



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**

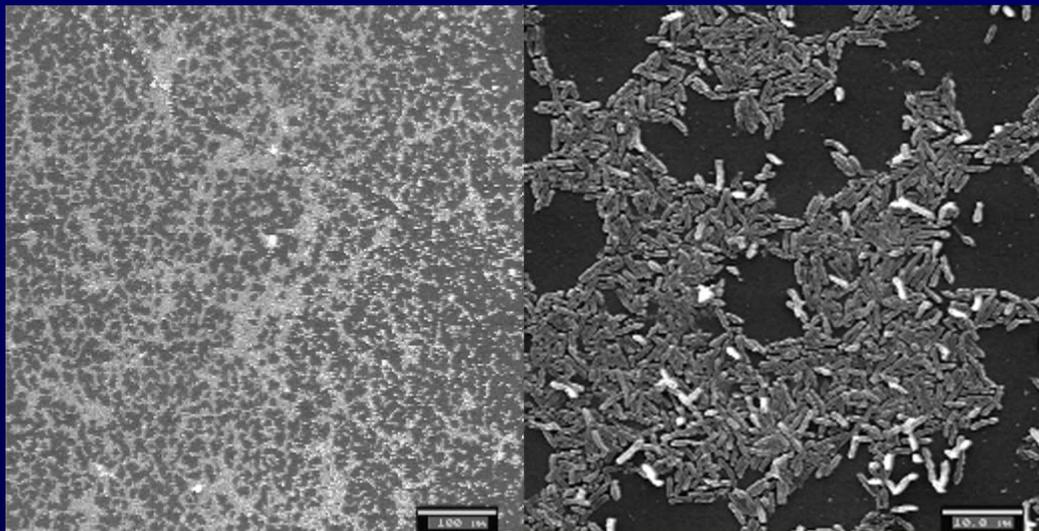
Fondo Europeo Agrícola  
de Desarrollo Rural. FEADER

# CARACTERÍSTICAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS

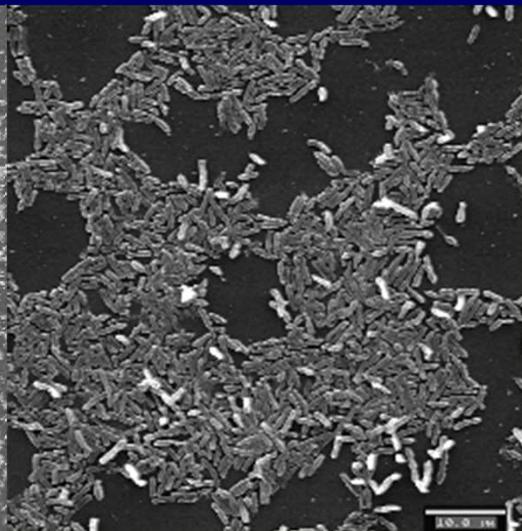
- Causantes de enfermedades en plantas
- Organismos unicelulares procariotas
- Sólo visibles al microscopio ( $\mu\text{m}$ )
- Pared celular (Gram positivas y Gram negativas)
- Un único cromosoma, ADN doble hélice, libre en el citoplasma (carecen de verdadero núcleo)
- Escisión binaria (reproducción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

# Tamaño y morfología

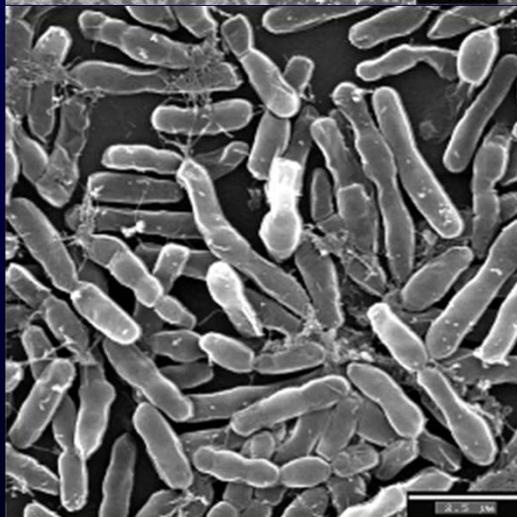
✓ 180 X



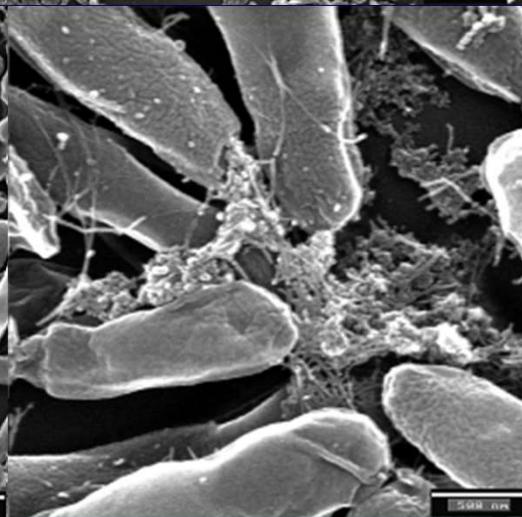
✓ 1800 X



✓ 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](http://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***

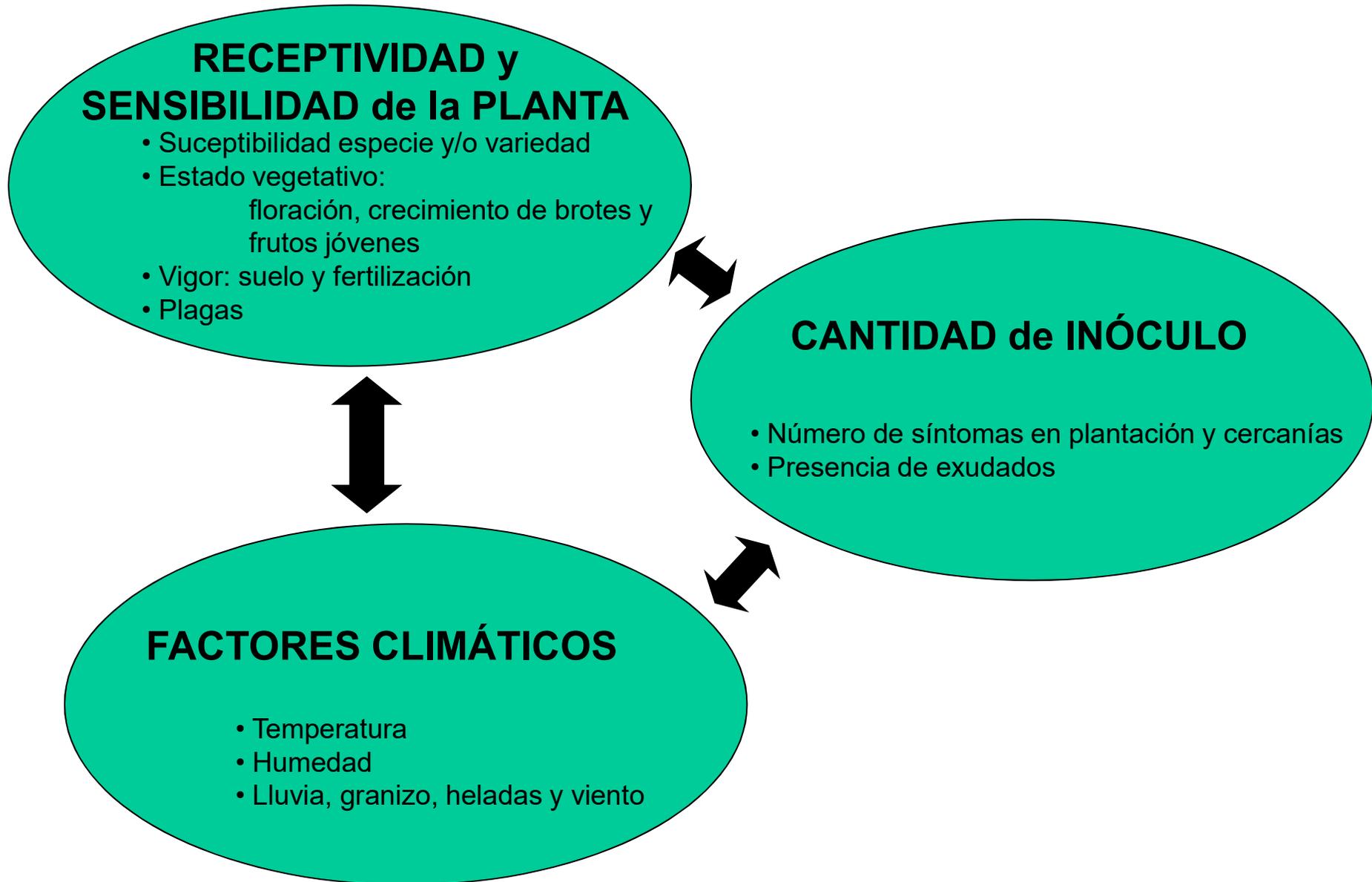
© Dr. Doug Cook, UC Davis



***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***



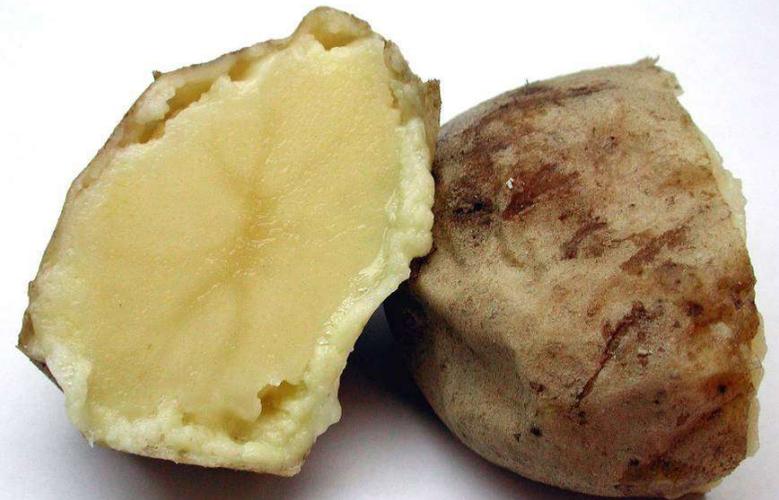


***Xanthomonas arboricola* pv. *pruni***



***Dickeya zeae***

***Pectobacterium* spp.**



***Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi***

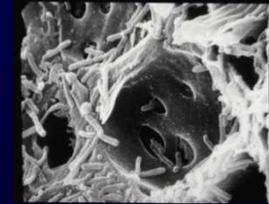


***Agrobacterium vitis***





# *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

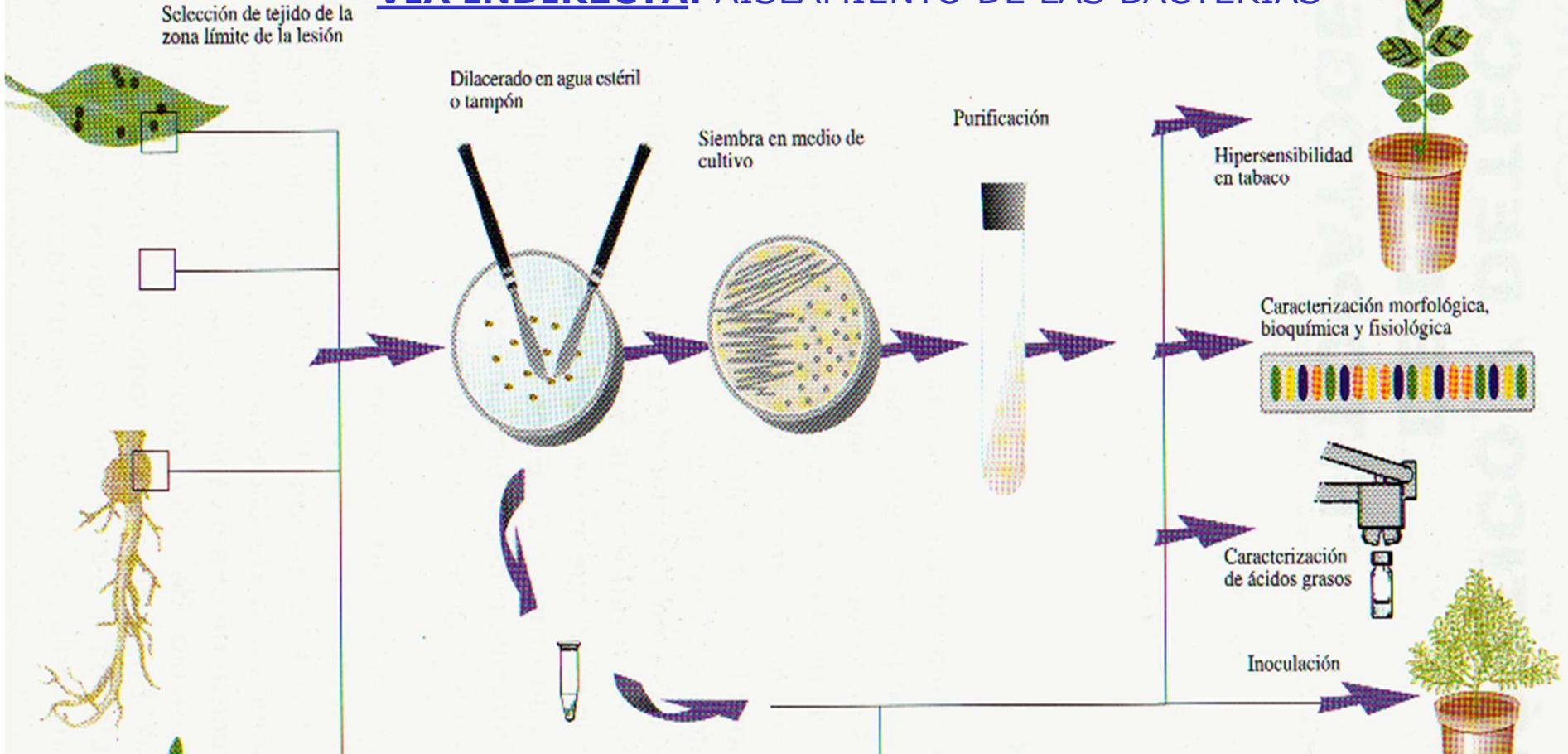
**MEDIDAS PREVENTIVAS.** Evitar introducción del patógeno en nuevas áreas. Utilización de material vegetal sano certificado (inspección, cuarentena)

**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



## VÍA DIRECTA: SIN AISLAMIENTO



# 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*)

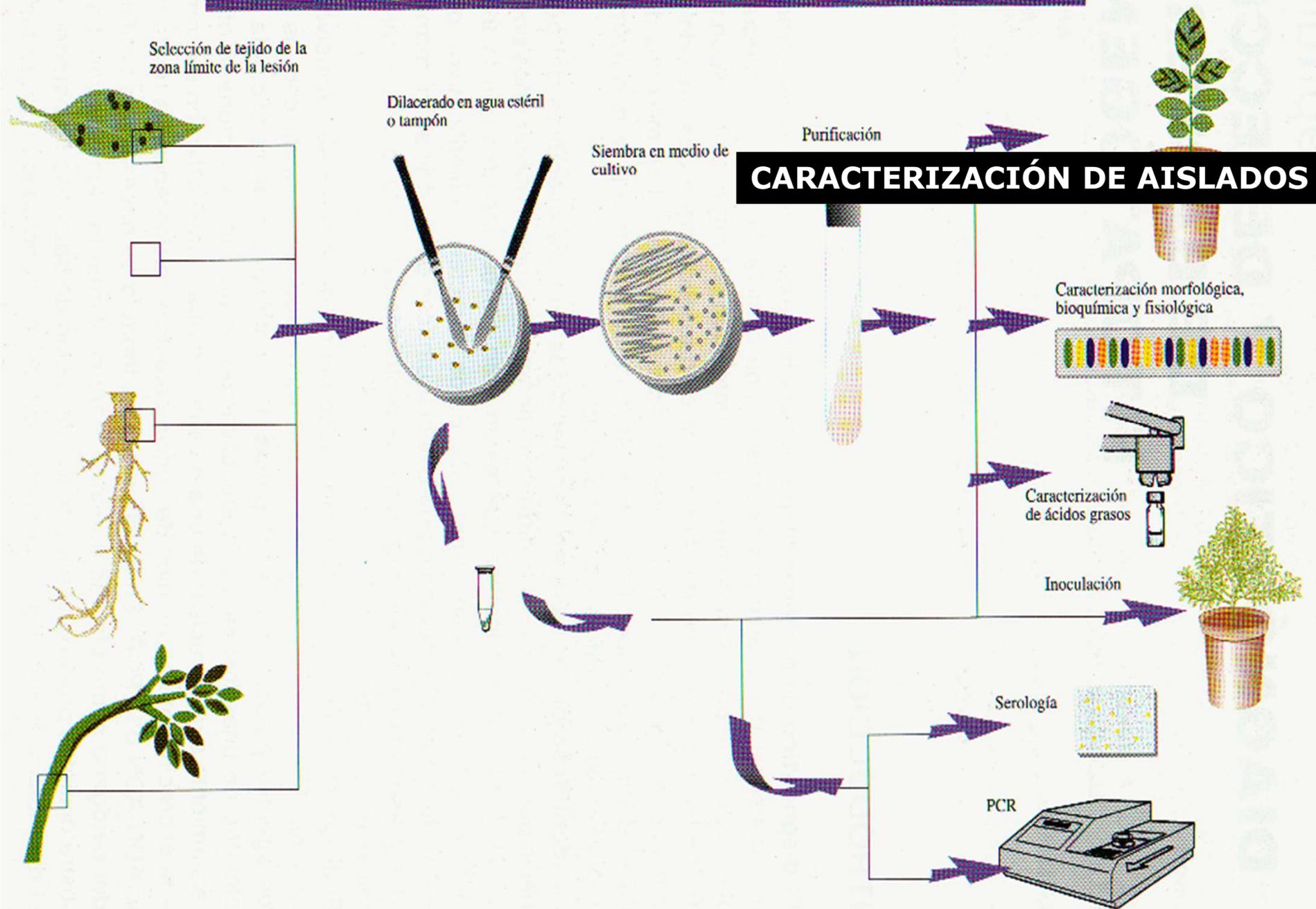
CVP (*Dickeya* spp. y *Pectobacterium* spp.)

SMSA (*Ralstonia solanacearum*)

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

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

# Diagnóstico de bacterias fitopatógenas.

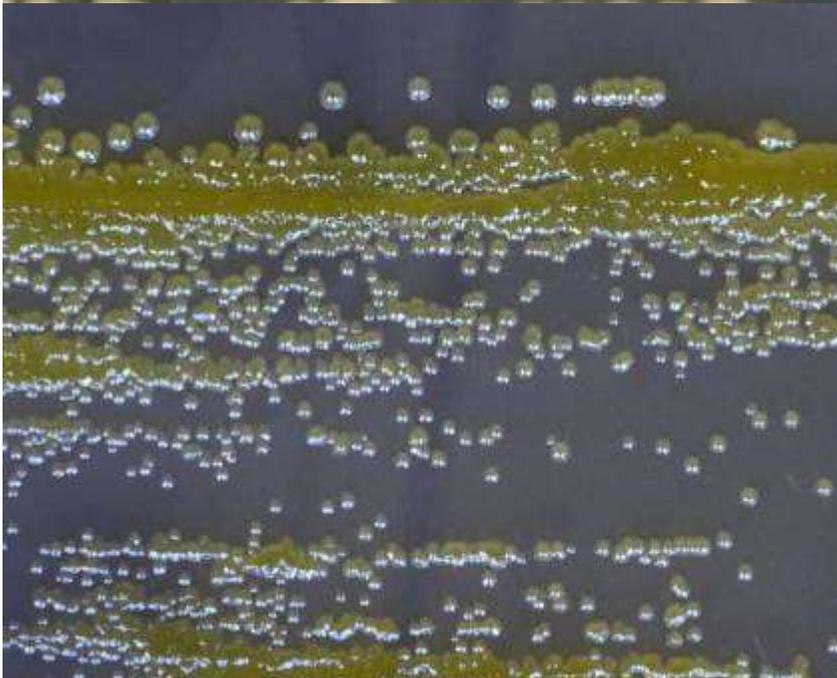


# CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS BACTERIANOS

(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

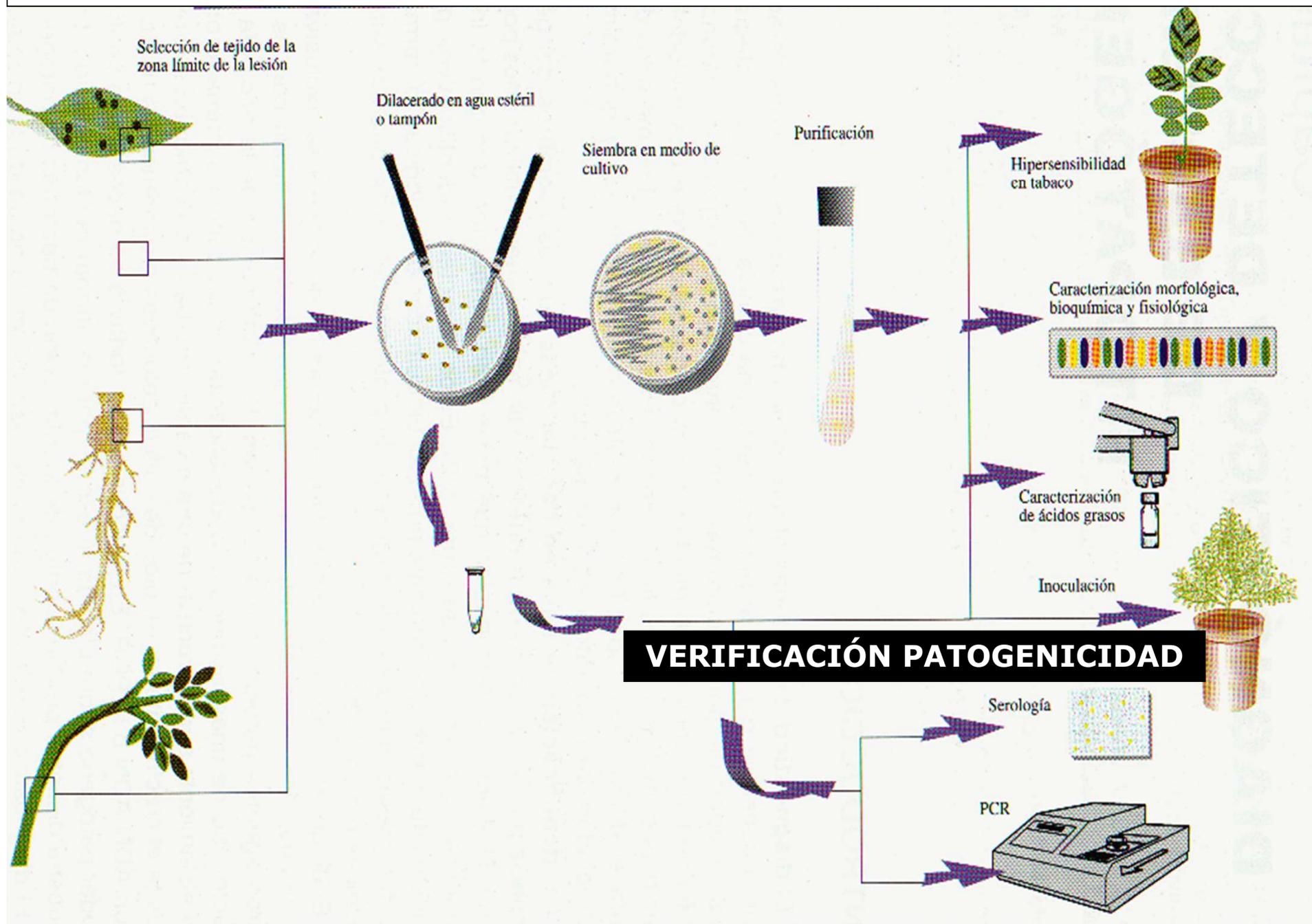
**Diferencias morfológicas**



# 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

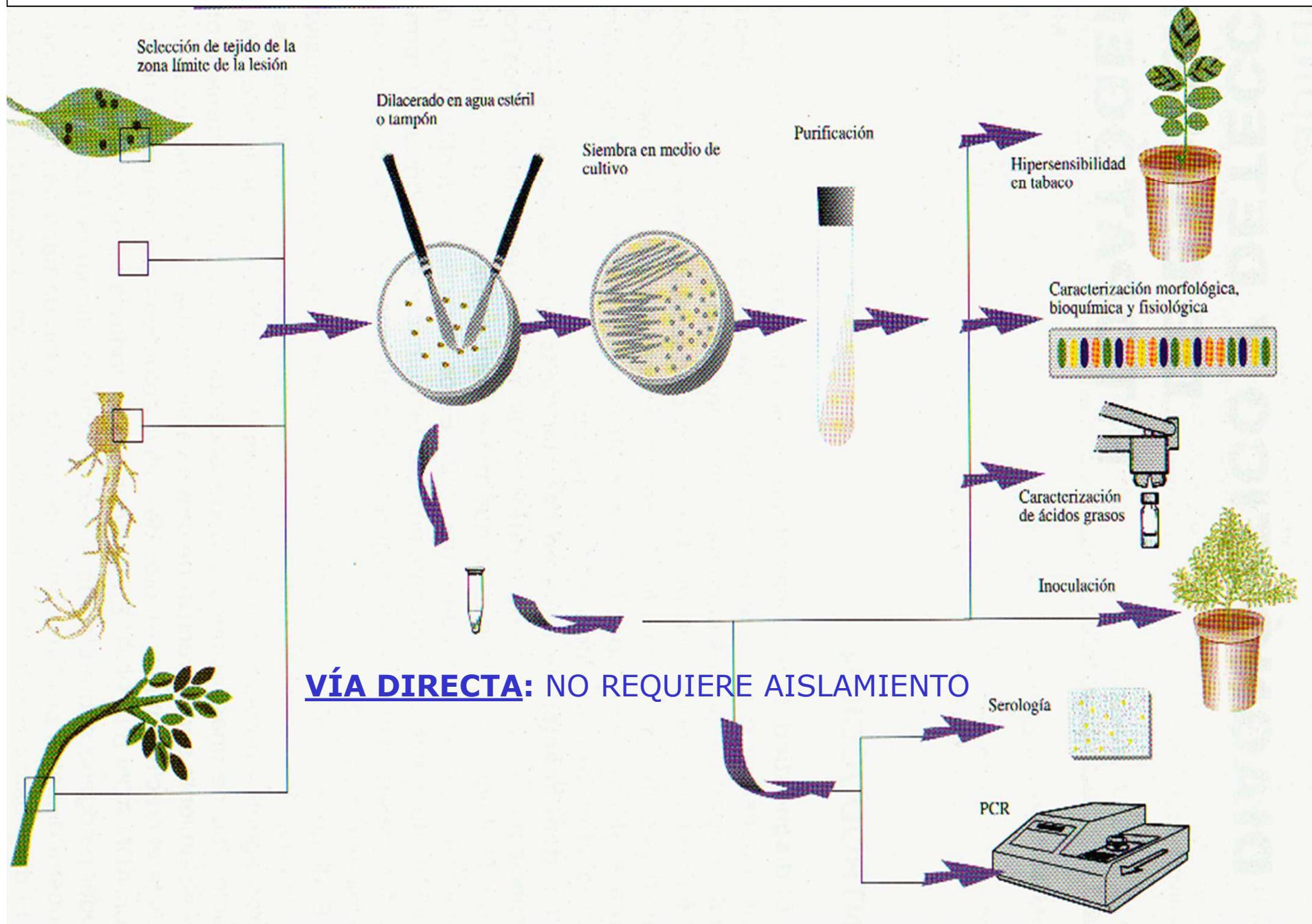
*Agrobacterium* en tabaco



*Agrobacterium* en tomate



# Protocolo general análisis integrado bacterias fitopatógenas



# TÉCNICAS SEROLÓGICAS

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

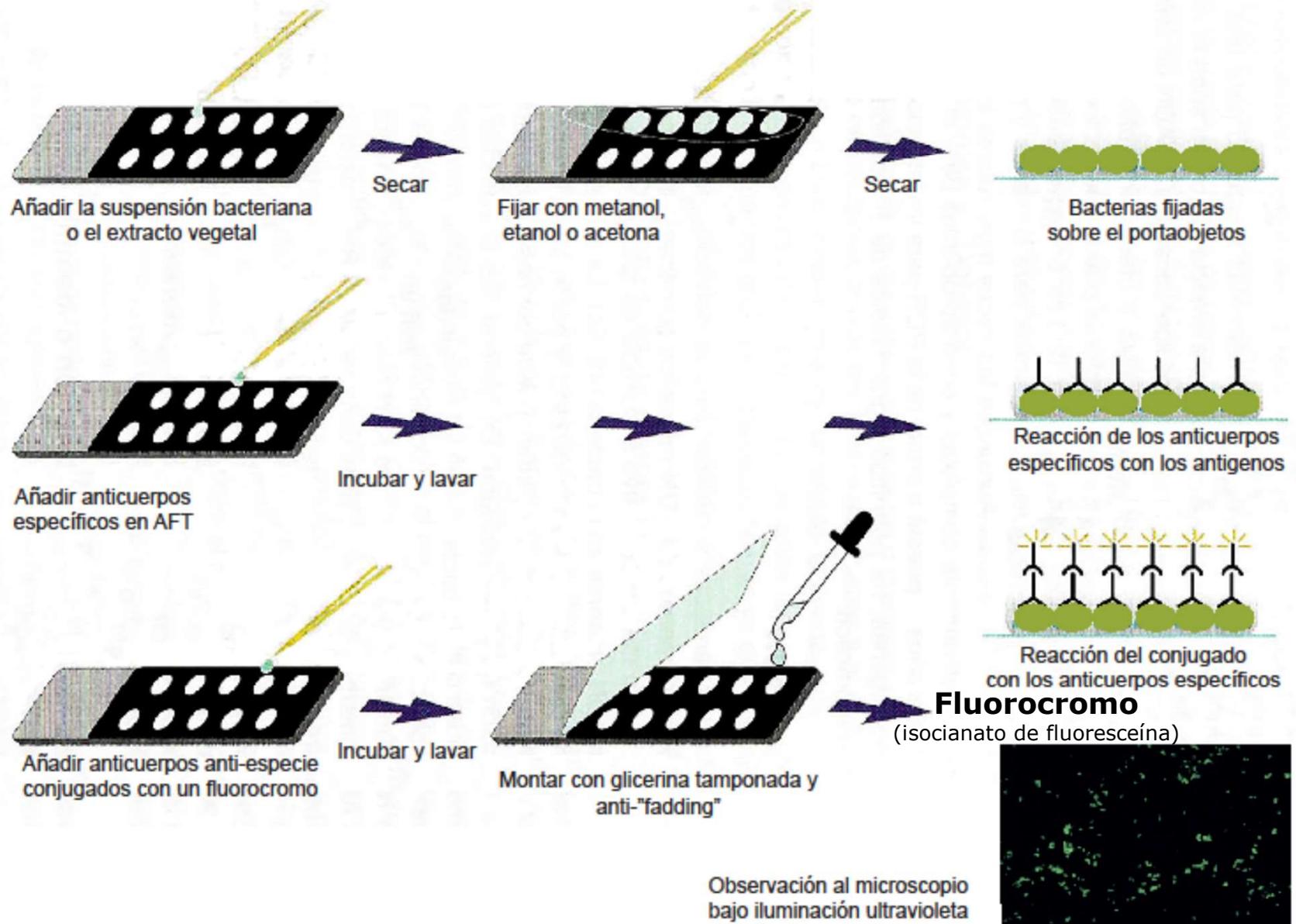
# ELISA

## *(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

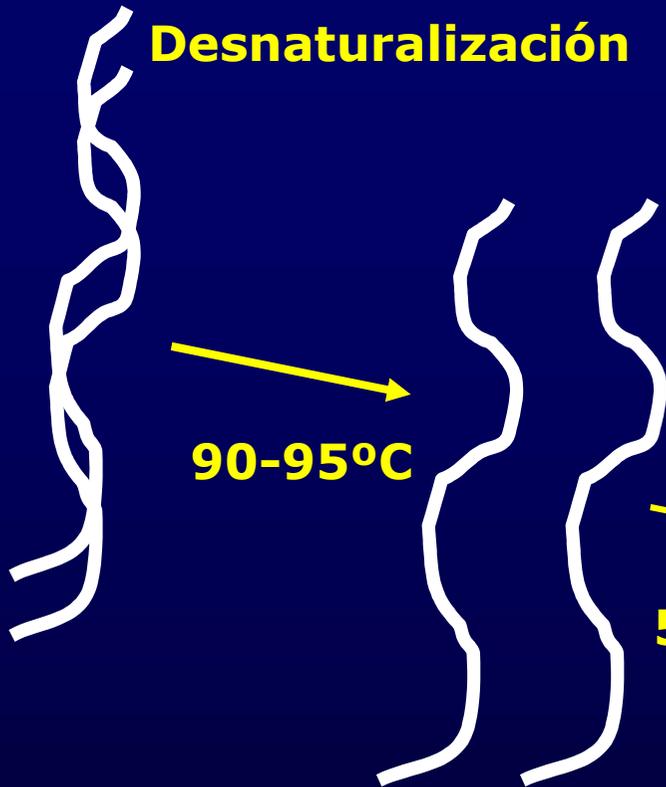


# TÉCNICAS MOLECULARES

## PCR (*polymerase chain reaction*)

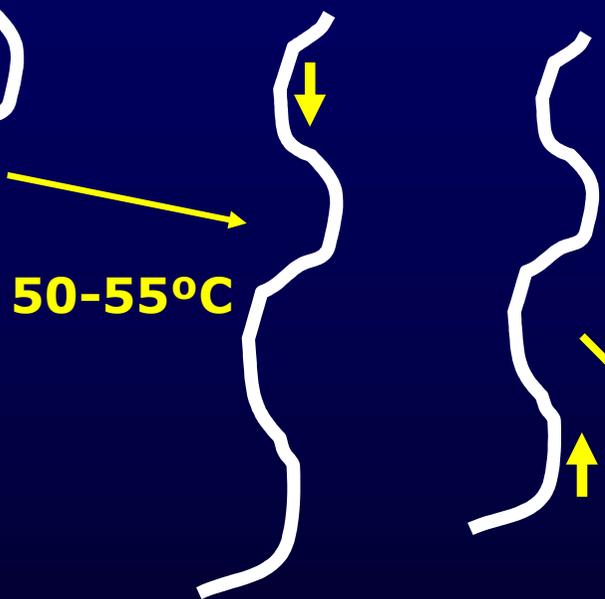
- Síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN.
- Usando como cebadores 2 oligonucleótidos que hibridan con las cadenas del ADN molde flanqueando la región de interés. Secuencias en bases de datos (genes ribosómicos, de patogenicidad/virulencia, plasmídicos)
- Enzima (Taq DNA polimerasa)
- Amplifica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

**Desnaturalización**



**Apareamiento: Hibridación del molde**

**Cebadores**



**Taq  
Tampón  
MgCl<sub>2</sub>  
dNTPs  
Agua**

**Síntesis del ADN**

**72°C**



**TERMOCICLADOR**



**95° C**

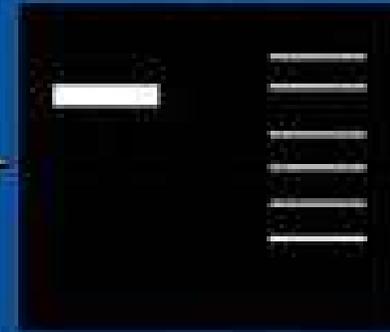
**95° C 10´**

**50° C**

**72°C**

**ciclos**

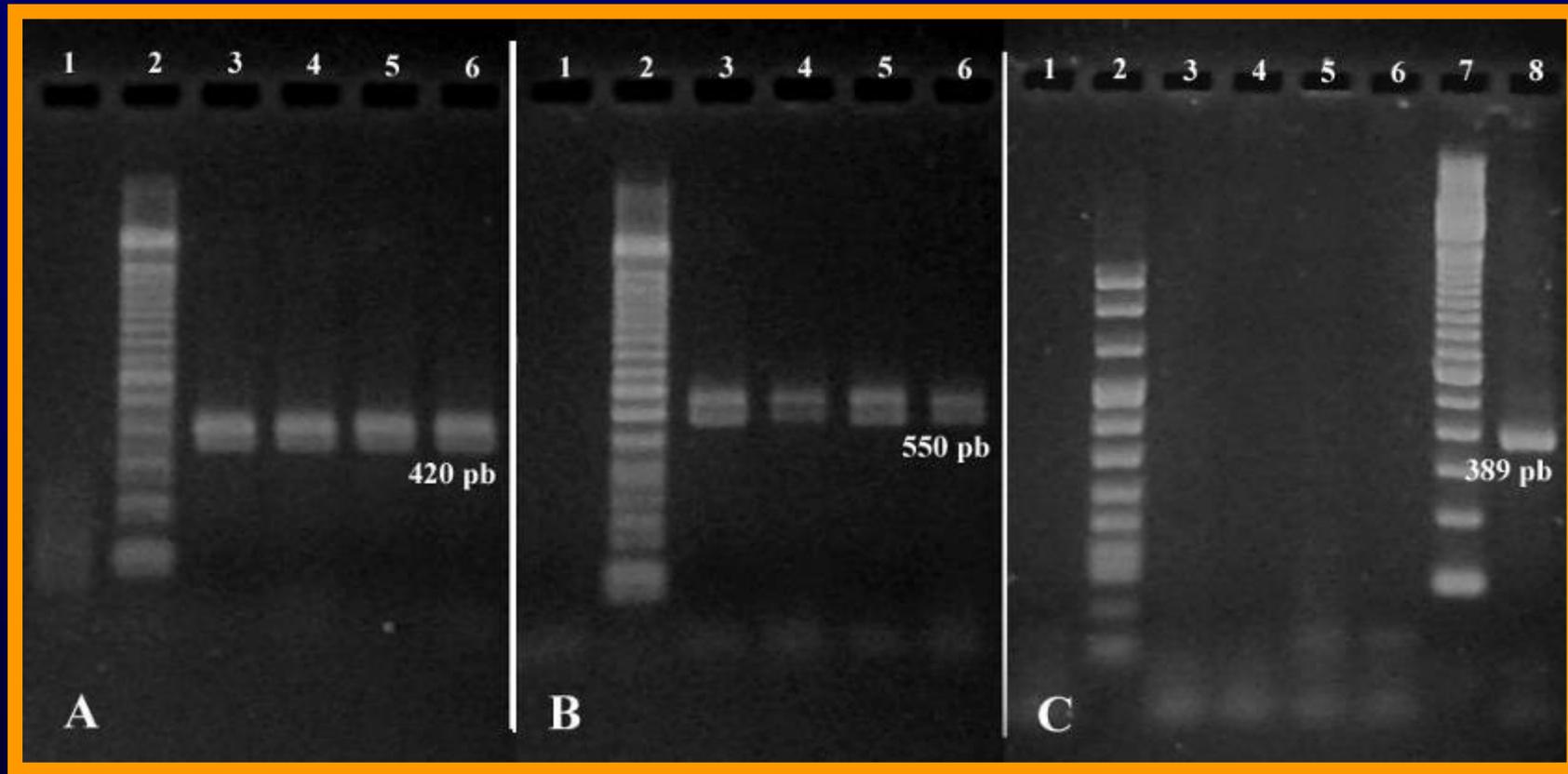
# PCR convencional



**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**

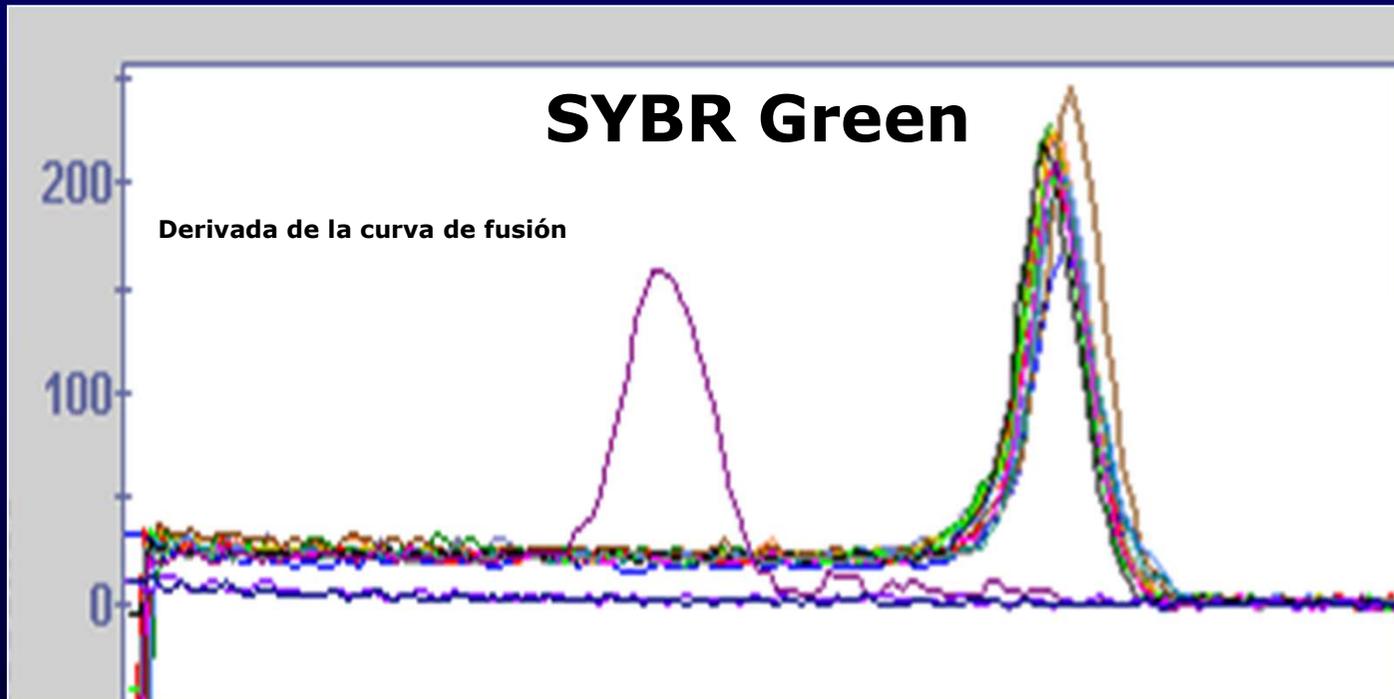
- \* Relativamente baja sensibilidad**
- \* Electroforesis**
- \* Riesgo de contaminación entre muestras**

# 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.

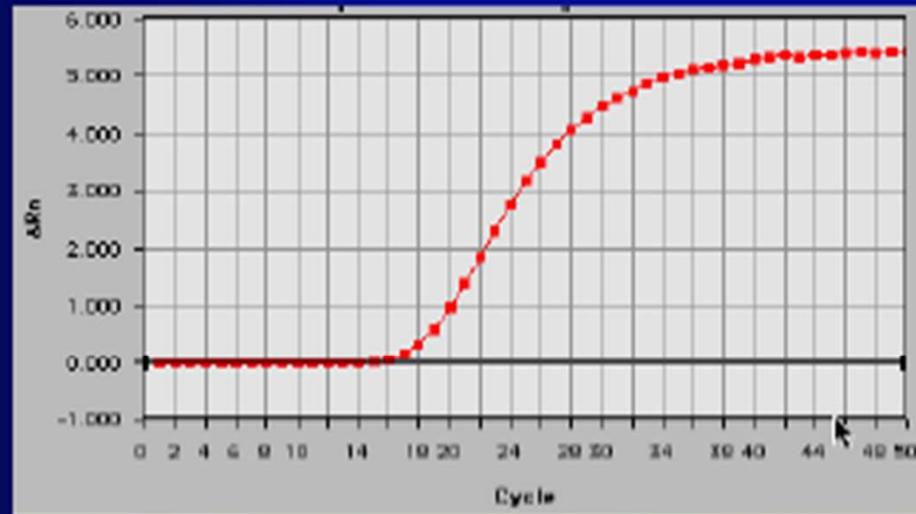
- Fluorocromo (SYBRGreen) que se intercala en el ADN de forma inespecífica. Amplificados se diferencian mediante análisis de curvas de fusión (secuencia).
- Sondas específicas marcadas con un fluoróforo que hibridan con la región interna del fragmento amplificado y liberan fluorescencia proporcionalmente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

# SYBR Green



# PCR tiempo real con sonda

Incremento  
de  
fluorescencia

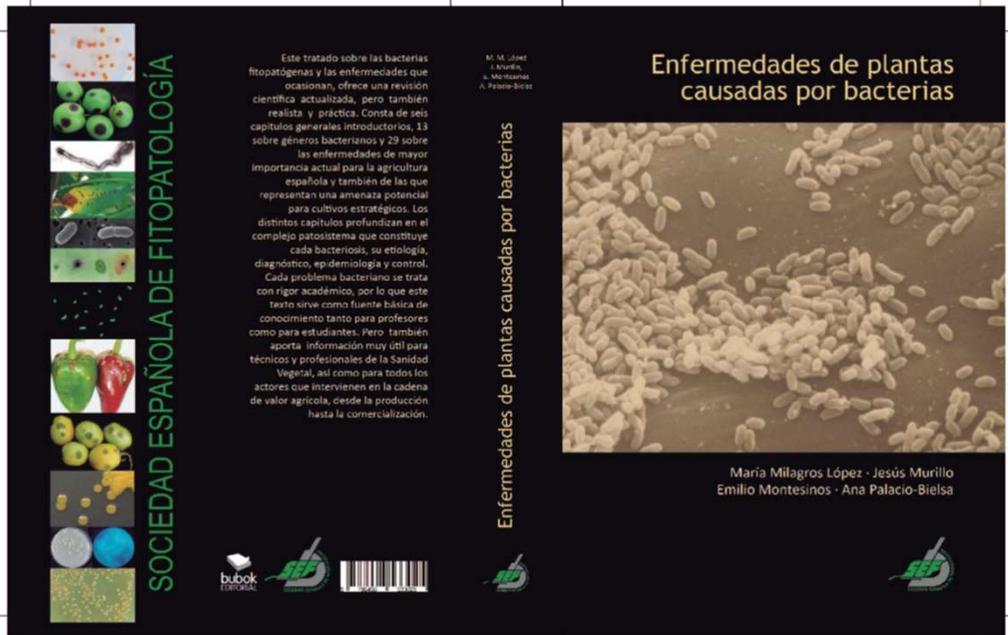


Ciclo de PCR

# 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.

# BIBLIOGRAFÍA



<http://www.bubok.es/autores/SEFLIBROS>



32

Monografías

Enfermedades causadas  
por la bacteria *Xylella fastidiosa*

Blanca B. Landa  
Ester Marco-Noales  
María Milagros López  
(coordinadoras)

 **cajamar**  
CAJA RURAL

<https://www.publicacionescajamar.es/pdf/series-tematicas/informes-coyuntura-monografias/enfermedades-causadas-por-la-bacteria.pdf>