi</i> CITA Bq-24, CITA 459.5	<i>P. x euramericana</i> 'I-214'	Zaidín (Huesca) (2015)	+	+	+	+
<i>L. quercina</i> subsp. <i>populi</i> DSM25466 [†]	<i>P. x euramericana</i>	Hungría	+	+	+	+
<i>Lonsdalea quercina</i> CITA Bq-3	Encina (<i>Quercus ilex</i> L.)	Zaragoza (2004)	+	+	-	-
<i>Brenneria nigrifluens</i> IVIA-748-1	Nogal (<i>Juglans regia</i> L.)	Tarragona (1986)	-	-	-	-
<i>Brenneria salicis</i> CFBP 802 [†]	Sauce (<i>Salix alba</i> L.)	Reino Unido (1983)	-	-	-	-

3

4 ^aCITA: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (Zaragoza, Aragón); DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Alemania);

5 IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada, Valencia); CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (Angers, Francia)

6 [†]Cepa tipo de la especie.

7

8 **Evolución de la enfermedad en dos choperas afectadas en Aragón.** Se seleccionaron dos
9 choperas situadas en las localidades de Alcolea de Cinca y Zaidín (Huesca) y se realizaron
10 observaciones mensuales de los síntomas en 25 árboles durante un año (septiembre 2015-
11 septiembre 2016).

12
13

14 4. Resultados

15

16 **Caracterización bioquímica de aislados bacterianos.** A partir de todas las muestras
17 analizadas se obtuvieron de forma consistente cultivos bacterianos prácticamente puros. Las
18 colonias, cuya morfología coincidía con las descritas para *L. quercina* subsp. *populi*, eran de color
19 blanco-marfil, brillantes, circulares, ligeramente convexas y no fluorescentes bajo luz UV. Al igual
20 que la cepa tipo de *L. quercina* subsp. *populi* DSM25466^T, los nueve aislados estudiados eran
21 Gram negativos, oxidasa negativos, anaerobios facultativos, levano positivos y producían
22 hidrólisis de esculina pero no ureasa. Asimismo, los resultados de API 20E fueron coincidentes
23 con los obtenidos para la cepa tipo DSM25466^T (datos no mostrados).

24

25 **Reacción de hipersensibilidad en tabaco.** Ni los aislados españoles de chopo ni la cepa tipo
26 de *L. quercina* subsp. *populi* produjeron reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco a las
27 24-48 horas.

28

29 **Identificación molecular.** Mediante la amplificación por PCR convencional o en tiempo real
30 con los iniciadores LqfF/LqfR y LqgF/LqgR, se obtuvieron fragmentos de ADN del tamaño
31 esperado (382 pb y 286 pb, respectivamente) para las nueve cepas estudiadas, así como para la
32 cepa tipo *L. quercina* subsp. *populi* y las de otras subespecies de *Lonsdalea quercina* de *Quercus*
33 *ilex* mientras que no hubo amplificación para las cepas de *Brenneria* spp. de distintos huéspedes
34 (Tabla 1). Cuando se utilizaron los iniciadores infBF/infBR, únicamente se obtuvo amplificación
35 del fragmento esperado (341 pb) tanto para las cepas de chopo españolas como para la cepa
36 tipo de *L. quercina* subsp. *populi* (Tabla 1).

37

38 Por otra parte, la secuenciación parcial del ADNr 16S reveló que las nueve cepas
39 españolas tenían una identidad de secuencia del 99,8%-100% con la secuencia de la cepa tipo *L.*
40 *quercina* subsp. *populi*. Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank con los números
41 de acceso KU531470 - KU531480. Los análisis filogenéticos indicaron que las secuencias de
42 ADNr 16S de las cepas de Aragón se agrupaban con las secuencias de *L. quercina* subsp. *populi*
43 y quedaban claramente separadas de las de otras subespecies de *Lonsdalea quercina* y de las
44 especies del género *Brenneria* (Figura 2).

45

46

47

48

49

50

51

52

53

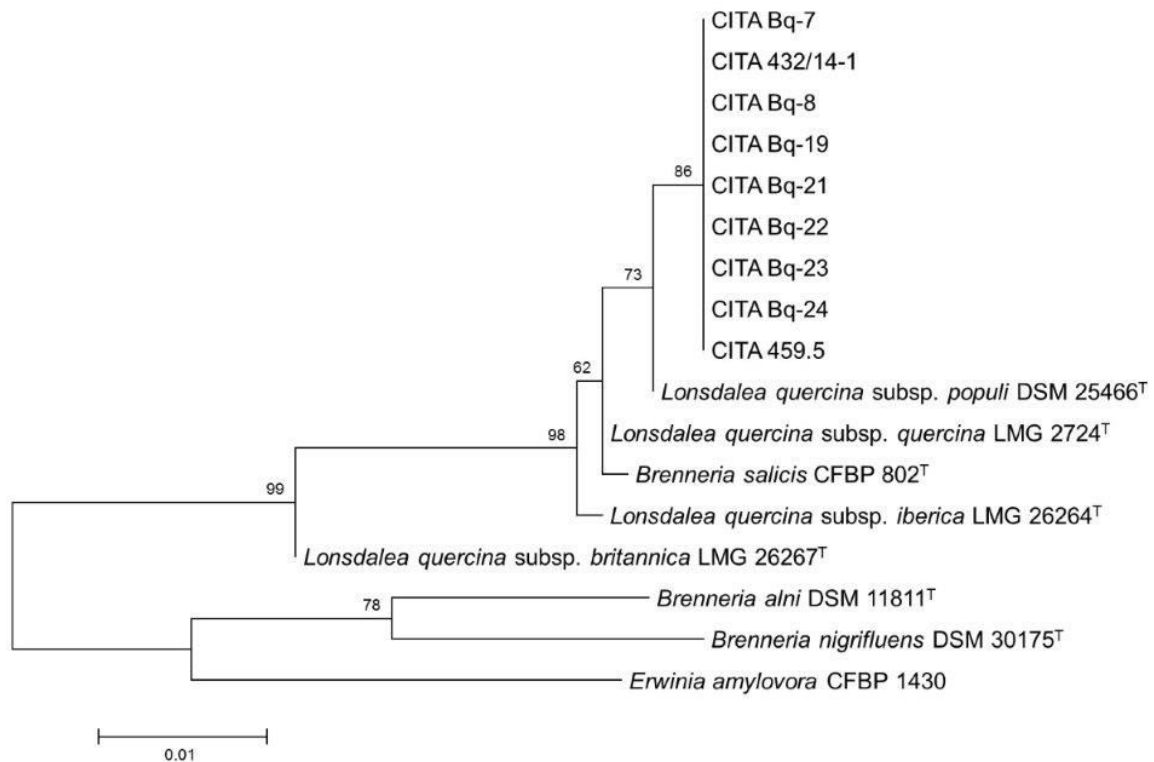
54

55

56

57

58



59
60

61 *Figura 2. Dendrograma donde se muestra la posición de los aislados españoles de chopo en relación a otros aislados*
 62 *de los géneros Lonsdalea y Brenneria. El árbol se construyó analizando secuencias parciales del ADNr 16S mediante*
 63 *Maximum likelihood utilizando el modelo de Tamura-Nei con el programa MEGA 6.06 (TAMURA et al 2013). Los*
 64 *valores de Bootstrap están basados en 1.000 réplicas y se presentan por encima y debajo de las ramas.*
 65

66 **Verificación del poder patógeno.** Todas las cepas españolas estudiadas fueron patógenas
 67 en chopo. A los 4 días tras la inoculación, se observaron exudados acuosos y espumosos blancos
 68 en los puntos de inoculación, reproduciendo exactamente los síntomas observados en las
 69 infecciones naturales en campo. A los 15 días, se apreció una necrosis del tejido de la corteza,
 70 que se extendía en torno al punto de inoculación en las seis réplicas realizadas para cada cepa.
 71 Por el contrario, no se observaron síntomas en los chopos inoculados con otras subespecies de
 72 *Lonsdalea quercina*, *Brenneria* spp. ni en los testigos negativos (Tabla 1). De todas las muestras
 73 con síntomas se aislaron colonias con la morfología característica de *L. quercina* subsp. *populi* y
 74 su identificación se verificó mediante PCR.
 75

76 **Evolución de la enfermedad en dos parcelas afectadas en Aragón a lo largo de un año**
 77 **(2015-2016).** Los exudados solo fueron visibles en el periodo junio-septiembre, desapareciendo
 78 durante el invierno para reaparecer durante el siguiente verano. Se observó un aumento del
 79 tamaño de los chancros y un decaimiento progresivo de los árboles afectados, aunque no se
 80 constató la muerte de los mismos. El número de árboles afectados en estas choperas se
 81 mantuvo estable durante el año de observación.
 82

83 5. Discusión

84

85 Actualmente se dispone de métodos de diagnóstico e identificación sensibles, rápidos y
 86 específicos para *L. quercina* subsp. *populi*. Sin embargo, la biología y epidemiología de esta
 87 bacteriosis son prácticamente desconocidas debido a su reciente descripción, y se desconocen

88 aspectos como las vías de diseminación de la bacteria, o dónde sobrevive durante el invierno (LI
89 et al. 2014).

90
91 Respecto a la sensibilidad de los clones de chopo a *L. quercina* subsp. *populi*, la
92 información es muy escasa. Los datos disponibles fueron obtenidos en plantaciones en China y
93 corresponden a clones que no se cultivan en España (LI et al. 2014). Las observaciones llevadas
94 a cabo en Aragón, permiten constatar la sensibilidad de los clones *P. x euramericana* 'I-214' y
95 'MC'. Ello supone un problema potencial para nuestra populicultura, ya que estos clones son los
96 más comunes en España, siendo 'I-214' el utilizado en más del 70% de las plantaciones
97 (CONFEMADERA, 2010). Se desconoce, sin embargo, el grado de sensibilidad de otros clones
98 cultivados en nuestro país, como 'Raspalje', 'Unal', 'Triplo', 'Canadá Blanco', 'Luisa Avanzo', etc.

99
100 Quedan, por tanto, muchas incógnitas por resolver acerca de esta enfermedad: ¿cuál es el
101 posible origen de la infección?; ¿qué factores bióticos y abióticos promueven o inciden en el
102 desarrollo de las infecciones?; ¿existen medios posibles de prevención y control? Los estudios
103 sobre expresión diferencial de genes (DEGs) podrían proporcionar algunas claves para desvelar el
104 mecanismo molecular de respuesta de defensa a la infección por *L. quercina* subsp. *populi* y, en
105 un futuro, contribuir a la búsqueda de resistencia en programas de mejora genética (HOU et al.,
106 2016).

107
108 En el seguimiento realizado en choperas afectadas en Aragón, se ha observado un
109 debilitamiento progresivo de los árboles infectados, aunque hasta la fecha no se ha constatado
110 la muerte de estos. Dada la reciente detección de *L. quercina* subsp. *populi* en España
111 (BERRUETE et al. 2016), serán necesarias más prospecciones para conocer su incidencia y
112 distribución. Actualmente resulta difícil predecir los daños potenciales que puede causar esta
113 enfermedad en nuestras condiciones agroambientales.

114
115

116 6. Conclusiones

117
118 Los estudios realizados en este trabajo permitieron identificar la bacteria *L. quercina*
119 subsp. *populi* como el agente causal de chancros en la corteza del chopo observados en Aragón.
120 Ello supone la primera cita de esta bacteria en España.

121
122 Hasta la fecha se tiene constancia de esta bacteria en algunas localidades de Aragón, pero
123 no se puede descartar su presencia en otras áreas. Será necesario realizar nuevas
124 prospecciones para conocer su distribución real en nuestro país y evaluar los daños potenciales
125 para nuestra populicultura.

126
127

128 7. Agradecimientos

129
130 Los autores agradecen a Adán Quintín, José Luis Hernández e Ignacio Lázaro (Unidad de
131 Salud de los Bosques del Servicio de Planificación y Gestión Forestal. Gobierno de Aragón), así
132 como a Técnicos y APNs del Servicio Provincial de Desarrollo Rural y Sostenibilidad de la
133 provincia de Huesca, por su valiosa colaboración en la localización y seguimiento de choperas
134 afectadas en Aragón.

135
136

136 8. Bibliografía

137
138 BERRUETE, I. M.; CAMBRA, M. A.; COLLADOS, R.; MONTERDE, A.; CUBERO, J.; LÓPEZ, M. M.;
139 PALACIO-BIELSA, A.; 2016. First report of bark canker disease of poplar caused by *Lonsdalea*
140 *quercina* subsp. *populi* in Spain. *Plant Dis.* 100: 2159.

- 141 CONFEMADERA (Comisión Española de Empresarios de la Madera). 2010. El cultivo y utilización
142 del chopo en España.
- 143 HOU, J.; WU, Q.; ZUO, T.; GUO, L.; CHANG, J.; CHEN, J.; WANG, Y.; HE, W.; 2016. Genome-wide
144 transcriptomic profiles reveal multiple regulatory responses of poplar to *Lonsdalea quercina*
145 infection. *Trees-Struct. Funct.* 30: 1389-1402.
- 146 KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E.; 1954. Two simple media for the demonstration of
147 pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- 148 KLEMENT, Z.; FARKAS, G. L.; LOVREKOVICH, L.; 1964. Hypersensitive reaction induced by
149 phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
- 150 LI, Y.; HE, W.; REN, F.; GUO, L.; CHANG, J.; CLEENWERCK, I.; MA, Y.; WANG, H.; 2014. A canker
151 disease of *Populus × euramericana* in China caused by *Lonsdalea quercina* subsp. *populi*.
152 *Plant Dis.* 98: 368-378.
- 153 MARTINEZ-MURCIA, J. A.; BENLLOCH, S.; COLLINS, M. D.; 1992. Phylogenetic interrelationships of
154 members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16s ribosomal DNA
155 sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst.*
156 *Bacteriol.* 42: 412-421.
- 157 SHANG, J.; LIU, B. L.; HE, W.; 2015. A new method to detect *Lonsdalea quercina* in infected plant
158 tissues by real-time PCR. *Forest Pathol.* 45: 28-35.
- 159 TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S.; 2013. MEGA6: Molecular
160 Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- 161 TÓTH, T.; LAKATOS, T.; KOLTAY, A.; 2013. *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* subsp. nov., isolated
162 from bark canker of poplar trees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 2309-2313.