

[FITOPATOLOGÍA]

Bacterias fitopatógenas del género *Dickeya* en aguas de riego de Aragón

Ana Palacio-Bielsa

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Unidad de Sanidad Vegetal

Miguel Cambra Álvarez

Centro de Protección Vegetal (CPV). Gobierno de Aragón

Las bacterias fitopatógenas pertenecientes al nuevo género *Dickeya* causan podredumbres blandas en un amplio rango de cultivos. Sin embargo, dada la reciente revisión taxonómica del género, apenas existen estudios de cepas bien caracterizados. Por primera vez, se ha detectado la presencia de estos patógenos en Aragón, tanto en cultivos como en aguas de riego. Actualmente se están secuenciando diversos genes de una colección de cepas de *Dickeya* aisladas en Aragón. Los autores presentan unos innovadores estudios que constituyen los primeros realizados en España y que, sin duda, contribuirán a un mejor conocimiento del patógeno.

Las bacterias fitopatógenas del nuevo género *Dickeya* gen. nov. (ex *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium chrysanthemi*) (Samson y col., 2005) incluyen seis especies que producen podredumbres blandas en un amplio rango de plantas cultivadas, ocasionando graves pérdidas económicas. Sin embargo, dada la reciente revisión taxonómica de este género, apenas existen estudios de caracterización bioquímica, serológica y genética.

Estos patógenos son frecuentes en aguas superficiales de ríos, lagos, pantanos, e incluso en el mar. Estudios realizados en Estados Unidos y Japón han mostrado que también están presentes en aguas de riego de campos cultivados, encontrando una relación entre el uso de aguas contaminadas para el riego y la incidencia de podredumbres blandas en diversos cultivos, entre ellos el maíz y la patata, afectando tanto a la propia planta como al tubérculo.

Las infecciones de maíz en campo están asociadas fundamentalmente al riego por aspersión y se producen cuando la bacteria accede, mediante el agua de riego, a la parte superior de la planta (Kelman y col., 1957; Hope y Kelman, 1969). Los síntomas de la enfermedad consisten en la pudrición de la zona apical del tallo, que se colapsa a nivel del cuarto o quinto nudo y generalmente aparece retorcido, aunque la planta puede permanecer en pie (Foto 1).

[Caracterización de aislados

Análisis bioquímicos

En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un nuevo método para la realización de análisis bioquímicos y fisiológicos de *Dickeya* spp. mediante un sistema de microplacas, que permite el análisis simultáneo de un elevado número de muestras y resulta



FOTO 1. Podredumbre del tallo en planta de maíz en campo infectada por *Dickeya* spp.

Incidencia en Aragón

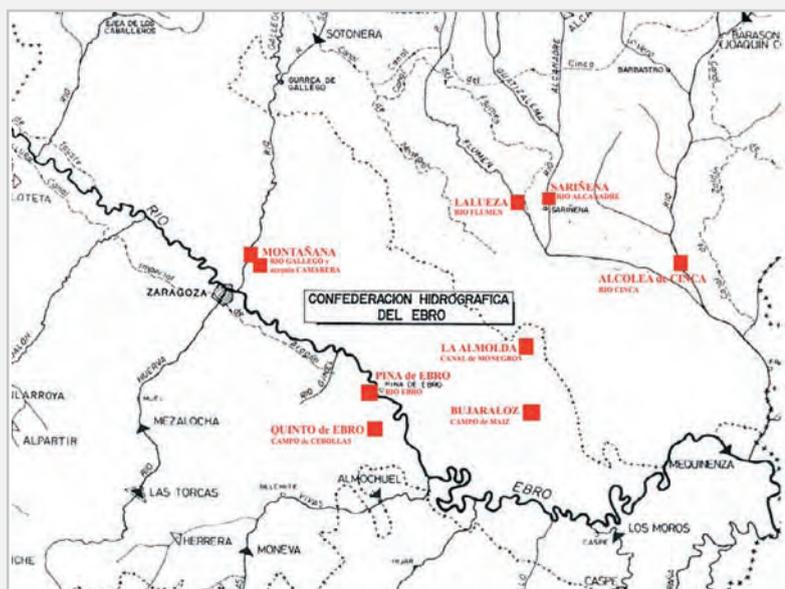


FOTO 2. Localización de los puntos de muestreo de aguas de riego (tomado de Informe sobre Riegos en Aragón. Diputación General de Aragón, 1996).

En la Comunidad Autónoma aragonesa, la transformación de amplias superficies de secano en plantaciones de maíz con riego por aspersión supone un riesgo de infección, habiendo tenido lugar las primeras detecciones de *Dickeya* en las áreas de Monegros y Bajo Ebro en el año 2004. En años sucesivos se han observando nuevos brotes de la enfermedad, aunque por el momento no ha ocasionado pérdidas importantes.

Ante la creciente detección de infecciones en Aragón en cultivos

de maíz, patata y, por primera vez en España, también en cebolla (Palacio-Bielsa y col., 2006 a,b; 2007), se ha estudiado la presencia de *Dickeya* spp. en aguas de riego. Estas bacterias se han detectado en el río Alcanadre, Canal de Monegros y en aguas de riego de plantaciones de maíz y cebolla (Palacio-Bielsa y col., 2006b) (Foto 2). Dichos estudios de detección y caracterización de aislados del género *Dickeya* obtenidos en aguas de riego de Aragón constituyen los primeros realizados en España.

mucho más sencillo, económico y rápido (72 horas frente a 10 días) que la metodología convencional (Palacio-Bielsa y col., 2006 a) (Foto 3).

Se ha observado que el perfil bioquímico y fisiológico de las cepas de *Dickeya* spp. de aguas de riego en Aragón es bastante homogéneo. Todas las cepas pertenecen al biovar 3 del antiguo sistema de clasificación de *E. chrysanthemi* (Samson y col., 1987; Ngwira y Samson, 1990).

Análisis serológicos

Algunas de las cepas no son reconocidas por los diversos anticuerpos comerciales disponibles para el análisis

serológico mediante las técnicas *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e inmunofluorescencia (IF). Los resultados muestran la existencia de la heterogeneidad a nivel serológico del género *Dickeya*, lo que supone una limitación del uso de estas técnicas para su detección e identificación en laboratorio.

Trabajos realizados en diversos países señalan que estas bacterias están presentes en aguas de riego, encontrando una relación entre el uso de aguas contaminadas y la incidencia de infecciones en los cultivos

Análisis genéticos

La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido obtener un fragmento de ADN del tamaño esperado (Nassar y col., 1996). Además, la secuenciación del ADN ribosómico 16S muestra que algunas de las cepas estudiadas presentan una homología de secuencia del 98% con la cepas tipo de la especie *Dickeya zaeae*, mientras que otros aislados muestran una homología del 99% con *D. dadantii*.

Aunque el ADNr 16S no permite discriminar claramente las distintas especies del género, las características bioquímicas de las cepas de Aragón también coincidirían con las descritas para las nuevas especies *D. zaeae* y *D. dadantii* (Samson y col., 2005).

Como ya hemos señalado, la diferenciación de especies del género *Dicke-*



FOTO 3. Identificación de biovares de cepas de *Dickeya* spp. mediante el sistema de microplacas. Izquierda, medios base antes de la inoculación. Derecha, reacciones obtenidas a las 72 horas de la inoculación. 2-7: distintos aislados; 8: cepa de referencia CFBP 2288 (biovar 1); 9: cepa de referencia CFBP 2015 (biovar 7); 10: control negativo (agua); A: D (-) arabinosa; B: manitol; C: melibiosa; D: rafinosa; E: D(-) tartrato; F: 5-cetogluconato; G: inulina.

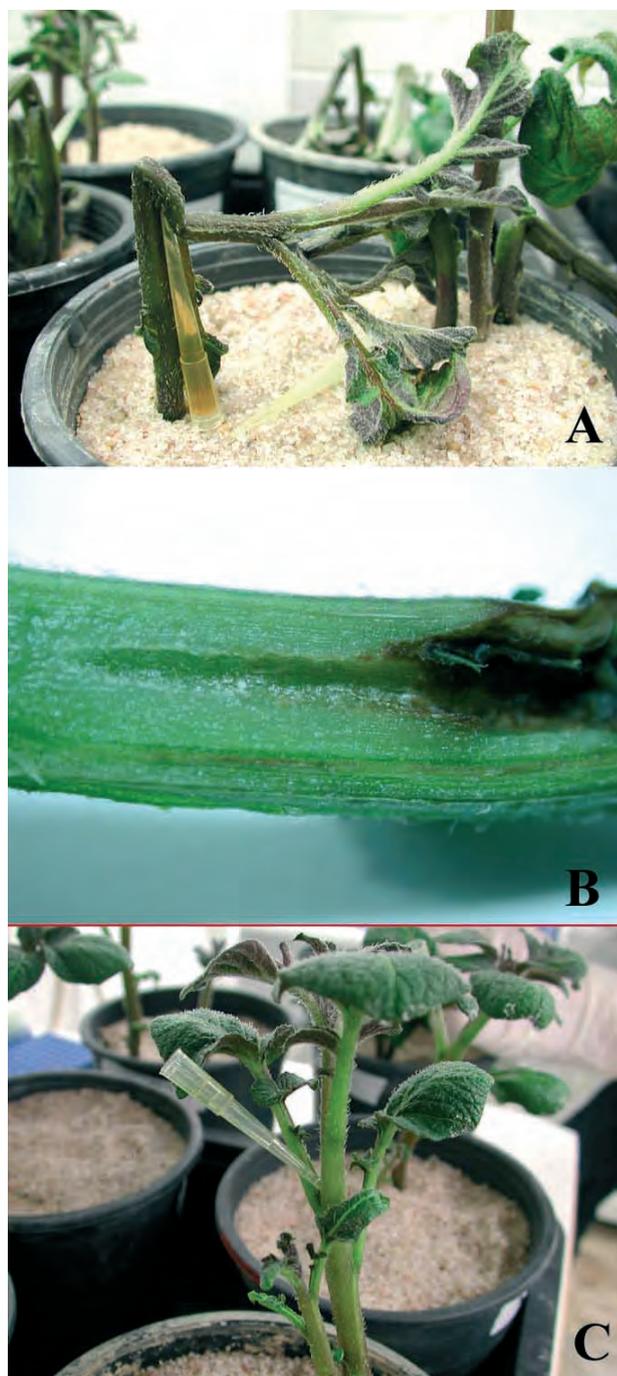


FOTO 4. Sintomas en plantas de patata inoculadas con cepas de agua de *Dickeya* spp.:

A) Sintomas severos de podredumbre blanda del tallo (colapso).

B) Sintomas leves (médula hueca entorno al punto de inoculación).

C) Testigo negativo (agua).

ya todavía está poco estudiada, por ello se está llevando a cabo la clonación y secuenciación de diversos genes *housekeeping* de las cepas obtenidas en Aragón, con el fin de realizar análisis taxonómicos. Los resultados de estos novedosos trabajos podrían aportar nuevas herramientas para la

caracterización de las especies de este nuevo género.

Pruebas de patogenicidad

Se ha confirmado que todas las cepas de *Dickeya* spp. aisladas de aguas de riego en Aragón son patógenas en pata-

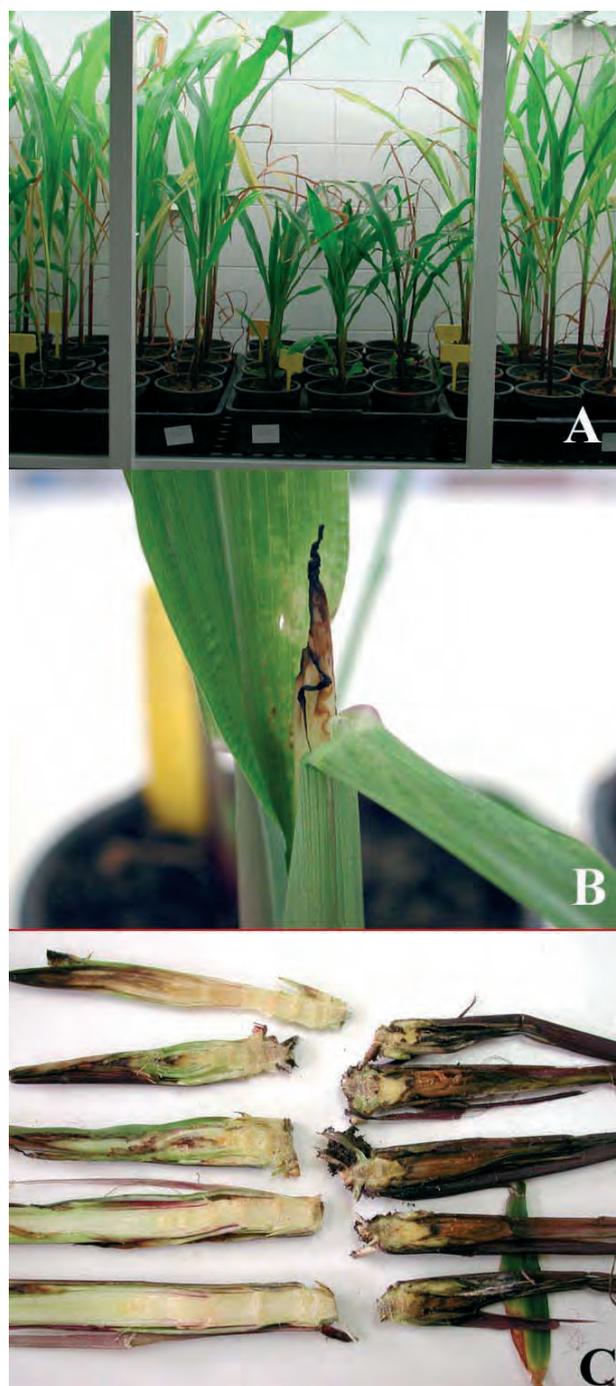


FOTO 5. Sintomas en plantas de maíz inoculadas con cepas de agua de *Dickeya* spp.:

A) Menor crecimiento de las plantas infectadas, frente a testigos negativos (agua) de tamaño normal.

B) Detalle de podredumbre apical del tallo.

C) Sintomas internos de podredumbre: síntomas más leves o más severos inducidos distintas cepas.

ta y, prácticamente todas, también en maíz (**Fotos 4 y 5**). El poder patógeno de las cepas no está relacionado con la fuente de agua de la que proceden. Tampoco se ha encontrado una correlación entre el poder patógeno, o la intensidad de los síntomas inducidos, y las diferencias en sus perfiles bioquímicos,

o en los resultados obtenidos en los análisis serológicos y moleculares, mediante PCR.

Posibles métodos de control de las infecciones en maíz

Diversos autores han descrito la eficacia de la cloración del agua para el control de la bacteria en riego por aspersión (Kelman y col., 1957; Hope y Kelman, 1969). Sin embargo, debido a la demanda de cloro del agua, no todo el cloro añadido tiene efecto bactericida. Hay diversos factores interrelacionados que también afectan a la cloración, como son la temperatura y el tiempo de contacto (Babbitt y col., 1962).

Para evaluar la eficacia de distintas dosis de cloro en el control de las infecciones, hemos realizado ensayos de inoculación artificial en condiciones ambientales controladas. Los resultados iniciales sugieren que una concentración de 1 ppm de cloro libre añadida al agua sería suficiente para el control de las infecciones de *Dickeya* en riego por aspersión, lo que coincide con las indicaciones de Thompson (1965).

La aplicación de lejía comercial podría resultar un método eficaz, económico y de sencilla aplicación para el control de las infecciones. La lejía se añadiría al agua en la línea de transmisión del sistema de riego por aspersión. Sin embargo, para determinar la concentración de cloro adecuada para el control de la enfermedad, se debería realizar medidas del cloro libre en distintos ensayos de campo.

Conclusiones

No podemos concluir de manera definitiva si las cepas de agua de *Dickeya* spp. corresponden a poblaciones naturales o proceden de fuentes de inóculo externas relacionadas con la propia actividad agrícola

Sin embargo, la identificación de cepas procedentes de aguas de riego con un perfil bioquímico distinto al de aquellas obtenidas de plantas huéspedes, así como la existencia de otras cepas no patógenas en algunos de estos huéspedes, apoyarían la idea de que, al menos algunas de estas cepas, pudieran constituir variantes bioquímicas adaptadas a un ambiente acuático (Cothier y Gilbert, 1992)

La secuenciación del ADNr 16S mues-

Se ha confirmado que todas las cepas de *Dickeya* spp. aisladas de aguas de riego en Aragón son patógenas en patata y, prácticamente todas, también en maíz

tra la existencia de secuencias idénticas entre aquellas cepas procedentes de plantas de un campo de maíz infectado y las obtenidas en dos fuentes de agua utilizadas para su riego

Independientemente del origen de las cepas patógenas, su capacidad de sobrevivir en el agua y ser dispersados a largas distancias supone un riesgo potencial de infección para diversos cultivos con importancia económica en la Comunidad Autónoma de Aragón

Dado que la dinámica poblacional de las bacterias fitopatógenas está determinada por numerosos factores ambientales, incluido el estado fenológico de la planta huésped, se deberán realizar estudios epidemiológicos que incluyan análisis cuantitativos de las poblaciones bacterianas en distintas épocas del año y en años sucesivos

Parte de los estudios descritos se incluyen en un Proyecto Fin de Carrera de la Escuela Universitaria Politécnica de La Almunia de Doña Godina (EUPLA) dirigido por la Línea de Bacteriología Vegetal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y el Centro de Protección Vegetal (CPV). Dicho Proyecto ha recibido el Primer Premio de Ingeniería Agrícola del año académico 2006-2007.

Bibliografía

Babbitt, H.E., Doland J.J., Cleasby, J.L., 1962. Water Supply Engineering. McGraw Hill Book Co., Ed. 6 pp. 528-554.

Bezoz Camps, R., 2006. Caracterización de *Erwinia* spp. de diversos orígenes aisladas en Aragón. Proyecto Fin Carrera Ingeniería Agrícola (A.204.27). Escuela Universitaria Politécnica de La Almunia de Doña Godina (EUPLA), Zaragoza.

Cothier, E.J., Gilbert, R.L., 1990. Presence of *Erwinia chrysanthemi* in two major river systems and their alpine sources in Australia. Journal of Applied Bacteriology 69: 729-738.

Hartman, J.R., Kelman, A., 1973. An improved method for the inoculation of

corn with *Erwinia* sp. Phytopathology 63: 658-663.

Kelman, A., Person, L.H., Hebert, T.T., 1957. Bacterial stalk rot of irrigated corn in North Carolina. Plant Disease Reporter 41: 789-802.

Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R., Bertheau, Y., 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. Applied and Environmental Microbiology 62: 2228-2235.

Ngwira, N., Samson, R., 1990. *Erwinia chrysanthemi*: description of two new biovars (bv 8 and bv 9) isolated from kalamanchoe and maize plants. Agronomie 10: 341-345.

Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A., López, M.M., 2006 a. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. Annals of Applied Biology 148: 157-164.

Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A., 2006 b. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Dickeya* spp. (ex *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium chrysanthemi*) en aguas de riego de la Comunidad Autónoma de Aragón. Boletín SEF 55: 4-8.

Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A., López, M.M., 2007. First report of bacterial soft rot on onion caused by *Dickeya* spp. (ex *Pectobacterium chrysanthemi*) in Spain. Plant Pathology 56: 722.

Samson, R., Poutier, F., Saily, M., Jouan, B., 1987. Caractérisation des *Erwinia chrysanthemi* isolées de *Solanum tuberosum* et d'autres plantes-hôtes selon les biovars et sérogroupes. OEPP Bulletin 17: 11-16.

Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., Gardan, L., 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1415-1427.

Thompson, D.L., 1965. Control of bacterial stalk rot of corn by chlorination of water in sprinkler irrigation. Crop Science 5: 369-370. •