

CAPÍTULO 2

Erwinia amylovora*: CARACTERÍSTICAS GENERALES. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD E IDENTIFICACIÓN DE *E. amylovora

MARÍA MILAGROS LÓPEZ¹, MÓNICA ORDAX¹, JAVIER PEÑALVER¹, MONTSERRAT ROSELLÓ²,
MARÍA TERESA GORRIS¹, MARIANO CAMBRA¹, ESTER MARCO-NOALES¹, ELENA G. BIOSCA³,
ANA PALACIO-BIELSA⁴, PABLO LLOP¹

2.1. CARACTERÍSTICAS DE *Erwinia amylovora*

2.1.1. BREVE DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

El género *Erwinia*, que debe su nombre a la memoria del fitopatólogo Erwin F. Smith, se creó inicialmente para agrupar a las enterobacterias asociadas a las plantas, Gram negativas, bacilares, no formadoras de esporas y móviles (Winslow *et al.*, 1920). Por ello, los miembros de este género incluían además enterobacterias saprofitas ecológicamente asociadas a plantas, así como patógenos oportunistas del hombre y los animales (Brenner, 1984). Esta heterogeneidad de especies fue la causa de que el género *Erwinia* fuera objeto de varias reclasificaciones. Finalmente, gracias al avance de las técnicas moleculares, las especies del género *Erwinia* se clasificaron en cuatro grupos filogenéticos basados en la comparación de secuencias del ADN ribosómico 16S (Hauben *et al.*, 1998). **El grupo I (género *Erwinia*)** representa a las verdaderas erwinias e incluye diversas especies, que producen necrosis o marchitamientos en plantas, o que pueden ser epifitas. ***Erwinia amylovora* es la especie tipo** de este género. **El grupo II (actuales géneros *Pectobacterium* y *Dickeya*)** agrupa especies que originan podredumbres blandas en un amplio rango de hospedadores debido a su gran actividad pectolítica. **El grupo III (actual género *Brenneria* y la especie *Dickeya paradisiaca*)** incluye varias especies que afectan a plantas leñosas produciendo generalmente chancros y exudados. **El grupo IV (género *Pantoea*)** contiene especies que son saprofitas o patógenos más o menos frecuentemente oportunistas de plantas, animales y del hombre. Entre ellas destaca la antigua *Erwinia herbicola*, actualmente denominada *Pantoea agglomerans*, frecuentemente asociada en rosáceas a *E. amylovora*.

2.1.2. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

E. amylovora fue la primera bacteria que se demostró que era el agente causal de una enfermedad en plantas (Burrill, 1883) y la primera bacteria fitopatógena en la que se demostró la

¹ Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia.

² Área de Producción Agroalimentaria. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación, Silla, Valencia.

³ Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Biología, Universidad de Valencia, Burjasot, Valencia.

⁴ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA-Gobierno de Aragón), Zaragoza.

diseminación mediante insectos. Se trata de un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, de flagelación peritrica y con exopolisacáridos formando cápsula (Paulin, 2000).

Características bioquímicas. *E. amylovora* presenta gran homogeneidad fenotípica, mostrando todas las cepas algunas características básicas, tanto culturales como fisiológicas, que permiten diferenciarla de otras erwinias (Holt *et al.*, 1994; Paulin, 2000): crecimiento anaeróbico débil; formación de colonias levaniformes en agar nutritivo con sacarosa; ausencia de crecimiento a 36 °C; producción de sustancias reductoras de sacarosa; requerimiento de ácido nicotínico en medio mínimo (única auxotrofia); producción de ácido a partir de compuestos orgánicos (ribosa, trealosa, glucosa y sacarosa); utilización de citrato, formato y lactato como fuentes de carbono y energía, pero no de tartrato, galacturonato ni malonato. Sin embargo, recientemente se han descrito otras erwinias fitopatógenas que presentan gran similitud en las características bioquímicas con *E. amylovora*, como *E. pyrifoliae* (Kim *et al.*, 1999), o la nueva especie propuesta como *E. piriflorinigrans* aislada de peral en España (Roselló *et al.*, 2002, 2006, 2008).

Morfología celular y colonial. Las células de *E. amylovora* son bacilos con un tamaño de aproximadamente $0,3 \times 1-3 \mu\text{m}$, rodeadas de una cápsula visible al microscopio óptico. Al igual que en todos los microorganismos, la morfología de las colonias de *E. amylovora* depende tanto de la composición química del medio como de las condiciones de crecimiento, como se detalla más adelante en el apartado correspondiente a diagnóstico e identificación.

Movilidad. *E. amylovora* es móvil por medio de dos a siete flagelos peritricos. La movilidad en esta bacteria se ha asociado con una quimiotaxis específica, que depende de las condiciones de temperatura y de pH (con valores óptimos de 20 °C y pH 6,8) (Raymundo y Ries, 1980a, b). En la síntesis de los flagelos están implicados genes de la patogenicidad de *E. amylovora* (Cesbron *et al.*, 2004). Se han observado células móviles en la superficie de la planta después de su liberación desde el estigma de la flor (Thomson, 1986).

Envolturas celulares. *E. amylovora* presenta una cápsula de exopolisacáridos implicada en su patogenicidad (Bennet y Billing, 1978), que está compuesta de galactosa, glucosa, manosa y ácido urónico. La fracción lipídica de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de *E. amylovora* es la que comúnmente se ha descrito para las enterobacterias. Sin embargo, su fracción de carbohidratos contiene algún componente inusual dentro de esta familia, observándose incluso pequeñas diferencias entre las cepas patógenas y las que no lo son (Ray *et al.*, 1986).

Propiedades serológicas. Se ha demostrado que *E. amylovora* posee varios **determinantes antigénicos** (Slade y Tiffin, 1984): entre ellos se ha señalado el **LPS**, con y sin cadena lateral; el antígeno termoestable **GAI**, polisacárido común en todos los miembros del grupo “amylovora”; el antígeno **TV**, probablemente perteneciente a los exopolisacáridos capsulares y presente sólo en cepas patógenas y el antígeno **GAJ**, detectado en el material mucoso extracelular en cultivos puros.

Es importante señalar que no se ha encontrado relación entre las características serológicas y la patogenicidad, y que en estudios posteriores con anticuerpos monoclonales se ha demostrado la **elevada homogeneidad serológica** de *E. amylovora* (Gorris *et al.*, 1996 a, b).

2.1.3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

Factores de virulencia. A diferencia de otras bacterias fitopatógenas, *E. amylovora* no secreta enzimas pectolíticos que degraden los polisacáridos de la pared celular de los tejidos vegetales ni tampoco metabolitos fitotóxicos (Seemüller y Beer, 1976).

E. amylovora es la única bacteria capaz de inducir el fuego bacteriano en algunas rosáceas, pero aún se desconoce por qué sólo este patógeno es capaz de causar dicha enfermedad y por qué **afecta únicamente a ciertas especies de la familia Rosaceae**. Sin embargo, los numerosos estudios realizados sobre la patogenicidad de *E. amylovora* han permitido identificar cuatro factores esenciales para su patogénesis: 1) **los genes *hrp*** (del inglés, “hypersensitive response and pathogenicity”), se agrupan en una región cromosómica de 40 kb que constituye una isla de patogenicidad. Estos genes codifican tres tipos de proteínas: reguladoras, secretoras y secretadas. Las proteínas secretoras son componentes de un sistema de secreción tipo III, que libera proteínas al exterior de la célula bacteriana y las inyecta en las células vegetales. Entre ellas destacan las proteínas denominadas **harpinas**, que aplicadas a distintas plantas pueden inducir resistencia sistémica frente a patógenos y que intervienen en el desarrollo de la reacción de hipersensibilidad en plantas no hospedadoras y/o en la patogénesis en las que sí lo son (Kim y Beer, 2000); 2) **los genes *dsp*** (“disease specific”), que se requieren para el desarrollo de los síntomas, pero no para la reacción de hipersensibilidad (HR) (Bogdanove *et al.*, 2000); 3) **los polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos**, que forman la cápsula alrededor de la célula bacteriana, protegiéndola así de las reacciones defensivas de la planta. Juegan un papel crucial en la patogenicidad y entre ellos destacan el amilovorano y el levano (Geider, 2000); 4) **los sideróforos (desferrioxiaminas)**, agentes quelantes y transportadores del hierro que permiten al patógeno superar las condiciones de baja disponibilidad de este elemento existente en los tejidos del huésped (Dellasi *et al.*, 1998). Por otra parte, también actúan como agentes protectores frente al efecto tóxico de ciertos compuestos químicos producidos por la planta, como la reacción de defensa durante las fases iniciales de la infección (Expert *et al.*, 2000).

Susceptibilidad a antibióticos. Existen estudios muy completos acerca de la susceptibilidad o resistencia de cepas de *E. amylovora* a diferentes antibióticos (Loper *et al.*, 1991; McManus y Jones, 1994; Jones *et al.*, 1996; Jones y Schnabel, 1998; Vanneste y Voyle, 1998), pero en general las cepas son sensibles a los antibióticos más utilizados. Sin embargo, se ha descrito la aparición de cepas resistentes a algunos antibióticos como la estreptomina que, debido a la presión de selección del antibiótico, aparecen en zonas en las que se realizan frecuentes tratamientos, tanto por mutaciones cromosómicas como por la adquisición de plásmidos que codifican la síntesis de enzimas capaces de inactivarlos (Jones y Schnabel, 2000).

Características genéticas. La heterogeneidad de la especie *E. amylovora* se ha puesto sólo recientemente de manifiesto, mediante la aplicación de técnicas moleculares a colecciones de cepas. Esta diversidad, aunque no es elevada, se ha observado preferentemente mediante macrorestricción seguida de PFGE, AFLP, PCR-ribotipado, rep-PCR, SSR, o RAPD (Donat, 2004), entre otras técnicas. Aunque generalmente los resultados no son coincidentes entre ellas, vistos en su conjunto demuestran que las cepas presentan características moleculares que permiten distinguir varios grupos, al menos entre las cepas europeas (Jock *et al.*, 2002; Donat *et al.*, 2007).

Además, se han encontrado **distintos plásmidos** entre las cepas de *E. amylovora*. Entre ellos el más frecuente, pero no universal, es el **pEA29** de 29 kb, que parece jugar un papel cuantitativo en la patogenicidad, al menos en algunas cepas (Llop *et al.*, 2006). Se han descrito otros plásmidos crípticos de tamaños entre 3 y 60 kb en varias cepas y recientemente el **pEI70** de 70 kb, que está muy extendido en las cepas europeas (Llop *et al.*, 2008).

La aplicación de varias técnicas moleculares al estudio de una selección de aislados españoles de *E. amylovora* permitió demostrar la introducción de múltiples fuentes de inóculo en distintas zonas y la importación de material contaminado procedente de viveros europeos (Donat *et al.*, 2007; Llop *et al.*, 2008).

Actualmente se ha secuenciado ya el genoma completo de la cepa americana Ea273 (3,8 Mb), en el marco de un proyecto coordinado por la Universidad de Cornell (EE.UU.), lo

que debería suponer la base para un gran avance en el mejor conocimiento del agente causal de la enfermedad del fuego bacteriano en un futuro próximo (Bocsanczy *et al.*, 2007).

2.2. DIAGNÓSTICO DEL FUEGO BACTERIANO E IDENTIFICACIÓN DE *E. amylovora*

2.2.1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico del fuego bacteriano implica el reconocimiento de los síntomas característicos de la enfermedad en plantas afectadas, ya descritos en otro capítulo, y el aislamiento e identificación de *E. amylovora*. La descripción de los síntomas del fuego bacteriano muestra que los ataques de la enfermedad, aún siendo muy característicos, pueden ser confundidos con daños debidos a otras bacterias y a distintas causas bióticas y abióticas. Por ello, el diagnóstico realizado en laboratorio es imprescindible, ya que permite, tras el aislamiento y cultivo puro de la bacteria, realizar su identificación mediante características morfológicas, bioquímicas, serológicas, moleculares y de poder patógeno (López *et al.*, 1987; López y Cambra, 1996). **Se usará en este capítulo el término detección para el análisis de plantas asintomáticas porque se realiza en material vegetal sin síntomas de la enfermedad, pero que puede albergar la bacteria en sus tejidos como epífita (en la superficie de la planta), o como endofita (en el interior de la misma), o tener infecciones latentes.**

El diagnóstico de la enfermedad o la detección de *E. amylovora* deberán basarse, para la máxima fiabilidad, en un método integrado (López *et al.*, 2003; Álvarez, 2004) que incluya tanto el aislamiento como técnicas serológicas y moleculares. Sin embargo, para detecciones rutinarias se puede seleccionar sólo una técnica serológica y amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que, en caso de ser positivas, deberán complementarse con pruebas de patogenicidad. Además, es necesario tener también en cuenta que ningún método aislado es suficiente para la identificación fiable de *E. amylovora*, siendo recomendable en una primera detección realizar tinciones y pruebas bioquímicas, serológicas, moleculares y especialmente de poder patógeno. La necesidad de realizar todas estas pruebas es evidente en el caso de bacterias como *E. amylovora*, cuya presencia en un país como España, o en una cierta zona, supone una gravísima amenaza para los cultivos frutales de la misma y puede incluso perjudicar al comercio internacional del país.

El éxito del diagnóstico del fuego bacteriano dependerá, en muchos casos, de que la muestra enviada a analizar se haya tomado adecuadamente y el envío se haya realizado con rapidez, para que llegue en buen estado al laboratorio de análisis. Durante la primavera y el verano, *E. amylovora* suele ser aislada sin dificultad a partir de flores con síntomas, de brotes enfermos y de chancros activos, obteniéndose muchas veces un cultivo puro de la bacteria. Sin embargo, si las plantas han sido tratadas con cobre o con bactericidas y/o si las condiciones climáticas o de cultivo no son favorables para la multiplicación de dicha bacteria patógena, sus poblaciones serán muy bajas y podrían estar en el límite de sensibilidad de la mayoría de las técnicas, pudiendo dar lugar a falsos negativos, incluso en material sintomático.

***E. amylovora* está considerada como un patógeno de cuarentena por la legislación de la Unión Europea (UE) y por la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)**, por lo que se han legislado medidas fitosanitarias para evitar la propagación de la enfermedad (Anónimo 2000, 2003), entre las que se incluye no sólo el análisis de plantas con síntomas, sino también de material vegetal asintomático. Por todo ello, resulta imprescindible disponer de técnicas rápidas, sensibles, específicas y fiables que permitan confirmar la presencia de *E. amylovora* en cualquier tipo de material vegetal (López *et al.*, 2003; 2006 a, b). Sin

embargo, la distribución de la bacteria en la planta no es homogénea, por lo que los análisis, principalmente en el caso de plantas sin síntomas, podrían dar lugar a falsos resultados negativos.

2.2.2. DIAGNÓSTICO DEL FUEGO BACTERIANO: PLANTAS CON SÍNTOMAS

Las técnicas de diagnóstico del fuego bacteriano en plantas con síntomas se basaban tradicionalmente en el aislamiento de la bacteria y su posterior identificación. Actualmente, la obtención de un cultivo puro de la bacteria y las pruebas de patogenicidad siguen siendo básicas en el diagnóstico y son las únicas utilizadas todavía en muchos laboratorios, por ser de sencilla realización. Sin embargo, hay que señalar que pueden dar lugar a falsos resultados positivos o negativos si no se dispone de experiencia, no se selecciona la zona adecuada de la planta para el análisis, no se usan los medios y reactivos más apropiados, etc. Por ello, actualmente se utilizan más como pruebas rápidas las técnicas serológicas y moleculares, con o sin enriquecimiento previo de *E. amylovora* en medios de cultivo líquidos apropiados.

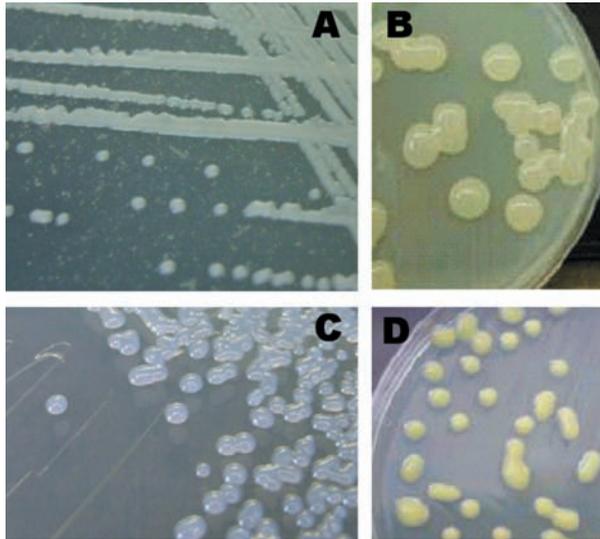
2.2.2.1. Aislamiento

Los métodos de aislamiento y la obtención de cultivos puros de *E. amylovora*, aunque requieren varios días, permiten la posterior identificación y verificación del poder patógeno, por lo que deben ser aplicados cuando las muestras requieran la confirmación de la patogenicidad de la bacteria. Además, de acuerdo con la norma PM7/20 publicada por EPPO (2004) y única recomendación actual en cuanto a protocolos de diagnóstico de *E. amylovora*, el aislamiento es la prueba definitiva, con la patogenicidad, que confirma la presencia del patógeno. Según esta norma, para el aislamiento directo de este patógeno en las muestras vegetales con síntomas (flores, brotes, yemas, hojas, frutos, tejido subcortical procedente de chancros, etc.) se deben tomar porciones de la zona límite entre la zona sana y la enferma, o de tejido con síntomas muy recientes y se deben macerar preferentemente en un tampón antioxidante (Gorris *et al.*, 1996 b), aunque también se puede usar tampón fosfato salino o agua destilada estéril.

Los medios de cultivo recomendados (tanto en forma líquida para los enriquecimientos, como sólida para los aislamientos), son los **medios no selectivos B de King (KB)** (King *et al.*, 1954), **SNA** (Billing *et al.*, 1961), y el **semiselectivo CCT** (Ishimaru y Klos, 1984). Se aconseja el uso de los tres medios sólidos a la vez, para mayor fiabilidad, ya que, dependiendo de los casos, la bacteria puede crecer con mayor abundancia en uno u otro. En medio B de King, el crecimiento de *E. amylovora* es rápido y sus colonias son blancas, circulares, mucosas y con un diámetro de 2-5 mm a las 24-48 h (Paulin y Samson, 1973) (Foto 2.1A). Este medio permite diferenciar las colonias de *E. amylovora* de las de *Pseudomonas syringae*, ya que estas últimas producen un pigmento fluorescente visible bajo luz ultravioleta. En el medio SNA con un 5% de sacarosa (Lelliot, 1967; Hildebrand *et al.*, 1988), *E. amylovora* muestra unas colonias blancas, circulares y mucosas, típicamente abombadas y de 3-7 mm de diámetro en 48 h (Foto 2.1B) (Billing *et al.*, 1961). El aspecto abombado se debe a la producción de levano a partir de la sacarosa presente en el medio. El medio semiselectivo CCT contiene como fuentes de carbono sacarosa y sorbitol, y como ingredientes para favorecer la selectividad tergitol aniónico, nitrato de talio, cicloheximida y cristal violeta (Ishimaru y Klos, 1984). En consecuencia, el crecimiento de *E. amylovora* es algo más lento (48-72 h), pero la morfología que muestran sus colonias es muy característica: circulares, abombadas y mucosas, de

2-6 mm de diámetro, color violáceo pálido, superficie lisa y borde brillante (Foto 2.1C) y aspecto característico si se observan con lupa. El medio CCT tiene un buen nivel de selectividad, si bien otras bacterias comunes asociadas a las plantas, como *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas* spp., también pueden crecer en él, pero su crecimiento se ve ligeramente inhibido y muestran una morfología colonial diferente (Ishimaru y Klos, 1984).

Foto 2.1. Morfología de las colonias de *E. amylovora* en diferentes medios de cultivo. A) Medio King B; B) Medio SNA; C) Medio CCT; D) Medio MM₂Cu.



(Fotografías: A y C, M. Ordax; B y D, V. Donat)

Existen otros medios semiselectivos que, aunque no recomendados en el protocolo de la EPPO (2004), son usados por algunos autores. Uno de ellos es el medio **MS** (Miller y Schroth, 1972), en el que las colonias de *E. amylovora* son rojo-anaranjadas, debido a la fermentación del sorbitol en presencia del indicador de pH azul de bromotimol, mientras que las de *Pseudomonas* sp. son azules (Jones y Geider, 2001). Sin embargo, la morfología de *P. agglomerans* es muy similar en el mismo (Jones y Geider, 2001). Además, el medio MS es caro, laborioso en cuanto a su preparación y de corta duración en almacenamiento. Otro medio semiselectivo es el **MM₂Cu** (Bereswill *et al.*, 1998), en el que *E. amylovora* crece formando colonias muy mucosas y de un color amarillo característico (Foto 2.1D) debido a la presencia de cobre, lo que permite su diferenciación de otras bacterias. Aunque lleva asparagina para compensar la inhibición de crecimiento por el metal, las colonias no muestran claramente el aspecto típico de *E. amylovora* hasta pasados tres o más días.

Recientemente se ha desarrollado en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) un medio con cobre denominado RESC (Ordax, 2008), que facilita la recuperación de *E. amylovora* cuando la bacteria está en condiciones de estrés y en el que ésta muestra una morfología característica en 48 h. Está basado en el medio no selectivo B de King (King *et al.*, 1954), al que se añade 1.5 mM de CuSO₄. El cobre, un micronutriente esencial, incrementa la producción de los exopolisacáridos de *E. amylovora* y su recuperación en medio sólido cuando la bacteria está en condiciones de estrés (Ordax, 2008).

Recientemente se ha demostrado que **las células de *E. amylovora* pueden adoptar el estado “viable no cultivable” (VNC) en presencia de cobre o por limitación de nutrientes** (Biosca *et al.*, 2006, 2008; Ordax *et al.*, 2006), lo que puede originar falsos negativos en el aislamiento en cualquier tipo de medio y especialmente en los más selectivos como el CCT (Ordax *et al.*, 2006). Una vez inducido el estado VNC por cobre, las bacterias no crecen en los medios de cultivo sólido, pero en cambio siguen siendo patógenas durante al menos cinco días. Además, se ha demostrado que este estado es reversible y que tras la adición de distintos compuestos, o de extracto de pera, las bacterias pueden volver a ser cultivables y patógenas (Ordax *et al.*, 2006). Si *E. amylovora* se encuentra en las muestras en estado VNC, los resultados del aislamiento serán negativos, pero la bacteria seguirá siendo potencialmente patógena y podría ser detectada por Enriquecimiento-ELISA y por métodos basados en la PCR.

2.2.2.2. Técnicas serológicas

El diagnóstico o la detección serológica de *E. amylovora* son muy utilizados debido a la sencillez de su realización, siendo la **técnica ELISA** (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), con sus variantes, la que se usa rutinariamente (Sobiczewski *et al.*, 1997), pero también puede emplearse la inmunofluorescencia. Cuando se utilizan anticuerpos policlonales son frecuentes las reacciones cruzadas con otras bacterias presentes en el material, pero con anticuerpos monoclonales específicos se pueden evitar estos problemas y además la técnica se puede aplicar directamente al análisis de extractos vegetales, permitiendo el procesado rápido y automatizado de un gran número de muestras. Con anticuerpos policlonales se alcanzan sensibilidades de 10^6 ufc/ml mediante ELISA-DAS (Double Antibody Sandwich ELISA) (McLaughlin *et al.*, 1989), o de 10^5 con ELISA-DASI (Double Antibody Sandwich Indirect ELISA) utilizando anticuerpos monoclonales específicos (Gorris *et al.*, 1996 a, b).

Foto 2.2. Enriquecimiento de muestras previo a la realización de la técnica ELISA u otras. Enriquecimiento en medio líquido B de King (1, 2 y 3 de izquierda a derecha) y en CCT (4, 5 y 6). Los tubos 1 y 4 son controles negativos.



(Fotografía: E. Bertolini)

El método serológico más sensible y específico para el diagnóstico o detección de *E. amylovora* se ha desarrollado en los Laboratorios de Bacteriología y de Virología e Inmunología del IVIA y se denomina Enriquecimiento ELISA-DASI. Permite la detección de $10\text{-}10^2$ ufc/ml (Gorris *et al.*, 1996 a, b) en extractos de material vegetal y, como su propio nombre indica, se basa en una fase previa de enriquecimiento en los medios de cultivo líquidos B de King o CCT (Foto 2.2), seguida de una inmunodetección por ELISA-DASI utilizando anticuerpos monoclonales específicos (Gorris *et al.*, 1996 a, b). Este sistema está comercializado en un estuche de diagnóstico completo de la empresa Plant Print Diagnostics S.L. (www.plantprint.net Valencia), tras un convenio con el IVIA.

También se ha desarrollado la técnica de **inmunoimpresión-ELISA** para el diagnóstico de *E. amylovora* (Cabra *et al.*, 1996), que consiste en la realización de una impresión de la muestra vegetal en una membrana de nitrocelulosa y su posterior análisis serológico con anticuerpos monoclonales específicos. Tiene la ventaja de que no es necesaria la preparación de extractos, ya que el material vegetal fresco se inmoviliza en membranas de nitrocelulosa, y las membranas se pueden almacenar a temperatura ambiente hasta su revelado. Sin embargo, esta técnica se recomienda sólo en casos de confirmación para el análisis rápido de plantas con síntomas.

La **inmunofluorescencia (IF)** ha sido menos utilizada que la técnica ELISA para la detección e identificación de *E. amylovora*, especialmente porque la escasez de anticuerpos comerciales de aceptable especificidad da lugar frecuentemente a falsos positivos, debidos a reacciones cruzadas. Sin embargo, algunos laboratorios la prefieren como técnica rápida para un primer análisis, ya que su sensibilidad es de alrededor de 10^3 ufc/ml, lo que la hace muy apropiada para el análisis de muestras con síntomas. Se han obtenido también anticuerpos monoclonales que están disponibles comercialmente (Plant Print Diagnostics S.L. www.plantprint.net, Valencia) y son adecuados para su uso en inmunofluorescencia.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo método de diagnóstico serológico denominado **AgriStrip** basado en el principio del “lateral-flow immunochromatography”, que por su simplicidad parece muy apropiado para el diagnóstico rutinario de material sintomático (Duffy *et al.*, 2007), aunque está basado en anticuerpos policlonales.

2.2.2.3. Técnicas moleculares

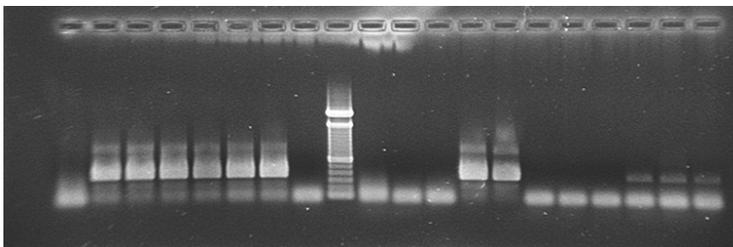
Actualmente las técnicas moleculares más utilizadas para el diagnóstico o detección de *E. amylovora* están basadas en distintas variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La aparición de la técnica de amplificación de ADN mediante PCR ha provocado una revolución en el mundo de la biología molecular en todos los ámbitos (investigación básica y aplicada), ya que permite trabajar con cantidades muy pequeñas de material de partida, permitiendo la simplificación de los protocolos. Además, cuenta entre sus mayores ventajas con la rapidez en su ejecución y obtención de resultados. Consiste en la amplificación *in vitro* de material genético (ADN) de forma específica, por lo que luego es posible analizar el resultado de esa amplificación de manera sencilla. Todas estas cualidades la han convertido en una herramienta imprescindible en cualquier protocolo de biología molecular y también en el campo del diagnóstico y la detección de bacterias fitopatógenas como *E. amylovora*.

Sin embargo, la aplicación de esta tecnología a los análisis de patógenos de plantas también presenta algunos inconvenientes, al procesar material muy heterogéneo (hojas, frutos, tallos, etc.) y que puede haber sufrido distintos tipos de tratamientos químicos, ya que **es frecuente la presencia de elementos que inhiben la reacción enzimática de la amplificación**

(Pulawska *et al.*, 1997). Por ello, se necesita realizar la **extracción del ADN de la muestra previa a su análisis**, como norma general. Así, se han desarrollado distintos protocolos para la extracción de ADN de material vegetal y en el mercado existe una variada gama de estuches comerciales con este propósito, además de protocolos de laboratorio, algunos sencillos y otros más complejos, obteniéndose en general buenos resultados con el diseñado por Llop *et al.* (1999). Por desgracia, pocos protocolos y estuches resultan eficientes para el tratamiento de todos los tipos de materiales a analizar, aunque algunos de ellos son bastante universales y versátiles. Cabe señalar el hecho de que estas técnicas pueden amplificar secuencias de ADN procedentes de células de *E. amylovora* que estén lisadas o muertas, lo que, en todo caso, aumenta la sensibilidad de esta técnica frente a las que exigen células cultivables en medio sólido para obtener resultados positivos. En la práctica, un inconveniente de la PCR es su gran sensibilidad, ya que debido a esta característica, se pueden producir contaminaciones de los amplificadores de una muestra anterior sobre los reactivos y muestras de un nuevo análisis, pudiendo producir resultados positivos en muestras que son negativas. Para evitar esto, se debe realizar la PCR en condiciones que impidan esta contaminación, porque, una vez ocurre, es costosa de erradicar y afecta a la fiabilidad de los futuros análisis. Para ello, se deben separar las zonas de trabajo (pre y post-PCR), preparar las muestras en una zona diferente a la de visualización de resultados, emplear equipamiento específico para evitar las contaminaciones (pipetas con puntas con filtro, diferentes pipetas para la carga de los amplificadores, etc.).

Los métodos más empleados para la detección de *E. amylovora*, mediante amplificación génica utilizando PCR convencional, se basan en **secuencias del plásmido pEA29** para alcanzar una mayor sensibilidad (Bereswilll *et al.*, 1992). También se desarrolló una variante de PCR denominada **nested-PCR**, que utilizaba dos pares de iniciadores, uno externo y otro interno (McManus y Jones, 1995), y que detectaba hasta 20 ufc/ml en extractos vegetales, llegando a 1 ufc/ml si se trataba de cultivos puros. Sin embargo, para evitar los frecuentes inconvenientes de contaminaciones debidas a las dos etapas de amplificación, en el Laboratorio de Bacteriología del IVIA se puso a punto otro tipo de PCR, denominado **nested-PCR en un tubo**, que consistía en realizar las dos amplificaciones en un único tubo (Foto 2.3), utilizando iniciadores con distintas temperaturas de anillado, con lo que se obtuvo una sensibilidad cercana a 1 ufc/ml en cultivo puro (Llop *et al.*, 2000).

Foto 2.3. Amplificación de muestras de *Erwinia amylovora* mediante nested-PCR en un tubo (Llop *et al.*, 2000). Muestras positivas: 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13, 17, 18 y 19, de izquierda a derecha. Control positivo: muestra 7; Contro negativo: muestra 8. Muestras negativas: 1, 9, 10, 11, 14, 15 y 16



(Fotografía: P. Llop)

Todas estas reacciones de PCR basadas en el uso de iniciadores de secuencias plasmídicas del pEA29, tienen como inconveniente que **aunque se creía que este plásmido era universal, recientemente se ha demostrado la existencia de cepas patógenas de *E. amylovora* que no lo tienen** (Llop *et al.*, 2006). Existen otros protocolos de PCR que permiten solventar este problema, ya que amplifican fragmentos cromosómicos, como el gen *amsB* implicado en la síntesis del amylovorano (Bereswill *et al.*, 1995), secuencias ribosómicas del RNA 16S (Bereswill *et al.*, 1995) y RNA 23S (Maes *et al.*, 1996) u otras (Guilford *et al.*, 1996, Taylor *et al.*, 2001). Hasta la fecha, este último protocolo es el que ha mostrado mejor especificidad entre los basados en secuencias cromosómicas, ya que los otros iniciadores citados amplifican también otras especies de *Erwinia* próximas a *E. amylovora*, como *E. piriflorinigra*s (Roselló *et al.*, 2008). Sin embargo, en estos protocolos, la sensibilidad, incluso en las mejores condiciones, suele ser de 100-1.000 ufc/ml, por lo que son menos apropiados que la nested-PCR en un tubo para la detección de la bacteria en plantas asintomáticas, o cuando sean esperables bajas poblaciones de *E. amylovora*.

Recientemente, se ha desarrollado la técnica “Real Time”, **PCR a tiempo real (rt-PCR)**, también basada en iniciadores procedentes de secuencias del plásmido pEA29 y cuya principal ventaja es su gran rapidez, observándose los resultados al mismo tiempo que ocurre la amplificación sin necesidad de manejar los amplificados, lo que elimina una de las mayores fuentes de contaminación, y se obtiene una sensibilidad inferior a 100 ufc/ml (Salm y Geider, 2004; De Bellis *et al.*, 2007). También se están desarrollando nuevos protocolos basados en rt-PCR usando secuencias cromosómicas, para evitar falsos negativos por ausencia del plásmido, y empleando sondas para incrementar la sensibilidad del análisis (Won-Sik *et al.*, 2007; Geider *et al.*, 2007). Un desarrollo muy práctico en la técnica de rt-PCR lo proporcionan los instrumentos de PCR portátiles para el análisis *in situ* de las muestras, que permiten realizar el diagnóstico directamente en la plantación afectada, en los puertos de entrada del material a analizar, o en zonas alejadas de los laboratorios de análisis. Su uso permite la toma de muestras y su análisis en mejores condiciones, sin necesidad de transportar las muestras hasta el laboratorio, y por ello facilitará la toma de decisiones en un tiempo muy inferior.

2.2.3. DETECCIÓN DE *E. amylovora*: PLANTAS ASINTOMÁTICAS

El principal problema para la detección rutinaria de *E. amylovora* en plantas asintomáticas reside en la toma de muestras, ya que existen escasos estudios científicos sobre el tema. Sin embargo, el problema se plantea frecuentemente, tanto para análisis de plantas importadas de zonas en las que está presente la bacteria, como en los de material vegetal de las zonas tampón definidas por la legislación, o de viveros de plantas huéspedes. Por ello, el protocolo publicado por la EPPO (EPPO, 2004) aconseja la utilización de varios métodos de muestreo, sin que se citen publicaciones sobre la comparación de la eficiencia de los mismos en la detección de la bacteria en material vegetal asintomático. **Las muestras pueden ser procesadas individualmente, o en grupos de hasta 100 y cuando se realicen prospecciones deben basarse en muestreos estadísticamente representativos. Pueden analizarse flores, brotes, frutos o tallos, según la época del año y el material a procesar. En prospecciones rutinarias, las muestras deberían ser tomadas en la época óptima para la multiplicación de *E. amylovora*, es decir en verano.** Se debe tomar la precaución de desinfectar las herramientas de poda al tomar las muestras, especialmente cuando van a ser procesadas mediante PCR.

En material de vivero, el protocolo EPPO aconseja para el análisis individual, tomar las muestras de los huéspedes más sensibles y cortar flores o tallos de alrededor de 20 cm de lon-

gitud, desinfectando las tijeras entre cada planta. En el caso de procesar las muestras en invierno, se aconseja tomar de 5 a 10 yemas por planta. También se pueden analizar en grupos de 100 tallos, de alrededor de 10 cm cada uno, procedentes de 100 plantas, seleccionar al azar 30 de ellos y cortarlos en 4 piezas, para seguir luego con el procesado tras agitación durante 1.5 horas.

El análisis directo de las muestras asintomáticas mediante las técnicas indicadas en el apartado de diagnóstico, es normalmente negativo para *E. amylovora* debido al bajo número de bacterias presentes en las muestras. **Por ello, se recomienda procesarlas en tampón antioxidante de extracción (Gorris *et al.*, 1996 b) y realizar su enriquecimiento en medios de cultivo líquido para conseguir la multiplicación de *E. amylovora*** y que ésta alcance niveles en los que sea posible su detección (Gorris *et al.*, 1996 b). Después de dicha etapa, las técnicas que deben utilizarse para la detección de *E. amylovora* en plantas sin síntomas son las mismas que se han indicado para su diagnóstico en plantas con síntomas (aislamiento, ELISA, PCR, etc.).

Además, la detección de *E. amylovora* también puede tener lugar en muestras de agua, suelo, insectos y materiales de distinto tipo, utilizando las mismas técnicas citadas para plantas asintomáticas, pero con las modificaciones oportunas, dependiendo del tipo de material.

2.2.4. IDENTIFICACIÓN DE *E. amylovora*

Una vez obtenidos **cultivos puros de colonias con morfología tipo *E. amylovora***, se realizan pruebas bioquímicas y fisiológicas, serológicas, moleculares y de poder patógeno para su identificación (EPPO 2004). Dada la homogeneidad bioquímica de las cepas de *E. amylovora* procedentes de distintos huéspedes y orígenes, para un correcto diagnóstico es necesario comparar los resultados obtenidos para los aislados españoles con los de cepas de referencia de colección internacional.

Las tinciones y las pruebas bioquímicas y fisiológicas aconsejadas son: tinción de Gram (-), producción de levano (+), producción de pigmento fluorescente en medio B de King bajo luz UV (-), metabolismo oxidativo/fermentativo (O+ / F+), oxidasa (-), reducción de nitratos (-), utilización de citrato (+), crecimiento a 36°C (-), licuefacción de gelatina (+), producción de ureasa (-), producción de indol (-), reducción de sacarosa (+) y producción de acetoina (+), entre otras.

La identificación bioquímica convencional se puede completar con las galerías comerciales API (bioMérieux, Francia) (Donat *et al.*, 2005; 2007) (Foto 2.4), que son sistemas miniaturizados que permiten evaluar 20 reacciones bioquímicas (API 20E), la utilización de 50 carbohidratos y derivados (API 50CH), o la producción de 19 enzimas (API-ZYM) (Foto 2.4). Otro sistema miniaturizado es el **BIOLOG** (Biolog Inc., USA), que permite examinar la utilización de 95 fuentes de carbono mediante una sola microplaca (Donat *et al.*, 2007).

El análisis del **perfil de ácidos grasos** también puede ser utilizado para la identificación, dada la homogeneidad de los perfiles de las cepas de esta especie (van der Zwet y Wells, 1993; Paulin, 2000) y la posibilidad de automatización mediante programas con amplias bases de datos de distintas especies bacterianas, como el MIS. Sin embargo, se ha comprobado que otras especies de *Erwinia* próximas a *E. amylovora* y aisladas de los mismos huéspedes pueden dar lugar a falsos resultados positivos con esta técnica.

Las **técnicas serológicas y moleculares** descritas en los métodos de diagnóstico y detección, pueden también servir para la identificación de los cultivos puros de la bacteria. Por lo tanto, la técnica **ELISA-DASI utilizando anticuerpos monoclonales** (sin necesidad de enriquecimiento previo), **la inmunofluorescencia** con antisueros o anticuerpos específicos, o la

aglutinación en lámina, pueden ser utilizadas. Esta última técnica requiere un antisuero de elevada especificidad prácticamente no diluido y sólo debe ser utilizada con cultivos puros bacterianos, pero tiene la ventaja de su simplicidad y rapidez. Asimismo, los diversos **protocolos de PCR** disponibles también pueden ser aplicados a la identificación de cultivos problema.

Foto 2.4. Sistemas miniaturizados que pueden emplearse para la identificación bioquímica de bacterias patógenas.



(Fotografía: V. Donat)

Una vez obtenidos los cultivos puros de la bacteria se pueden realizar infiltraciones en hojas de planta de tabaco para determinar su capacidad de producir la reacción de hipersensibilidad (HR). Pero la prueba definitiva, además de la HR positiva, es la de la inoculación en peras inmaduras o brotes de especies hospedadoras susceptibles, con el fin de reproducir los síntomas del fuego bacteriano y verificar el poder patógeno de los aislados.

Foto 2.5. Inoculaciones de *Erwinia amylovora* en níspero (izqda.) y pera (dcha.) inmaduros.



(Fotografía: M. Ordax)

Además de las peras inmaduras, se ha demostrado que los frutos inmaduros de plantas hospedadoras, como el níspero, o de frutales de hueso (como el melocotonero o albaricoquero), también pueden ser inoculados, provocando en ellos *E. amylovora* la aparición de necrosis con exudados, en pocos días (Donat, 2004) (Foto 2.5). En todos los casos y para obtener los mejores resultados, los frutos deben ser inoculados en el período desde que tienen un diámetro superior a 1 cm hasta que alcanzan la mitad de su diámetro definitivo, incluyendo los debidos controles negativos y positivos.

La inoculación de otros tipos de material vegetal requiere, para tener éxito, que se trate de una especie y variedad muy sensible a *E. amylovora* y que se utilicen hojas o brotes en las condiciones adecuadas, es decir muy tiernos, porque en la mayoría de los casos la resistencia a la infección se incrementa con la edad del órgano. Por ello, tanto en la inoculación de brotes cortados, como de plantas cultivadas *in vitro* o de plantas enteras, se debe tener muy en cuenta la edad del órgano a inocular. En cuanto al tipo de inoculación, se recomienda la realizada por Cabrefiga y Montesinos (2005), que consiste en realizar un corte perpendicular al nervio central de una hoja o más, por brote o planta, utilizando una tijera previamente sumergida en una suspensión de, al menos, 10^8 ufc/ml de un cultivo puro de la bacteria. Los trabajos de dichos autores demuestran la existencia de diferencias en la virulencia de distintas cepas de *E. amylovora*, por lo que también son esperables variaciones en la intensidad de los síntomas y en el período de tiempo hasta la aparición de los mismos, cuando se inoculan distintas cepas del patógeno.

2.2.5. PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO

El desarrollo y la optimización de métodos de detección de *E. amylovora* con el fin de alcanzar una mayor sensibilidad sin pérdida de fiabilidad son de gran interés, ya que pueden ser aplicados al estudio de las fuentes de inóculo en una zona, los reservorios, las vías de transmisión de la enfermedad, etc., aspectos aún poco conocidos y que continúan siendo motivo de especulación (Montesinos y López, 1998; López *et al.*, 2002; López *et al.*, 2003). Se trata de aplicar los nuevos conocimientos sobre la bacteria y su ciclo biológico para mejorar su diagnóstico y detección y por ello es un tema en continua actualidad y muy dinámico, pues los protocolos siempre pueden ser mejorados.

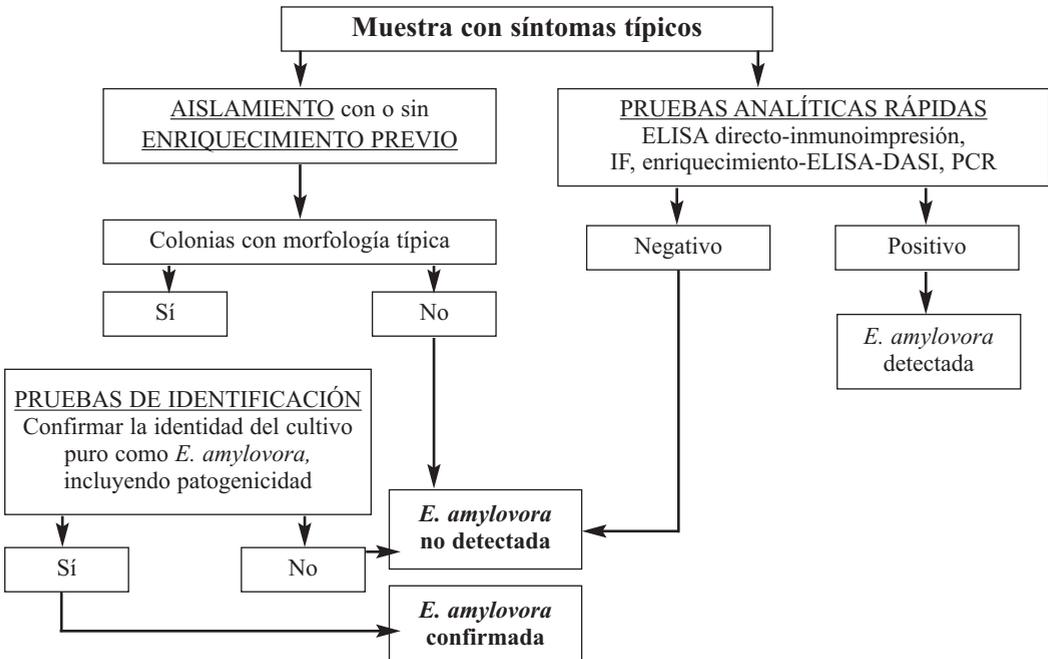
El único protocolo estandarizado para el diagnóstico de *E. amylovora* se ha desarrollado en el proyecto DIAGPRO (Diagnostic Protocols) financiado por la UE. El protocolo, que recoge el procedimiento a seguir desde la toma de muestras de material vegetal hasta su diagnóstico final (Figura 2.1), se ha validado mediante “ring tests” en ensayos inter-laboratorios (López *et al.*, 2006 b) y ha sido publicado como Phytosanitary Measures PM7/20 por la EPPO (EPPO, 2004).

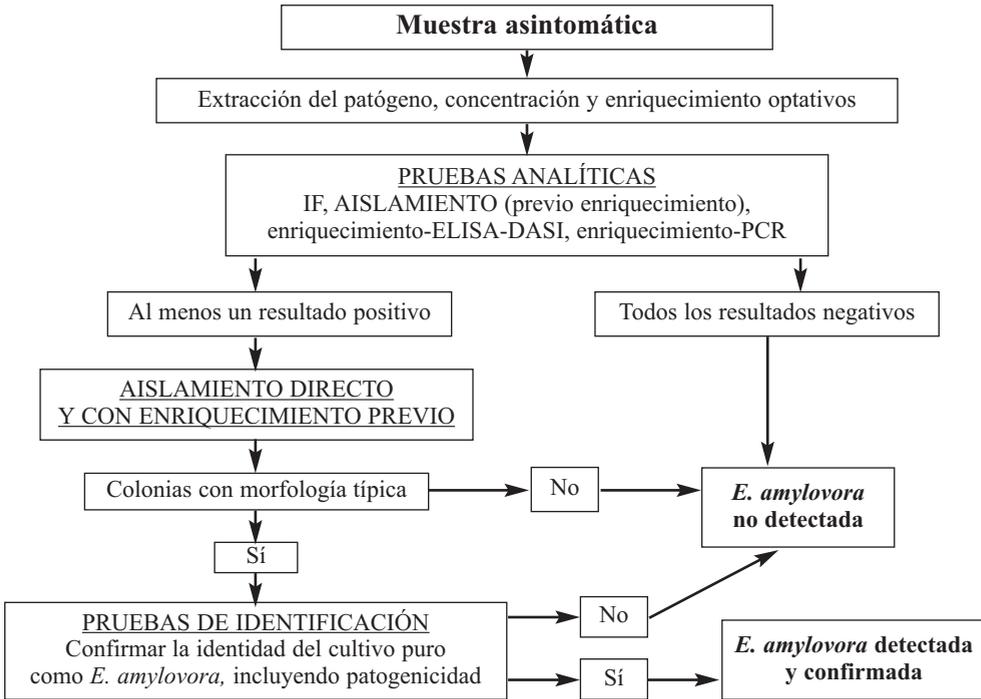
El protocolo aconsejado para el diagnóstico de plantas con síntomas se recoge en la Figura 2.1, e incluye como pruebas iniciales el aislamiento (con o sin enriquecimiento previo, dependiendo de las características de las muestras) y pruebas rápidas serológicas o moleculares. En caso de ser todas positivas, se procederá a la identificación de la bacteria y a la confirmación de su poder patógeno. En caso de ser las pruebas serológicas y/o moleculares positivas y el aislamiento negativo, se realizará un nuevo análisis de la muestra, o de otro material del mismo origen, con enriquecimiento previo, en los medios líquidos B de King (King *et al.*, 1954) y CCT (Ishimaru y Klos, 1984). Las técnicas seleccionadas para el protocolo EPPO, se han validado en diez laboratorios europeos y presentan una sensibilidad, especificidad y fiabilidad que se consideran apropiadas para el diagnóstico rutinario (López *et al.*, 2006 b).

En el análisis de muestras asintomáticas (Figura 2.1) se aconseja el enriquecimiento previo del patógeno y posterior análisis mediante ELISA-DASI, PCR y aislamiento. Como en el caso de las muestras sintomáticas, la confirmación de la detección requerirá el aislamiento y la identificación de *E. amylovora*.

Actualmente se halla en preparación un nuevo protocolo actualizado de diagnóstico y detección de *E. amylovora*, coordinado por “International Plant Protection Convention” (IPPC), de la FAO. Éste incluirá técnicas recientemente desarrolladas y de gran interés como la PCR a tiempo real, pero se basará también en las técnicas recogidas en el protocolo de la EPPO (EPPO, 2004).

Figura 2.1. Diagrama de flujo que representa el protocolo de diagnóstico de *Erwinia amylovora* de acuerdo a la norma PM7/20 de la EPPO (EPPO, 2004).





BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 339-366.
- ANÓNIMO 2000. Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. *Official Journal of the European Communities*, L169, 10 July 2000, Vol. 43: 1-112.
- ANÓNIMO 2003. Commission Directive 2003/116/EC of 4 December 2003 amending Annexes II, III and V to Council Directive 2000/29/EC as regards to harmful organism *Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. et al. *Official Journal of the European Union*, L321, 6 December 2003: 36.
- BENNET, R.A., BILLING, E. 1978. Capsulation and virulence in *Erwinia amylovora*. *Annals of Applied Biology*, 89: 41-45.
- BERESWILL, S., BUGERT, P., BRUCHMÜLLER, I., GEIDER, K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2636-2642.
- BERESWILL, S., JOCK, S., BELLEMANN, P., GEIDER, K. 1998. Identification of *Erwinia amylovora* by growth in the presence of copper sulfate and by capsule staining with lectin. *Plant Disease*, 82: 158-164.
- BERESWILL, S., PAHL, A., BELLEMANN, P., ZELLER, W., GEIDER, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3522-3526.
- BILLING, E., BAKER, L.A.E., CROSSE, J.E., GARRET, C.M.E. 1961. Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *Journal of Applied Bacteriology*, 24: 195-211.
- BIOSCA, E.G., MARCO-NOALES, E., ORDAX, M., LÓPEZ, M.M. 2006. Long-term starvation-survival of *Erwinia amylovora* in sterile irrigation water. *Acta Horticulturae*, 704: 107-112.
- BIOSCA, E.G., SANTANDER, R.D., MARCO-NOALES, E., ORDAX, M., ÁGUILA, B., LÓPEZ, M.M. 2008. *Erwinia amylovora* survives in natural water. *Acta Horticulturae*, 793: 83-87.
- BOCSANCZY, A.M., PERNA, N.T., GLASSNER, J., SEBAIHIA, M., DECLERCK, G.A., CARTINHO, S., SCHNEIDER, D.J., PARKHILL, J., BEER, S.V. 2007. Contributions of the genome sequence of *Erwinia amylovora* to the fire blight community. *Abstracts of the 11th International Workshop on Fire Blight*. Portland, USA, p. 32.
- BOGDANOVA, A.J., KIM, J.F., BEER, S.V. 2000. Disease-specific genes of *Erwinia amylovora*: keys to understanding pathogenesis and potential targets for disease control: 163-177. En: J.L. Vanneste (ed.). *Fire Blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN: 0-85199-294-3.
- BRENNER, D.J. 1984. Family I. *Enterobacteriaceae*. Pags. 408-420. Vol. 1. En: N.R.A. Krieg, J.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. ISBN: 0-683-04108-8.

- BURRILL, T.J. 1983. New species of *Micrococcus*. *American Naturalist*, 17: 319-320.
- CABREFIGA, J., MONTESINOS, E. 2005. Analysis of aggressiveness of *E. amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology*, 95:1430-1436.
- CAMBRA, M., OLMOS, A., GORRIS, M.T., DURAN, N., ROMÁN, M.P., CAMARASA, E., DASÍ, M.A. 1996. Sensitive detection of plant pathogens by using immobilized targets in tissue imprinted membranes. *Abstracts of 4th International Symposium European Foundation for Plant Pathology*. Bonn, Germany.
- CRESBRON, S., BRISSET, M.N., THARAUD, M., PAULIN, J.P. 2004. The *hrpL* negatively regulates flagella system in *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 704: 407-408.
- DE BELLIS, P., SCHENA, L., CARIDDI, C. 2007. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 11-22.
- DELLAGI, A., BRISSET, M.N., PAULIN, J.P., EXPERT, D. 1998. Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 734-742.
- DONAT, V. 2004. Caracterización fenotípica y genotípica de aislados españoles de *Erwinia amylovora*. Tesis Doctoral. Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. ETSIA. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.
- DONAT, V., BIOSCA, E.G., PEÑALVER, J., LÓPEZ, M.M. 2007. Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infections sources. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1639-1649.
- DONAT, V., BIOSCA, E.G., RICO, A., PEÑALVER, J., BORRUEL, M., BERRA, D., BASTERRETXEA, T., MURILLO, J., LÓPEZ, M.M. 2005. *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics. *Annals of Applied Biology*, 146: 105-114.
- DUFFY, B., VOGELSANGER, J., STOCKWELL, V., SCHOCH, B., BITTERLIN, W., OBERHÄNSLI, T., HOLLIGER, E. 2007. *Erwinia amylovora* AgriStrip: A rapid immunological tool for fire blight diagnostics. *Abstracts of the 11th International Workshop on Fire Blight*. Portland, USA, p. 105.
- EPPO 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. Phytosanitary measures PM 7/20 *Erwinia amylovora*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 159-171.
- EXPERT, D., DELLAGI, A., KACHADOURIAN, R. 2000. Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferrioxamine E, the main siderophore of *Erwinia amylovora*: 179-195. En: J.L. Vanneste (ed.). *Fire Blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN: 0-85199-294-3.
- GEIDER, K. 2000. Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan: 117-140. En: J.L. Vanneste (ed.). *Fire Blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN: 0-85199-294-3.
- GEIDER, K., MOLTMAN, E., ZELLER, W., MOHAMMADI, M. 2007. Simultaneous detection of *Erwinia amylovora* strains with and without plasmid pEA29 and of antagonistic bacteria by real-time PCR. *Abstracts of the 11th International Workshop on Fire Blight*. Portland, Oregon, USA, p. 108.

- GORRIS, M.T., CAMARASA, E., LÓPEZ, M.M., PAULIN, J.P., CHARTIER, R., CAMBRA, M. 1996a. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. *Acta Horticulturae*, 411: 47-52.
- GORRIS, M.T., CAMBRA, M., LECOMTE, P., LLOP, P., CHARTIER, R., PAULIN, J.P., LÓPEZ, M.M. 1996b. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 411: 41-46.
- GUILFORD, P.J., TAYLOR, R.K., CLARK, R.G., HALE, C.N., FORSTER, L. S. 1996. PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 411: 53-56.
- HAUBEN, L., MOORE, E.R.B., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT, J., VERDONCK, L., SWINGS, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 384-397.
- HILDEBRAND, D.C., SCHROTH, M.N., SANDS, D.C. 1988. *Pseudomonas*: pp. 60-80. En: N.W. Schaad (ed.). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. ISBN: 0-89054-263-5.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition, 787 pp. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, Maryland, USA. 787 pp. ISBN: 0-683-00603-7.
- ISHIMARU, C., KLOS, E.J. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology*, 74: 1342-1345.
- JOCK, S., DONAT, V., LÓPEZ, M.M., BAZZI, C., GEIDER, K. 2002. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology*, 4: 106-114.
- JONES, A.L., GEIDER, K. 2001. *Erwinia amylovora* group: 40-55. En: N.W. Schaad, J.B. Jones, W. Chun (eds.). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St. Paul, Minnesota. ISBN: 0-89054-263-5.
- JONES, A.L., SCHNABEL, E.L. 1998. Streptomycin and oxytetracycline resistance determinants among bacteria from Michigan apple orchards and their potential importance. *Acta Horticulturae*, 489: 673.
- JONES, A.L., SCHNABEL, E.L. 2000. The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*: 235-251. En: J.L. Vanneste (ed.). *Fire Blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN: 0-85199-294-3.
- JONES, A.L., CHIOU, C.S., McMANUS, P.S. 1996. Epidemiology and genetic diversity of streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 411: 327-330.
- KIM J.F., BEER S.V. 2000. *hrp* genes and harpins of *Erwinia amylovora*, a decade of discovery: 141-161. En: J.L. Vanneste (ed.). *Fire Blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN: 0-85199-294-3.
- KIM, W.S., RHIM, S.L., VOLKSCH, B., GARDAN, L., PAULIN, J.P., JOCK, S., GEIDER, K. 1999. Characterization of a new *Erwinia* species affecting Asian pear trees. *Acta Horticulturae*, 489: 201-205.

- KING, E.O., WARD, M., RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 44: 401-407.
- LELLIOT, R.A. 1967. The diagnosis of fire blight (*Erwinia amylovora*) and some diseases caused by *Pseudomonas syringae*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 45: 27-34.
- LOPER, J.E., HENKELS, M.D., ROBERTS, R.G., GROVE, G.G., WILLET, M.J., SMITH, T.J. 1991. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* in Michigan. *Acta Horticulturae*, 75: 287-290.
- LÓPEZ, M.M., BERTOLINI, E., MARCO-NOALES, E., LLOP, P., CAMBRA, M. 2006a. Update on molecular tools for detection of plant pathogenic bacteria and viruses: 1-46. En: J.R. Rao, C.C. Fleming, J.E., Moore (eds.). *Molecular Diagnostics. Current technology and applications*. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom. ISBN: 978-1-904933-19-9.
- LÓPEZ, M.M., BERTOLINI, E., OLMOS, A., CARUSO, P., GORRIS, M.T., LLOP, P., PENYALVER, R., CAMBRA, M. 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *International Microbiology*, 6: 233-243.
- LÓPEZ, M.M., CAMBRA, M. 1996. Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas: 587-625. En: G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello (eds.). *Patología Vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología -Agropupli. Vol.1. ISBN: 84-921910-07.
- LÓPEZ, M.M., LLOP, P., DONAT, V., PEÑALVER, J., RICO, A., ORTIZ, A., MURILLO, J., LLORENTE, I., BADOSA, E., MONTESINOS, E. 2002. Chronicle of a disease foretold (that advances slowly): the 2001 Spanish situation. *Acta Horticulturae*, 590: 35-38.
- LÓPEZ, M.M., LLOP, P., GORRIS, M.T., PEÑALVER, J., DONAT, V., CAMBRA, M., KECK, M. 2006b. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 704: 99-103.
- LÓPEZ, M.M., NOVAL, C., PALAZÓN, I., SAMPAYO, F. 1987. *El fuego bacteriano. Erwinia amylovora*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 72 pp. ISBN: 84-7479-650-4.
- LLOP, P., BONATERRA, A., PEÑALVER, J., LÓPEZ, M.M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 234-240.
- LLOP, P., CARUSO, P., CUBERO, J., MORENTE, C., LÓPEZ, M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 23-31.
- LLOP, P., DONAT, V., RODRÍGUEZ, M., CABREFIGA, J., RUZ, L., PALOMO, J.L., MONTESINOS, E., LÓPEZ, M. M. 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96: 900-907.
- LLOP, P., GONZÁLEZ, R., PULAWSKA, J., BULTREYS, A., CABREFIGA, J., LÓPEZ, M.M. 2008. The new plasmid pEI70 is present in *Erwinia amylovora* European strains. *Acta Horticulturae*, 793: 131-136.
- MAES, M., GARBEVA, P., CREPEL, C. 1996. Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 45: 1139-1149.

- McLAUGHLIN, R.J., CHEN, T.A., WELLS, J.M. 1989. Monoclonal antibodies against *Erwinia amylovora*: characterization and evaluation of a mixture for detection by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology*, 79: 610-613.
- McMANUS, P.S., JONES, A.L. 1994. Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology*, 84: 627-633.
- McMANUS, P.S., JONES, A.L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested-PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. *Phytopathology*, 85: 618-623.
- MILLER, T.D., SCHROTH, M.N. 1972. Monitoring of epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pears with selective medium. *Phytopathology*, 62: 1175-1182.
- MONTESINOS, E., LÓPEZ, M.M. 1998. El fuego bacteriano de las rosáceas. Situación actual y perspectivas de control. *Phytoma España*, 104: 24-36.
- ORDAX, M. 2008. *Supervivencia de Erwinia amylovora en condiciones de estrés: influencia de la presencia de cobre y la limitación de nutrientes*. Tesis doctoral. ETSIA. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.
- ORDAX, M., MARCO-NOALES, E., LÓPEZ, M.M., BIOSCA, E.G. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3482-3488.
- PAULIN, J.P. 2000. *Erwinia amylovora*: general characteristics: 87-115. En: J.L. Vanneste (ed.). *Fire Blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN: 0-85199-294-3.
- PAULIN, J.P., SAMSON, R. 1973. Le feu bactérien en France II. Caractères des souches d'*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, 1920 isolées du foyer Franco-Belge. *Annales de Phytopathologie*, 5: 389-397.
- PULAWSKA, J., MAES, M., DECKERS, T., SOBICZEWSKI, P. 1997. The influence of pesticide contamination on detection of epiphytic *Erwinia amylovora* using PCR. Medecin Faculty Landbouww. University of Gent 62/3b: 959-962.
- RAY, T.C., SMITH, A.R.W., CARTER, K.J., HIGNETT, R.C. 1986. Composition of lipopolysaccharides from four strains of *Erwinia amylovora*. *Journal of General Microbiology*, 132: 3159-3167.
- RAYMUNDO, A.K., RIES, S.M. 1980a. Motility of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 70: 1062-1065.
- RAYMUNDO, A.K., RIES S.M. 1980b. Chemotaxis of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 70: 1066-1069.
- ROSELLÓ, M., FERRER, S., LLOP, P., LÓPEZ, M.M., CHRISTEN, R., GARDAN, L. 2008. Description of *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., causal agent of pear blossom necrosis. *Acta Horticulturae*, 793: 137-140.
- ROSELLÓ, M., GARCÍA-VIDAL, S., TARÍN, A., LLOP, P., GORRIS, M.T., DONAT, V., CHARTIER, R., PAULIN, J.P., GARDAN, L., PEÑALVER, J., LÓPEZ, M.M. 2002. Characterization of an *Erwinia* sp. isolated from necrotic pear blossoms in Valencia, Spain. *Acta Horticulturae*, 590: 139-142.

- ROSELLÓ, M., PEÑALVER, J., LLOP, P., GORRIS, M. T., CHARTIER, R., GARCÍA, F., MONTÓN, C., CAMBRA, M., LÓPEZ, M. M. 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28: 30-41.
- SALM, H., GEIDER, K. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Plant Pathology*, 53: 602-610.
- SEEMÜLLER, E.A., BEER, S.V. 1976. Absence of cell wall polysaccharide degradation by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 66: 433-436.
- SLADE, M.B., TIFFIN, A.I. 1984. Biochemical and serological characterization of *Erwinia*: 228-293. Vol. 15. En: T. Bergan (ed.). *Methods in Microbiology*. Academic Press, London. ISBN: 0-12-521515-0.
- SOBICZEWSKI, P., DECKERS, T., PULAWSKA, J. 1997. Fire blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. En P. Sobiczewski, T. Deckers, J. Pulawska (eds.). *Phare the European Union's. Phare Partnership and Institution Building programme*.
- TAYLOR, R.K., GUILFORD, P.J., CLARK, R.G., HALE, C.N., FORSTER, R. 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 35-43.
- THOMSON, S.V. 1986. Epidemiology of fire blight: 9-36. En: J.L. Vanneste (ed.). *Fire Blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN: 0-85199-294-3.
- VAN DER ZWET, T., WELLS, J.M. 1993. Application of fatty acid class analyses for the detection and identification of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 338: 233.
- VANNESTE, J.L., VOYLE, M.D. 1998. Genetic basis of streptomycin resistance in pathogenic and epiphytic bacteria isolated in apple orchards in New Zealand. *Acta Horticulturae*, 489: 167-672.
- WINSLOW, C.E.A., BROADHURST, J., BUCHANAN, R.E., KRUMWIEDE, C. Jr., ROGERS, L.A., SMITH, G.H. 1920. The families and genera of the bacteria; *Erwineae*. *Journal of Bacteriology*, 5: 191-229.
- WON-SIK, K., CASTLE, A., SVIRCEV, A.M. 2007. Direct real-time PCR: towards rapid and cost effective application in fire blight diagnosis. *Abstracts of the 11th International Workshop on Fire Blight*. Portland, USA, p. 110.