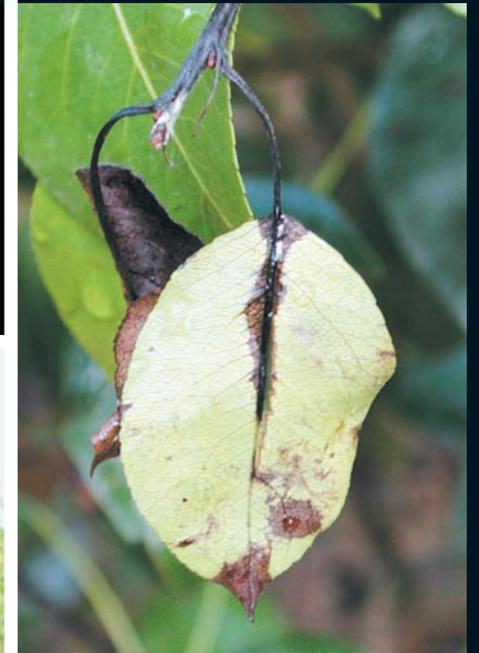


El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*)

El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*)



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

El fuego bacteriano de las rosáceas (*Erwinia amylovora*)

Coordinadores Científicos

Ana Palacio-Bielsa

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)
Gobierno de Aragón

Miguel A. Cambra Álvarez

Centro de Protección Vegetal (CPV). Gobierno de Aragón



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

Autores: Ana Palacio-Bielsa, Miguel A. Cambra, María Milagros López, Mónica Ordax, Javier Peñalver, María Teresa Gorris, Mariano Cambra, Ester Marco-Noales, Pablo Llop, Elena G. Biosca, Montserrat Roselló, Emilio Montesinos, Isidre Llorente, Esther Badosa, Jordi Cabrefiga, Anna Bonaterra, Lidia Ruz, Concepció Moragrega, Jesús Francés y Carmen Díaz.

Fotografías: Miguel A. Cambra, Edson Bertolini, Victoria Donat, Mónica Ordax, Pablo Llop, Ester Marco-Noales, Montserrat Roselló, Elisa Baroja, María Felisa Ezquerro, Cristina Gil-Albarellos y Silvia Rubio.

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO

Secretaría General Técnica: Alicia Camacho García. **Subdirección General de Información al Ciudadano, Documentación y Publicaciones:** José Abellán Gómez. **Director del Centro de Publicaciones:** Juan Carlos Palacios López. **Jefa del Servicio de Producción y Edición:** M.^a Dolores López Hernández.

Edita

© Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Distribución y venta:

P^o de la Infanta Isabel, 1
Teléfono: 91 347 55 41
Fax: 91 347 57 22

Maquetación, impresión y encuadernación:

V.A. Impresores, S.A.

Plaza San Juan de la Cruz, s/n

Teléfono: 91 597 61 87

Fax: 91 597 61 86

NIPO: 770-09-347-7

ISBN: 978-84-491-0962-1

Depósito Legal: M-53910-2009

Catálogo General de Publicaciones Oficiales:

<http://www.060.es>

(servicios en línea/oficina virtual/Publicaciones)

Tienda virtual: www.marm.es

centropublicaciones@marm.es

Datos técnicos: Formato: 17 x 24 cm. Caja de texto: 13,8 x 20 cm. Composición: una columna. Tipografía: Times New Roman a cuerpos 10,5 y 11,5. Papel: Interior en estucado con certificación FSC (Material de Crédito) de 115 g. Cubierta en Symbol Card de 300 g, con certificación FSC (Material de Crédito). Tintas: 4/4. Encuadernación: Rústica, cosido con hilo vegetal.

El certificado FSC (Forest Stewardship Council) asegura que la fibra virgen utilizada en la fabricación de este papel procede de masas certificadas con las máximas garantías de una gestión forestal social y ambientalmente responsable y de otras fuentes controladas. Consumiendo papel FSC promovemos la conservación de los bosques del planeta y su uso responsable.



ÍNDICE GENERAL

Pag.

AUTORES

PRÓLOGO

NOTA de los Coordinadores Científicos

CAPÍTULO 1. EL FUEGO BACTERIANO: LA ENFERMEDAD	13
1.1. Introducción	13
1.2. Distribución mundial	14
1.3. Importancia económica	15
1.4. Rango de huéspedes	16
1.5. Síntomas de la enfermedad	16
1.5.1. Descripción de los síntomas	17
1.5.2. Síntomas confundibles con los de fuego bacteriano	41
1.6. Epidemiología de la enfermedad	42
1.6.1. Diseminación de <i>Erwinia amylovora</i>	42
1.6.2. Factores condicionantes de la enfermedad	43
1.6.3. Sensibilidad y receptividad de la planta	44
1.6.4. Cantidad de inóculo	46
1.6.5. Factores climáticos	46
1.7. Ciclo del fuego bacteriano	47
1.7.1. Inóculo primario-infección primaria	47
1.7.2. Inóculo secundario-infecciones secundarias	48
CAPÍTULO 2. <i>Erwinia amylovora</i> : CARACTERÍSTICAS GENERALES. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD E IDENTIFICACIÓN DE <i>E. amylovora</i>	53
2.1. Características de <i>Erwinia amylovora</i>	53
2.1.1. Breve descripción taxonómica	53
2.1.2. Características fenotípicas	53
2.1.3. Características moleculares	54
2.2. Diagnóstico del fuego bacteriano e identificación de <i>E. amylovora</i>	56
2.2.1. Introducción	56
2.2.2. Diagnóstico del fuego bacteriano: plantas con síntomas	57
2.2.2.1. Aislamiento	57
2.2.2.2. Técnicas serológicas	59
2.2.2.3. Técnicas moleculares	60
2.2.3. Detección de <i>E. amylovora</i> : plantas asintomáticas	62
2.2.4. Identificación de <i>E. amylovora</i>	63
2.2.5. Protocolos de diagnóstico	65
CAPÍTULO 3. SISTEMAS DE PREDICCIÓN Y MÉTODOS DE CONTROL DEL FUEGO BACTERIANO	75
3.1. Sistemas de predicción	75
3.1.1. Introducción	75
3.1.2. Modelo Maryblyt	77
3.1.3. Modelo Cougarblight	79
3.2. Métodos de control	80
3.2.1. Medidas preventivas	80

	<u>Pag.</u>
3.2.2. Medidas de convivencia	81
3.2.2.1. Control químico	81
3.2.2.2. Lucha biológica	84
3.2.2.3. Lucha biotécnica	85
3.2.2.4. Termoterapia	85
3.2.2.5. Variedades transgénicas	85
3.2.2.6. Medidas agronómicas	86
CAPÍTULO 4. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL FUEGO BACTERIANO	91
4.1. Medidas preventivas contra la introducción o difusión de <i>E. amylovora</i> a través de vegetales	92
4.2. Medidas a adoptar en caso de introducción de <i>E. amylovora</i>	93
4.3. Legislación de las Comunidades Autónomas	94
4.3.1. Aragón	94
4.3.2. Castilla y León	94
4.3.3. Cataluña	95
4.3.4. La Rioja	95
4.3.5. Navarra	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Distribución mundial del fuego bacteriano	14
Tabla 1.2. Géneros de rosáceas huéspedes de fuego bacteriano contemplados en la legislación de la Unión Europea	16
Tabla 1.3. Sensibilidad varietal de peral al fuego bacteriano	45
Tabla 1.4. Sensibilidad varietal de manzano al fuego bacteriano	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Factores condicionantes de la enfermedad	44
Figura 2.1. Diagrama de flujo que representa el protocolo de diagnóstico de <i>Erwinia amylovora</i> de acuerdo a la norma PM7/20 de la EPPO (EPPO, 2004) ...	66
Figura 3.1. Mapa de riesgo fenoclimático de fuego bacteriano obtenido mediante el modelo BIS95 en la zona nordeste de España	76
Figura 3.2. Riesgo de infección de fuego bacteriano determinado mediante el modelo Maryblyt en una finca de peral (Conferencia) en Mas Badia (Gerona) durante los años 2006 y 2007	79
Figura 3.3. Eficacia de la lucha química mediante diversos productos antimicrobianos en ensayos de campo, realizados mediante inoculación artificial de <i>E. amylovora</i> o inóculo natural	83
Figura 3.4. Tratamientos de control químico durante el ciclo del fuego bacteriano en un frutal de pepita típico	84
Figura 4.1. Legislación relacionada con <i>E. amylovora</i>	91

ÍNDICE DE FOTOS

	<u>Pag.</u>
Lámina 1. Órganos más sensibles	19
Lámina 2. Síntomas en flores	20
Lámina 3. Cayados de pastor	21
Lámina 4. Síntomas en brotes de manzano	22
Lámina 5. Síntomas en brotes de peral	23
Lámina 6. Síntomas en hojas	24
Lámina 7. Manchas necróticas en hojas	25
Lámina 8. Infecciones sistémicas en hojas	26
Lámina 9. Síntomas en fruto (peral, var. Blanquilla)	27
Lámina 10. Síntomas en fruto (peral, var. Conferencia)	28
Lámina 11. Caída de frutos y síntomas internos	29
Lámina 12. Chancros en ramas y tronco	30
Lámina 13. Detalle del exterior e interior de un chancro	31
Lámina 14. Zona interna de avance de la enfermedad en brote y rama	32
Lámina 15. Coloración rojiza en el interior de ramas y troncos	33
Lámina 16. Exudados bacterianos en brotes	34
Lámina 17. Exudados bacterianos en flor, fruto y tronco	35
Lámina 18. Exudados en fruto de peral	36
Lámina 19. Síntomas confundibles producidos por insectos	37
Lámina 20. Síntomas confundibles producidos por <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	38
Lámina 21. Síntomas confundibles. Fitotoxicidad	39
Lámina 22. Síntomas confundibles. Chancros	40
Foto 2.1. Morfología de las colonias de <i>Erwinia amylovora</i> en diferentes medios de cultivo	58
Foto 2.2. Enriquecimiento de muestras previo a la realización de la técnica ELISA u otras	59
Foto 2.3. Amplificación de muestras de <i>Erwinia amylovora</i> mediante nested-PCR en un tubo	61
Foto 2.4. Sistemas miniaturizados que pueden emplearse para la identificación bioquímica de bacterias patógenas	64
Foto 2.5. Inoculaciones de <i>Erwinia amylovora</i> en níspero y pera inmaduros	65

AUTORES

Ana Palacio-Bielsa

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)
Gobierno de Aragón
Avda. Montañana, 930
50059 Zaragoza

Miguel A. Cambra

Centro de Protección Vegetal (CPV)
Gobierno de Aragón
Avda. Montañana, 930
50059 Zaragoza

María Milagros López

Mónica Ordax

Javier Peñalver

María Teresa Gorris

Mariano Cambra

Ester Marco-Noales

Pablo Llop

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

Elena G. Biosca

Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Valencia
C/ Doctor Moliner, 50
46100 Burjasot (Valencia)

Montserrat Roselló

Servicio de Sanidad Vegetal
Ctra. de Alicante-Valencia, km 276,5
46460 Silla (Valencia)

Emilio Montesinos

Isidre Llorente

Esther Badosa

Jordi Cabrefiga

Anna Bonaterra

Lidia Ruz

Concepció Moragrega

Jesús Francés

Instituto de Tecnología Agroalimentaria-XaRTA-CIDSAV
Universidad de Girona
Avda. Lluís Santaló, s/n
17071 Gerona

Carmen Díaz

Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria (MARM)
C/ Alfonso XII, 62
28014 Madrid

FOTOGRAFÍAS

Miguel A. Cambra

Centro de Protección Vegetal (CPV)
Gobierno de Aragón
Avda. Montañana, 930
50059 Zaragoza

Edson Bertolini**Victoria Donat****Mónica Ordax****Pablo Llop****Ester Marco-Noales**

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

Montserrat Roselló

Servicio de Sanidad Vegetal
Ctra. de Alicante-Valencia, km 276,5
46460 Silla (Valencia)

Elisa Baroja**María Felisa Ezquerro****Cristina Gil-Albarellos****Silvia Rubio**

Sección de Protección de Cultivos
Ctra. Mendavia-Logroño NA 134, km 88
26071 Logroño (La Rioja)

PRÓLOGO

La necesidad de obtener alimentos suficientes para una población creciente, y la progresiva apertura de fronteras, han conllevado por un lado, la intensificación de los sistemas productivos y, por otro lado, el establecimiento de sistemas de control cada vez mayores, aprovechando en todos los casos los avances tecnológicos, así como las orientaciones técnicas y de gestión más eficaces y sostenibles.

En este ámbito, la agricultura como actividad antropogénica fuente de alimentos adquiere un papel relevante en la incidencia sobre los intercambios comerciales, facilitando el movimiento de material vegetal desde cualquier parte del mundo y, por tanto, elevando el potencial riesgo fitosanitario. Además, la utilización de especies vegetales con carácter ornamental, unido a un contexto de liberalización de los mercados internacionales, acrecienta el riesgo de dispersión de plagas y enfermedades.

Un claro ejemplo de dicha dispersión de un organismo nocivo lo constituye el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*), que fue la primera enfermedad infecciosa de plantas en la que se demostró que el agente causal era una bacteria. El fuego bacteriano, descrito por primera vez a finales del siglo XVIII en Estados Unidos, fue extendiéndose hacia Canadá y, desde entonces, su dispersión ha alcanzado a especies vegetales localizadas en numerosos países de Oceanía, Europa, África y Asia. En España fue detectado en 1995, en Guipúzcoa (País Vasco) en una pequeña parcela de manzanos de sidra, apareciendo brotes de la enfermedad con posterioridad, en distintos hospedantes, en varias Comunidades Autónomas, principalmente, de la mitad norte peninsular. En la actualidad, todos los brotes detectados se encuentran o bien erradicados, o bien en proceso de erradicación.

Esta bacteria que afecta fundamentalmente a plantas de la familia de las rosáceas, tanto frutales como ornamentales y silvestres, causando graves perjuicios tanto en términos fitosanitarios como económicos, ha sido combatida con programas intensivos de erradicación. En este sentido, las autoridades españolas competentes en materia de Sanidad Vegetal han articulado oficialmente las actuaciones fitosanitarias a través del Real Decreto 1201/1999, de 9 de julio, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas, modificado por el Real Decreto 1512/2005, de 22 de diciembre. Asimismo, España está considerada en el ámbito territorial de la Unión Europea como “Zona Protegida” para el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) que implica una situación de protección superior en el mercado interno.

En este contexto, el statu quo de la enfermedad descrita en España y la experiencia adquirida de las medidas aplicadas, así como los avances en las técnicas de diagnóstico y detección, dan cumplida justificación a la edición del presente libro que constituirá una herramienta de gran utilidad, en primer lugar para conocer en toda su amplitud tanto a la bacteria *Erwinia amylovora* (agente causal) como a la enfermedad (sintomatología, epidemiología y ciclo), y en segundo lugar para la puesta al día de los métodos de diagnóstico e identificación, así como de los sistemas de predicción y de los métodos de control. Además, esta obra reco-

ge la normativa vigente señalando los aspectos más relevantes de las medidas preventivas y de erradicación previstas en ella.

Por todo ello, este libro será, sin duda, de gran ayuda no sólo para el personal técnico, tanto de campo como de laboratorios, implicado directamente en la lucha contra esta bacteria, sino también para los responsables de los distintos sectores que se pueden ver afectados por esta enfermedad. Asimismo, cabe resaltar la importancia que adquiere dentro del marco de la transferencia de conocimientos para el fomento de una agricultura sostenible.

En definitiva, no me resta más que felicitar a los autores por el esfuerzo y la labor desarrollada, así como animarles a continuar con su trabajo para abordar los nuevos retos en la divulgación de su especialidad.

JOSÉ MARÍA COBOS SUÁREZ
*Subdirector General Adjunto de Sanidad de la Producción Primaria
Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino*

NOTA DE LOS COORDINADORES CIENTÍFICOS

El fuego bacteriano de las rosáceas, causado por la bacteria *Erwinia amylovora*, afecta a especies de gran valor comercial, como peral, manzano, níspero, membrillero y diversas ornamentales y silvestres. Los efectos del fuego bacteriano pueden llegar a ser devastadores, ocasionando graves pérdidas. En casi todas las CC.AA. existen áreas frutícolas de gran interés económico a proteger. El sector viverista, tanto de frutales como de plantas ornamentales huéspedes de la enfermedad, también constituye una actividad de importancia en nuestro país. Asimismo, cabe destacar la presencia de especies huéspedes silvestres de alto valor ecológico en sierras y bosques que podrían verse afectadas, como *Crataegus azarolus*, *C. monogyna*, *Sorbus* spp., etc. Por tanto, la lucha contra la enfermedad atañe al conjunto del territorio nacional.

En el año 1987, cuando el fuego bacteriano todavía no se había detectado en España, ya se publicó un libro divulgativo sobre la enfermedad. Veinte años después se han producido cambios sustanciales. En 1993, con el ingreso de nuestro país en la UE y la desaparición de las fronteras comunitarias, entró en vigor la legislación europea. Desde el año 1995, fecha de la primera detección del fuego bacteriano en España, se vienen aplicando con éxito medidas de erradicación. Actualmente, la enfermedad no está implantada y España mantiene el estatus de Zona Protegida. Además, en los últimos años, las técnicas de diagnóstico y detección de *E. amylovora* han experimentado un avance considerable. Todas estas razones, hacen necesaria la publicación de este nuevo libro.

En la elaboración de esta monografía han participado numerosos autores, que han aportado sus conocimientos y experiencia sobre el fuego bacteriano. En los diferentes capítulos de que consta se presentan los aspectos fundamentales de la enfermedad en cuanto a su sintomatología, epidemiología, métodos de diagnóstico e identificación del agente causal, así como los sistemas de predicción y métodos de control disponibles en la actualidad. En la última parte, se expone la legislación relativa a las medidas de prevención y erradicación de esta grave bacteriosis.

Finalmente, deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos cuantos han hecho posible la realización de este libro, que pretende ser una guía para técnicos, fruticultores, viveristas y, en general, a quienes se ocupan del cultivo de las rosáceas y la protección fitosanitaria en nuestro país.

ANA PALACIO-BIELSA
MIGUEL A. CAMBRA ÁLVAREZ
Coordinadores Científicos

CAPÍTULO 1

EL FUEGO BACTERIANO: LA ENFERMEDAD

ANA PALACIO-BIELSA¹, MIGUEL A. CAMBRA²

1.1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del fuego bacteriano está causada por la bacteria *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, considerada como **organismo nocivo de cuarentena en la Unión Europea**, para la que existe legislación específica sobre medidas preventivas contra la introducción y difusión (RD 58/2005), así como un programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas (RD 1201/1999 y RD 1512/2005).

Esta enfermedad afecta fundamentalmente a plantas de la familia de las rosáceas, en la que se incluyen frutales de pepita y diversas especies ornamentales o silvestres de gran interés económico (López *et al.*, 1987, 1996; van der Zwet y Beer, 1995; López y Montesinos, 1996; Montesinos y López, 2000; Beer, 2002).

El fuego bacteriano fue descrito por primera vez en 1780 y ocupa un lugar especial en la historia de la Fitopatología, ya que fue la primera enfermedad infecciosa de plantas en la que se demostró que el agente causal era una bacteria (Burrill, 1883; Winslow *et al.*, 1920). Además, *E. amylovora* fue la primera bacteria fitopatógena en la que se demostró su diseminación mediante insectos.

En la actualidad, tanto agricultores como científicos coinciden en considerar el fuego bacteriano como una enfermedad única por varias razones:

- Sus efectos devastadores con un elevado impacto económico.
- Su rápida migración en la planta, siendo capaz de destruir árboles de variedades sensibles en un período vegetativo.
- Su gran capacidad de diseminación por distintos medios y de sobrevivir en los tejidos de las plantas hospedadoras.
- Su limitado rango de huéspedes.
- Aunque ha sido una de las enfermedades bacterianas más estudiadas no se conocen métodos eficaces de lucha frente a la misma.

En España se han detectado diversos focos de fuego bacteriano desde 1995 en distintos hospedadores y en varias Comunidades Autónomas, donde se han aplicado programas intensivos de erradicación. **Actualmente, tras las actuaciones de erradicación efectuadas en los focos identificados, la enfermedad no está implantada en España.**

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA-Gobierno de Aragón), Zaragoza.

² Centro de Protección Vegetal (Gobierno de Aragón), Zaragoza.

1. 3. IMPORTANCIA ECONÓMICA

El fuego bacteriano es una **enfermedad de importancia económica** por diversas razones:

- **Afecta a especies de gran interés comercial**, como peral, manzano, níspero, membrillero y diversas especies ornamentales.
- **Es altamente contagiosa** y por tanto de rápida expansión.
- **No existen métodos de control eficaces.**

Está considerada como la enfermedad más devastadora de frutales de pepita en algunos países de Europa y Norteamérica y es **extremadamente peligrosa para el cultivo de peral y manzano**. Si se dan las condiciones climáticas favorables, y las especies son muy sensibles, la producción se reduce considerablemente y en algunos casos puede llegar a ser prácticamente nula. El fuego bacteriano no es sólo destructivo para la cosecha del año en curso, sino también para las propias plantas. La muerte de yemas de flor, ramas y árboles enteros de variedades sensibles en pocos meses puede comprometer también la producción en años posteriores. Como ejemplo cabe citar que tras una explosión de fuego bacteriano en Egipto en el período 1982-1984 en peral de la variedad Le Conte, en 1985 se registraron pérdidas en las cosechas cercanas al 95% (van der Zwet y Beer, 1995).

Los daños económicos están ligados a la **rápida expansión** de la enfermedad. Así, en Francia se detectó en 1972 en la zona norte del país, a partir de 1978 en el sureste, a 1.200 km de los primeros focos, y después, progresivamente, en la mayoría del territorio (Paulin, 1999). En Italia, la producción de peral está concentrada en la región de Emilia-Romagna (noreste de Italia) y la estructura varietal está dominada por material muy sensible. Ello ha llevado a una rápida evolución de la enfermedad desde su detección: cinco focos declarados en 1994, diez en 1995, 30 en 1996, 721 en 1997 (con más de 24.000 ha de peral severamente dañados) y 888 focos en 1998 (500.000 árboles destruidos por el fuego bacteriano) (Calzolari *et al.*, 1999).

La muerte progresiva de los árboles de variedades sensibles afecta a la producción, **modificando la estructura varietal del sector frutícola e incrementando los costes de producción**. En algunas zonas de Estados Unidos y Europa, el cultivo del peral ha sido abandonado a causa de esta enfermedad. En Francia, la producción de pera y manzana, obligada a convivir con la enfermedad, ha tenido que sufrir una reconversión varietal, llegando incluso a la desaparición del cultivo del peral en las zonas más afectadas. Actualmente la legislación francesa prohíbe la plantación, multiplicación y comercialización de las siguientes especies y cultivares, debido a su alta sensibilidad al fuego bacteriano: cinco variedades de peral (Bronstar, Passe Crassane, Laxton's Superb, Durondeau, Madame Ballet), dos variedades de peral Nashi (Kumoi y Nijisseiki), dos de manzano de mesa (Abbondanza y James Grieve), cinco de manzano de sidra, todas las especies y cultivares de *Crataegus* y distintas variedades de *Cotoneaster* y *Pyracantha* (Arrêté du 12 Août 1994). Independientemente de la prohibición, la sola presencia de la enfermedad ha impuesto una selección entre las variedades cultivadas, ya que en la mayoría de las regiones francesas no es posible una producción comercial normal y prolongada de aquellas plantas especialmente sensibles (Paulin, 1999).

Resulta difícil obtener cifras exactas de las pérdidas económicas causadas anualmente por el fuego bacteriano en cada región, pero no cabe duda de que son muy elevadas (van der Zwet y Keil, 1979). Además de las mermas directas en la cosecha, hay que incluir los costes asociados a la adopción de medidas de control de la enfermedad (tratamientos, vigilancia intensiva, análisis, podas, etc.) y la obligada modificación de la estructura varietal del sector frutícola, incrementando así los costes de producción. El fuego bacteriano también tiene

consecuencias negativas para el **sector viverista**, puesto que no sólo es un problema asociado a la producción sino que la prohibición de exportación a países libres de la enfermedad origina además pérdidas económicas indirectas (Hale *et al.*, 1996).

La exportación de **frutos** también puede verse afectada, ya que existen países libres de fuego bacteriano, como Japón y Australia, que imponen enormes restricciones a la importación de frutos procedentes de países en los que la enfermedad está presente, como EE.UU. y Nueva Zelanda.

1.4. RANGO DE HUÉSPEDES

El fuego bacteriano se ha descrito en alrededor de 200 especies de plantas de 40 géneros, todos ellos pertenecientes a la **familia Rosaceae** (van der Zwet y Keil, 1979), aunque muchas de estas citas se basan únicamente en inoculaciones artificiales y no se han detectado infecciones naturales.

La familia *Rosaceae* se divide en cuatro subfamilias según el tipo de fruto que producen: *Spiraeoideae*, *Rosoideae*, *Amygdaloideae* (*Prunoideae*) y *Maloideae* (*Pomoideae*). Los géneros afectados por *E. amylovora* corresponden fundamentalmente a la **subfamilia Maloideae (Pomoideae)**, donde se incluyen frutales de pepita (peral, manzano y membrillero), el níspero y diversas especies ornamentales o silvestres (*Crataegus*, *Cotoneaster*, *Pyracantha*, *Sorbus*, etc.).

Dentro de la subfamilia *Rosoideae*, *E. amylovora* se ha descrito en frambueso (*Rubus idaeus*) (Starr *et al.*, 1951), pero estas cepas de *E. amylovora* no son patógenas en peral o manzano (Starr *et al.*, 1951; Heimann y Worf, 1985). En la subfamilia *Amygdaloideae* (*Prunoideae*), la enfermedad sólo ha sido descrita en dos ocasiones en *Prunus salicina* (ciruelo japonés) en zonas de Estados Unidos con un elevado nivel de inóculo de *E. amylovora* (Rosen y Groves, 1928; Mohan y Thomson, 1996).

En la legislación de la Unión Europea únicamente están contemplados los 12 géneros considerados como los huéspedes más importantes y de mayor interés comercial (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Géneros de rosáceas huéspedes de fuego bacteriano contemplados en la legislación de la Unión Europea

ÁRBOLES FRUTALES	PLANTAS ORNAMENTALES Y SILVESTRES
<i>Eriobotrya</i> spp.	<i>Amelanchier</i> spp.
<i>Cydonia</i> spp.	<i>Chaenomeles</i> spp.
<i>Malus</i> spp.	<i>Crataegus</i> spp.
<i>Mespilus</i> spp.	<i>Cotoneaster</i> spp.
<i>Pyrus</i> spp.	<i>Photinia davidiana</i> (<i>Stranvaesia</i>)
	<i>Pyracantha</i> spp.
	<i>Sorbus</i> spp.

1.5. SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD

Los síntomas por sí solos no son suficientes para el diagnóstico del fuego bacteriano, aunque pueden ayudar al mismo y constituyen un elemento imprescindible para la realización de prospecciones a gran escala.

La legislación vigente obliga a comunicar la observación de síntomas sospechosos de la enfermedad y a confirmar oficialmente la existencia de *E. amylovora*, ya que se está considerado como un organismo nocivo de cuarentena. La comunicación debe realizarse en los Organismos Oficiales responsables de las distintas Comunidades Autónomas y la confirmación de la presencia de *E. amylovora* debe llevarse a cabo en Laboratorios Oficiales, mediante el análisis del material vegetal.

La infección de *E. amylovora* puede iniciarse en plantas de cualquier edad, incluso ya desde el vivero. Normalmente los primeros síntomas se presentan en primavera, durante la floración y brotación, y se localizan con frecuencia en la zona media o baja del árbol, tanto en la periferia como en el interior de la copa. Las flores, brotes y frutos jóvenes son los órganos más sensibles de la planta y donde se inician las infecciones (Lámina 1). Si las condiciones son favorables, la bacteria avanza de forma sistémica y la infección progresa a gran velocidad alcanzando las hojas, ramas secundarias y principales, el tronco e incluso las raíces. Dependiendo del momento de observación es posible apreciar unos u otros síntomas.

A excepción de pequeños detalles, los síntomas de fuego bacteriano son similares en todas las especies huéspedes. La especie hospedadora de *E. amylovora* que muestra la sintomatología más llamativa es el peral, cuyas flores, hojas, brotes y frutos toman un color negro o muy oscuro que confiere a las plantas afectadas un aspecto similar al quemado por el fuego cuando la enfermedad está muy avanzada, lo que dio lugar al nombre de “fuego bacteriano”. En manzano, níspero, *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Pyracantha* y otras rosáceas ornamentales o silvestres, los síntomas pueden ser menos espectaculares que en peral, ya que en estas especies la coloración del follaje afectado es parda o rojiza.

No todos los síntomas se observan necesariamente en una misma planta, ni son siempre específicos de fuego bacteriano. Las fases iniciales de la infección de *E. amylovora* pueden ser confundidas con los síntomas producidos por ataques de otros patógenos, plagas o diversas alteraciones fisiológicas.

1.5.1. DESCRIPCIÓN DE LOS SÍNTOMAS

Síntomas en flores. *E. amylovora* puede penetrar en las flores a través de aberturas naturales, incluyendo estigmas, anteras y estomas de los sépalos y nectarios, y se multiplica principalmente en el estigma (Rosen, 1935; Hildebrand, 1937). En las fases iniciales de la infección, las flores presentan un aspecto húmedo, posteriormente se marchitan, adquieren un color marrón o negro y mueren. En ocasiones pueden verse afectadas sólo una o varias flores de un corimbo, aunque finalmente se produce la muerte de todas las flores del mismo. Las flores necrosadas permanecen en el árbol. La bacteria se multiplica y la infección avanza hacia el pedúnculo floral, que también aparece ennegrecido, alcanzando finalmente las ramas (Lámina 2).

Síntomas en brotes. Las infecciones son posibles tanto en la brotación como en aquellas fases en las que tienen lugar la formación y crecimiento activo de brotes herbáceos (inicio del verano y otoño). Se puede apreciar un oscurecimiento de los brotes, que muestran una pérdida de rigidez y se curvan de una forma característica que se conoce como “cayado de pastor” (Láminas 3, 4 y 5). En los tejidos subepidérmicos de los brotes se pueden observar estrías de color pardo rojizo y aspecto húmedo en la zona de avance de la infección. En condiciones favorables los síntomas pueden avanzar en pocos días hasta 15-30 cm en el brote.

Síntomas en hojas. Las hojas pueden ser infectadas a partir del brote en el que están situadas o bien por penetración directa de la bacteria. El síntoma inicialmente visible puede ser un marchitamiento, que puede ir acompañado de manchas necróticas en los márgenes y en la

superficie de las hojas (Láminas 6 y 7). Como síntoma más específico también se puede observar una zona húmeda y oscura en la inserción del peciolo con el limbo que avanza por el nervio principal, indicando la infección sistémica de la hoja a través del peciolo (Lámina 8). Las lesiones del brote se van extendiendo y cuando *E. amylovora* ha alcanzado la base de una rama impide su nutrición, produciendo un rápido marchitamiento de todas las hojas del brote. No se produce defoliación y las hojas permanecen secas en el árbol.

Síntomas en frutos. Los frutos pueden verse afectados desde el comienzo de su formación hasta la madurez (Láminas 9 y 10). La bacteria penetra a través de las lenticelas o de heridas, especialmente lesiones producidas por granizo. Los frutos afectados presentan inicialmente un aspecto húmedo y más tarde se oscurecen produciéndose la necrosis. En el interior se observan zonas de aspecto vítreo o húmedo. Finalmente los frutos quedan momificados en el árbol o caen (Lámina 11).

Síntomas en ramas y tronco. Cada ciclo de infección suele finalizar con la formación de chancros, ya que éstos son una forma de supervivencia de *E. amylovora* cuando las condiciones ambientales no son favorables. Dado que los chancros se forman cuando la infección disminuye, pueden aparecer a finales de primavera, verano u otoño. Los chancros de fuego bacteriano son de tamaño variable, desde 3-8 mm en los brotes del año hasta 15-20 cm, o más, en ramas y troncos de los árboles (Lámina 12). El aspecto externo de los chancros no es muy característico, puesto que a veces sólo se observan zonas decoloradas o deprimidas en la corteza, que en ocasiones se agrieta delimitando así la zona afectada. Al levantar la corteza en la zona de un chancre se observan estrías de color pardo-rojizo y aspecto húmedo en el parénquima cortical. En dicho parénquima, la zona afectada puede presentar límites difusos, lo que indica que la bacteria está activa en la zona de avance de la infección. En cambio, los márgenes bien delimitados y agrietados indican que la planta ha aislado al patógeno, impidiendo así su progresión a los tejidos sanos (Láminas 13, 14 y 15).

Síntomas en cuello y raíces. Las infecciones de cuello y raíces no son las más frecuentes, pero cuando tienen lugar producen la muerte del árbol de forma rápida. Suelen observarse en patrones muy sensibles a *E. amylovora*. La bacteria puede llegar a través de las ramas al tronco y pasar a las raíces, o puede penetrar directamente en los patrones por distintos tipos de heridas. Los síntomas en cuello y raíces son análogos a los que aparecen en ramas y tronco, pudiendo observar los mismos tipos de chancros.

Exudados bacterianos. Un síntoma característico y peculiar de esta enfermedad es la capacidad de producir exudados bacterianos en cualquiera de los órganos afectados (flores, brotes, hojas, frutos, ramas y tronco). Los exudados se presentan en forma de gotas y/o filamentos mucilaginosos de color blanquecino o amarillento y están formados por gran número de células bacterianas protegidas por mucopolisacáridos. Constituyen una importantísima fuente de inóculo y facilitan enormemente la dispersión de la bacteria. Es más frecuente observar estos exudados cuando el grado de humedad es elevado, a primeras horas de la mañana o tras lluvias o tormentas. En ocasiones, la producción de exudados puede ser muy abundante, especialmente en los frutos inmaduros (Láminas 16, 17 y 18).

LÁMINA 1

Flores, brotes y frutos jóvenes son los órganos más sensibles y receptivos, y el lugar donde se inician las infecciones.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 2

Las flores infectadas están necróticas y permanecen en el árbol.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: S. Rubio, SPC-La Rioja



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 3

Cayados de pastor en brote de membrillero, Acerolo y *Cotoneaster*.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: E. Marco-Noales y M. Ordax, IVIA-Valencia



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 4

Síntomas en brotes de manzano.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 5

Los síntomas en brotes de peral adquieren un color negro u oscuro.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja

LÁMINA 6

Las hojas se marchitan y permanecen secas en el brote.



Fotografía: S. Rubio, SPC-La Rioja



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja

LÁMINA 7

Manchas necróticas en los márgenes y en la superficie de las hojas.



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja

LÁMINA 8

Síntomas característicos de infección sistémica de la hoja a través del peciolo. Fotos de peral y *Pyracantha*.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. Roselló, SSV-Valencia

LÁMINA 9

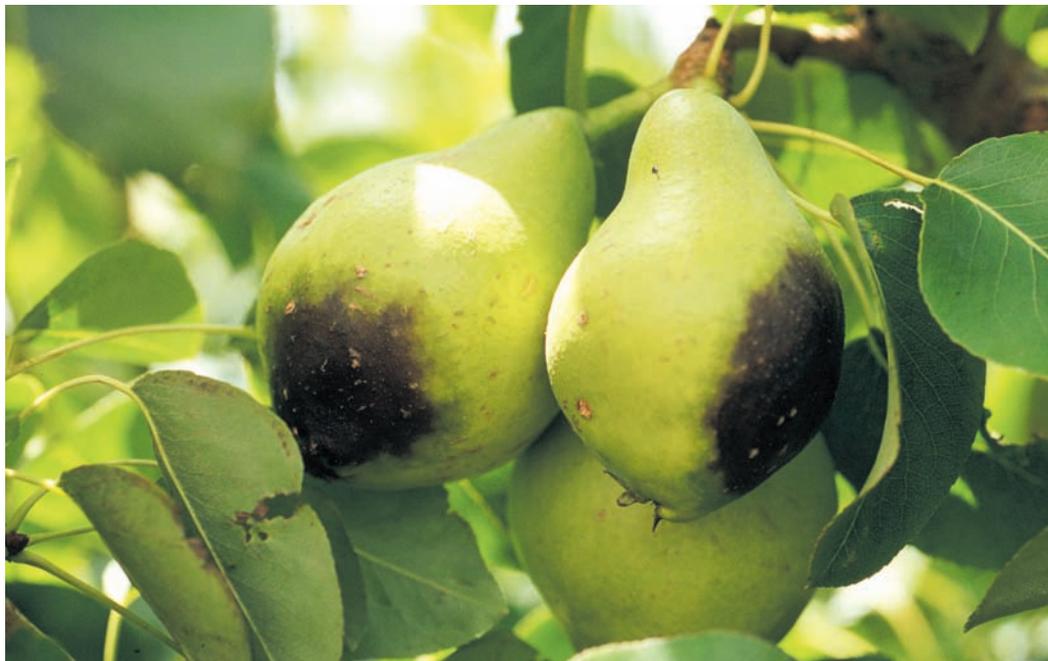
Los frutos pueden verse afectados desde su formación hasta la madurez. Síntomas en peral de la variedad Blanquilla.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 10

Síntomas en peras de la variedad Conferencia.



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja

LÁMINA 11

Los frutos permanecen momificados o caen. En el interior se observan zonas de aspecto aceitoso, vítreo o húmedo.



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja

LÁMINA 12

Chancros en ramas y tronco de peral.



Fotografía: S. Rubio, SPC-La Rioja



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 13

Detalles del exterior e interior de un chancro en una rama.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 14

Zona interna de avance de la enfermedad en brote y rama.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: E. Baroja y C. Gil-Albarellos, SPC-La Rioja

LÁMINA 15

Coloraciones rojizas en el interior de ramas y troncos (manzano y peral).



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: S. Rubio, SPC-La Rioja



Fotografía: S. Rubio, SPC-La Rioja

LÁMINA 16

Exudados bacterianos en brotes. Sólo son observables cuando existe una elevada humedad ambiental. Frecuentes con el rocío, en las primeras horas del día.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 17

Exudados bacterianos en flor, fruto y tronco de peral.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: F. Ezquerro, SPC-La Rioja

LÁMINA 18

Los exudados en los frutos en campo pueden ser espectaculares si las condiciones ambientales son muy favorables.



Fotografía: E. Marco-Noales y M. Ordax, IVIA-Valencia



Fotografía: E. Marco-Noales y M. Ordax, IVIA-Valencia

LÁMINA 19

Síntomas de “cayado de pastor” producidos por insectos.



Zeuzera pyrina penetra en los brotes por la inserción del peciolo con el brote desecándolo.

Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

Janus compressus realiza picaduras en espiral en la base de los brotes de peral donde realiza la puesta.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 20

Pseudomonas syringae pv. *syringae* es una bacteria que se asocia a heladas primaverales y produce necrosis de yemas, corimbos y frutos jóvenes.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 21

Los herbicidas aplicados en la fila de plantación pueden producir necrosis en hojas y brotes de las ramas bajas por deriva.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

Síntomas foliares de una fitotoxicidad.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

LÁMINA 22

Chancros producidos por otros patógenos o alteraciones fisiológicas que también pueden dar lugar a confusión.



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza



Fotografía: M. A. Cambra, CPV-Zaragoza

1.5.2. SÍNTOMAS CONFUNDIBLES CON LOS DE FUEGO BACTERIANO

Los síntomas de fuego bacteriano pueden ser fácilmente confundibles con los de enfermedades producidas por otras bacterias y hongos, por ataques de insectos, o por alteraciones fisiológicas (Láminas 19 a 22).

Bacterias

Pseudomonas syringae pv. *syringae* puede producir síntomas confundibles con fuego bacteriano y es frecuente en las áreas de cultivo españolas. En el caso de *Pseudomonas*, el ataque se limita a la necrosis de yemas, flores o brotes en primavera pero, a diferencia de *E. amylovora*, no avanza durante el verano y otoño (Lámina 20). Los síntomas suelen aparecer después de varios días con temperaturas próximas a 0°C (Balduque *et al.*, 1998).

Se han identificado otras bacterias fitopatógenas del género *Erwinia* que son poco conocidas, como *E. piriflorinigrans*, descrita recientemente sobre peral en Valencia y que sólo produce necrosis de los corimbos florales (Roselló *et al.*, 2002, 2006, 2008). En Corea se han descrito síntomas similares a los de *E. amylovora* causados por *E. pyrifoliae*, que afecta especialmente a variedades de peral asiático (Kim *et al.*, 1999, 2001). En Japón se han identificado síntomas conocidos como “bacterial shoot blight of pear” (BSBP), cuyo agente causal es otra bacteria del género *Erwinia* distinta de *E. amylovora* (Tanii *et al.*, 1981; Rhim *et al.*, 1999; Goto, 1992; Maxson-Stein *et al.*, 2003).

Hongos

Diversos hongos pueden producir chancros en tronco y ramas y, como consecuencia, secado de brotes y hojas. En frutales de pepita se producen infecciones de *Nectria* spp. en ramas (especialmente en regiones húmedas), y de *Phomopsis* spp. y *Phytophthora* spp. en la parte basal del tronco. En los chancros producidos por *Nectria* se pueden observar las fructificaciones del hongo. A diferencia de *E. amylovora*, las lesiones producidas por hongos suelen ser superficiales (al nivel de la corteza), con límites bien marcados y una coloración marrón en la zona subcortical (Lámina 22).

Insectos

Los ataques de algunos insectos pueden dar lugar a “cayados de pastor”. El himenóptero *Janus compressus* (“tuerce brotes”) afecta durante la primavera a brotes jóvenes de peral, generalmente aquellos situados en las zonas más altas del árbol. Si se observan con detenimiento, se aprecian las picaduras del insecto como pequeños puntos de color rojo o marrón oscuro que forman una espiral rodeando la base de la lesión (Lámina 19).

Las larvas del lepidóptero *Zeuzera pyrina* producen lesiones durante los meses de julio y agosto en brotes de manzano y peral. El secado del brote se produce desde el punto de inserción de una hoja, donde puede apreciarse una masa de excrementos (serrín) que cubre el orificio de entrada de la larva (Balduque *et al.*, 1998) (Lámina 19).

Alteraciones fisiológicas

El “atabacado” del peral de la variedad Conferencia se caracteriza por el secado de las hojas, que toman un color marrón oscuro fundamentalmente en sus bordes. Se observa en zonas áridas, en todos los árboles de una plantación, debido a la falta de humedad ambiental. Estos síntomas pueden confundirse en un primer momento con fuego bacteriano, o bien enmascarar aquellos realmente ocasionados por *E. amylovora*.

La carencia de boro, problemas de suelo y otros factores diversos también podrían inducir una sintomatología similar, dando lugar a confusión (Balduque *et al.*, 1996).

Los tratamientos herbicidas aplicados en la línea de plantación pueden producir efectos fitotóxicos por deriva en el tronco de plantas jóvenes, así como en los brotes y hojas más próximos al suelo (Lámina 21).

1.6. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

El conocimiento de la epidemiología de una enfermedad es esencial para conseguir un eficaz control de la misma. Ello tiene especial interés en el caso del fuego bacteriano, una enfermedad que produce graves daños, de difícil control y producida por una bacteria de fácil diseminación. Su conocimiento es básico, tanto para aplicar métodos que consigan reducir la incidencia y gravedad de los ataques en áreas donde la enfermedad ya está implantada, como para evitar su introducción o facilitar una erradicación precoz en aquellas en las que no existe una presencia generalizada de *E. amylovora*.

1.6.1. DISEMINACIÓN DE *Erwinia amylovora*

El fuego bacteriano es una de las enfermedades que históricamente ha mostrado mayor capacidad de diseminación a cortas y largas distancias, tanto mediante vectores bióticos como abióticos. La dispersión de *E. amylovora* a corta o media distancia (entre árboles y entre parcelas próximas) tiene lugar mediante lluvia, viento, insectos y con la maquinaria, herramientas y útiles de poda. A larga distancia, tiene lugar mediante el transporte de material vegetal infectado con o sin síntomas, y probablemente también por las aves migratorias. No obstante, la introducción de la enfermedad en numerosas zonas no siempre ha podido ser explicada basándose en la información existente, lo que sugiere que *E. amylovora* también podría ser diseminada por medios aún no identificados.

Lluvia. La lluvia juega un papel importante no sólo para las infecciones de flor a flor, sino también para el arrastre de las bacterias conservadas en los chancros y para la solubilidad de los exudados. Recientemente, se ha demostrado la supervivencia y mantenimiento del poder patógeno de *E. amylovora* en agua durante al menos seis meses, lo que apoya la idea de que el agua de riego también podría actuar como reservorio y vehículo de transmisión del patógeno (Biosca *et al.*, 2008).

Viento. En distintos países se ha observado la dispersión de *E. amylovora* en la dirección de los vientos dominantes y la reducción de las infecciones mediante el uso de cortavientos. El viento, especialmente si va acompañado de lluvia, también puede transportar las partículas de exudado y diseminar así la bacteria a cortas distancias. Además, los exudados bacterianos en forma de filamentos podrían ser transportados por las corrientes de elevada altitud, asegurando la diseminación de la bacteria a largas distancias (Paulin y Primault, 1993).

Insectos. Se han citado hasta 77 géneros de insectos asociados con la diseminación de *E. amylovora*, siendo probablemente los vectores más importantes del fuego bacteriano a cortas y medias distancias. Los primeros insectos descritos como vectores fueron los polinizadores, como las abejas. Estos insectos pueden explorar diariamente un área aproximada de 7 km² (Crane, 1984) y diseminar la bacteria entre flores, transportándola con el polen adherido a sus cuerpos y patas. Se ha constatado que la supervivencia de *E. amylovora* en el cuerpo de las abejas es de sólo 48 horas (Alexandrova *et al.*, 2002), pero puede ser de una a varias semanas en el polen, néctar y miel (Vanneste, 1996). Otros insectos que pueden constituir plagas o ser meros visitantes del cultivo, como la sila del peral, pulgones, cicadelas, dípteros, algunos insectos con aparato bucal masticador-chupador, etc., también pueden propagar la enfermedad al entrar en contacto con los exudados bacterianos. Durante su alimentación, estos insectos no sólo producen heridas que facilitan la entrada de la bacteria en los tejidos del huésped, sino que también pueden diseminar el patógeno desde un brote infectado a otro sano.

En todos los casos, para que el vector sea eficaz es necesario que pueda transmitir una elevada concentración de inóculo, estableciéndose una correlación directa entre el porcentaje de infección y la cantidad de bacterias inoculadas por el vector.

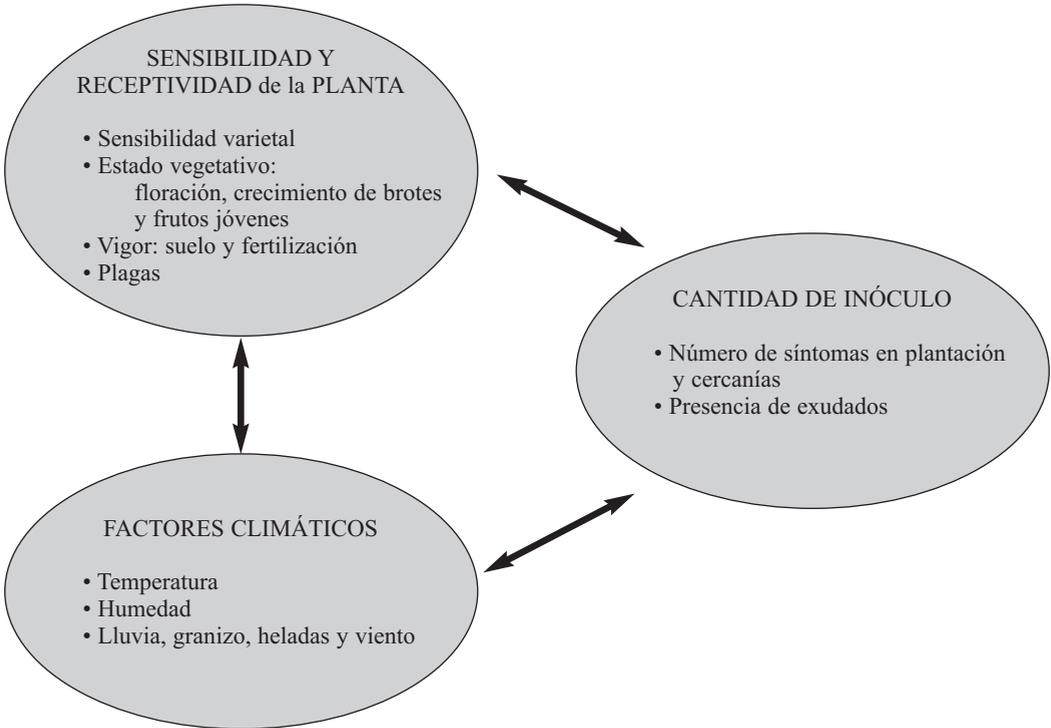
Labores en las plantaciones. El hombre puede transportar y diseminar *E. amylovora* mediante sus manos, ropas, maquinaria, útiles de cultivo o herramientas de poda. Durante las operaciones de poda, las herramientas quedarán contaminadas tras cortar una planta enferma, pudiendo infectar las plantas podadas a continuación tanto en una misma plantación como en parcelas distintas, especialmente si se realizan podas en verde (van der Zwet y Keil, 1979; Lecomte, 1990; Teviotdale *et al.*, 1991). La experiencia en España indica que es frecuente encontrar infecciones de *E. amylovora* en varias fincas de un mismo propietario o cultivador, donde se utilizan los mismos medios de producción (herramientas, maquinaria, etc.).

Pájaros. Algunas aves migratorias podrían ser responsables de la transmisión de *E. amylovora* a largas distancias, aunque ello no se ha podido demostrar científicamente. Sin embargo, es muy probable que cualquier pájaro que visite árboles infectados pudiera diseminar la bacteria a cortas distancias por toda su zona de vuelo, al transportar en sus patas los exudados bacterianos (Seidel *et al.*, 1994).

Material vegetal. El mayor riesgo de introducción de la enfermedad en una zona reside en la entrada de material vegetal portador de *E. amylovora* que no muestra síntomas, principalmente a través de material de vivero (Calzolari *et al.*, 1982; van der Zwet *et al.*, 1982; Maz-zucchi, 1992; López *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la bacteria puede estar presente en los tejidos de manera epífita (en la superficie) o endofita (en el interior) sin mostrar síntomas. La colonización de tejidos internos, en particular yemas en dormancia y los tejidos del xilema y floema, puede ser una forma de diseminación de *E. amylovora* con material de vivero asintomático. La comercialización de material vegetal de reproducción así contaminado es generalmente la vía de dispersión de *E. amylovora* a largas distancias y la forma de introducción en un área donde la enfermedad no es conocida.

1.6.2. FACTORES CONDICIONANTES DE LA ENFERMEDAD

La gravedad de los ataques de *E. amylovora* depende de distintos factores interrelacionados que condicionan el desarrollo de la enfermedad. Entre ellos, los más importantes son: la cantidad de inóculo disponible, todos los factores que condicionan la receptividad y sensibilidad de la planta huésped y las condiciones climáticas. Por ello, la gravedad de la enfermedad puede ser variable de unos lugares a otros y según los años.

Figura 1.1. Factores condicionantes de la enfermedad

1.6.3. SENSIBILIDAD Y RECEPTIVIDAD DE LA PLANTA

Sensibilidad varietal

Sólo algunas especies de rosáceas son sensibles a *E. amylovora*, y entre ellas existen marcadas diferencias entre variedades. La sensibilidad varietal, determinada por el genotipo de la planta, también está influenciada por distintos factores ambientales y de cultivo (Aldwinckle y Beer, 1978). Los datos de diferencias de sensibilidad pueden variar dependiendo de si proceden de infecciones naturales en campo o se trata de ensayos de inoculación artificial del patógeno, o atendiendo a los órganos afectados (flores, brotes, frutos inmaduros, etc.).

En general, las variedades de peral cultivadas en España son sensibles o muy sensibles, mientras que las variedades de manzano de mesa muestran una menor sensibilidad (Tablas 1.3 y 1.4). Las variedades de manzano de sidra son sensibles y de floración más tardía que las de peral y manzano de consumo en fresco (Paulin y Primault, 1993), por lo que su período de floración coincide con los períodos de fuerte riesgo de infección. Se sabe que algunas variedades autóctonas de manzana de sidra son muy sensibles, pero no se conoce bien la sensibilidad de todas las variedades cultivadas (Tabla 1.4).

Tabla 1.3. Sensibilidad varietal de peral al fuego bacteriano

PERAL			
Poco sensibles	Medianamente sensibles	Sensibles	Muy sensibles
Ercolini (Coscia) Magallón (Leonardeta) Roma	Buena Luisa de Avranches Mantecosa Bosc (Kaiser) Mantecosa Hardy Mantecosa Precoz Morettini General Leclerc Grand Champion Limonera (Dr. Jules Guyot) Santa María Morettini William's (Barlett)	Abate Fetel Agua de Aranjuez (Blanquilla) Conferencia Devoe	Alexandrine Douillard Decana del Comicio Packam's Triumph Passe Crassane

Tomado de Thibault y Le Lézec (1990); Zeller (1990); van der Zwet y Beer (1995).

Tabla 1.4. Sensibilidad varietal de manzano al fuego bacteriano

MANZANO DE MESA			
Poco sensibles	Medianamente sensibles	Sensibles	Muy sensibles
Early Red One Golden Delicious Golden Smoothie Lysgolden Mutsu Oregon Spur Ozak Gold Red Chief Reineta Blanca Royal Gala Starking Delicious Starkimson Topred	Gala Granny Smith Jonagold Reineta Gris	Belleza de Roma (Rome Beauty) Fuji Gloster Jonathan Melrose Verde Doncella	Idared Reina de Reinetas

MANZANO DE SIDRA			
Poco sensibles	Medianamente sensibles	Sensibles	Muy sensibles
Rouget de Dol Judor		Douce Coet Marie Ménard Bédan Peau de Chien	Avrolles Binet Rouge Clos Renaud Douce Mœn Locard vert

Tomado de Thibault y Le Lézec (1990); Paulin y Primault (1993); van der Zwet y Beer (1995).

En **plantas ornamentales y silvestres** existen diferencias de sensibilidad entre los géneros *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha*, *Sorbus* y *Photinia* (van der zwet y Beer, 1995). Entre las especies del género *Cotoneaster* son muy sensibles *C. dammeri*, *C. franchetii*, *C. horizon-*

talis, *C. microphyllus*, *C. salicifolius*, *C. simonsii*, etc. Todas las especies de *Crataegus* muestran una sensibilidad elevada, en especial *C. monogyna* y *C. oxyacantha*. Dentro del género *Phyracantha* son muy sensibles las especies o variedades *P. angustifolia*, *P. atalantioides* "Gibsi", *P. coccinea*, *P. coccinea* "Orange Glow", *P. crenulata*, etc. La especie *Sorbus aria* es mucho más sensible que *S. aucuparia*.

Receptividad de la planta

Independientemente de la sensibilidad propia del género, especie o variedad del vegetal, las fases más receptivas a la enfermedad durante el ciclo vegetativo son los períodos de floración y crecimiento vegetativo intenso. Los frutos jóvenes son también muy receptivos.

Es importante señalar que las floraciones secundarias de final de primavera y comienzo de verano y otoño son más receptivas a la infección que la floración principal, ya que las condiciones climáticas de temperatura y humedad de estas épocas favorecen la multiplicación de *E. amylovora*. Este aspecto debe tenerse en cuenta en determinadas regiones geográficas y en ciertas variedades de especies como el peral, con una marcada tendencia a producir estas floraciones secundarias.

En general, cuanto mayor es el vigor de la planta mayor es su receptividad a *E. amylovora*. Por tanto, todas las prácticas culturales que favorezcan el vigor y desarrollo de la planta favorecerán a la enfermedad y pueden incrementar los daños. El estado nutricional de la planta y los factores edáficos (tipos de suelo, contenido de agua y nutrientes) también influyen en la severidad de la enfermedad. El abonado nitrogenado se ha relacionado con la sensibilidad a la infección, y el abonado fosfórico, sólo o con nitrógeno, también parece favorecerla. Los suelos que facilitan una especial predisposición al desarrollo del fuego bacteriano son de tipo arcilloso, con mal drenaje y fertilizados en exceso (van der Zwet y Beer, 1995). En general, un desequilibrio nutricional tiende a incrementar la receptividad a la enfermedad en las variedades sensibles.

Determinadas plagas, como pulgones, chinches y la sila del peral tienden a alimentarse de los brotes más tiernos, que son los más receptivos a las infecciones de *E. amylovora* (Schroth *et al.*, 1974).

1.6.4. CANTIDAD DE INÓCULO

La cantidad de inóculo de la bacteria presente influye de forma decisiva en el desarrollo e intensidad de las infecciones. Se ha observado que el fuego bacteriano progresa más rápidamente cuanto más material enfermo existe en una plantación o en sus cercanías.

Todas las causas que favorezcan el aumento de inóculo incrementarán la intensidad de las infecciones de *E. amylovora*. Cuando se producen exudados en los órganos de las plantas enfermas se incrementa al máximo la cantidad de inóculo disponible. Con estos exudados salen al exterior gran cantidad de bacterias, facilitando enormemente su dispersión.

1.6.5. FACTORES CLIMÁTICOS

Las condiciones ambientales que más favorecen el desarrollo de la enfermedad son la temperatura y la humedad, puesto que afectan directamente al desarrollo del patógeno. Las condiciones óptimas para el desarrollo e infección de *E. amylovora* son de 18 °C a 29 °C, en presencia de elevada humedad relativa, lluvia o rocío (van der Zwet y Beer, 1995).

Entre los factores climáticos, algunos como las heladas pueden reducir el inóculo primario a niveles tales que no se produzcan infecciones. Se considera que las temperaturas límites para el desarrollo del fuego bacteriano son 18 °C como mínimo y 30 °C como máximo, con un óptimo alrededor de 22 °C a 25 °C. En floración son especialmente peligrosos los días con temperaturas superiores a 24 °C o 21 °C si la temperatura mínima supera los 12 °C. En áreas climáticas en las que rara vez se alcanzan los 18 °C en el período normal de floración, los daños más graves serán debidos a infecciones posteriores a esta floración principal, generalmente en las floraciones secundarias.

La humedad ambiental debe ser superior al 70% para que los ataques revistan importancia, situándose el óptimo para la infección en el 90-95%. Por ello, las lluvias juegan un importante papel, considerándose que un día con 2,5 mm de lluvia puede servir para el inicio de la infección. Además, el agua de lluvia o riego por aspersión favorecen la infección, al disminuir la concentración en azúcares de los nectarios florales (que en tiempo seco están excesivamente concentrados y dificultan el crecimiento bacteriano) y aumentar la humedad intercelular. En algunos casos, se ha observado una intensa multiplicación de *E. amylovora*, especialmente en los estigmas de las flores, sin que aparezcan síntomas. Ello parece suceder en zonas áridas, mientras que en condiciones de humedad relativa elevada la bacteria produce infecciones rápidamente, incluso antes de que la población epífita pueda ser detectada.

Cuando la lluvia va acompañada de granizo, los daños pueden verse aumentados por las numerosas heridas frescas producidas, que pueden servir de puerta de entrada para *E. amylovora* en distintos órganos de la planta. Las heridas foliares producidas por el viento también pueden actuar como nuevos puntos de infección.

1.7. CICLO DEL FUEGO BACTERIANO

El ciclo de la enfermedad ha sido descrito por diferentes autores (van der Zwet y Beer, 1995; Beer, 2002), pero todavía existen aspectos poco conocidos del mismo. El desarrollo del fuego bacteriano está estrechamente asociado con el desarrollo estacional de la planta huésped. Por tanto, se considera que el ciclo comienza en primavera con la producción del inóculo primario y la infección de las flores, continúa durante el verano con la infección de brotes y/o frutos, y termina a finales de verano o principios de otoño con la formación de chancros. El patógeno permanece latente durante el período de reposo vegetativo del huésped.

1.7.1. INÓCULO PRIMARIO-INFECCIÓN PRIMARIA

La primera infección del año o infección primaria se produce en primavera, cuando el patógeno invade las flores o brotes de la planta huésped. Se denomina inóculo primario a las células de *E. amylovora* que sirven para iniciar las primeras infecciones del período vegetativo. El origen de estas bacterias pueden ser los chancros del año anterior que se activan al comienzo de la primavera, y/o bacterias que permanecían como epífitas y/o endofitas en los tejidos de las plantas (van der Zwet *et al.*, 1988).

La principal fuente de inóculo primario la constituyen los chancros que se forman tardíamente en otoño, principalmente sobre el tronco o las ramas más viejas. El lugar de hibernación de *E. amylovora* no son los tejidos muertos del chancro, sino los adyacentes aparentemente sanos, normalmente no más allá de cinco centímetros de los bordes del margen

(Brooks, 1926; Rosen, 1929; Pierstorff, 1931; van der Zwet, 1969). A medida que la bacteria se multiplica, invade los tejidos sanos de la corteza, causa un daño adicional importante al árbol y constituye la fuente de inóculo para las infecciones primarias (Beer y Norelli, 1977). El inóculo producido por estos chancros puede formar gotas de exudado bacteriano visibles en la superficie de la corteza, o bien pasar inadvertido. Se ha descrito la detección de grandes cantidades de *E. amylovora* viable en la superficie de estos chancros en ausencia de exudados visibles.

E. amylovora puede permanecer durante largos períodos en la superficie o el interior de distintos tejidos vegetales aparentemente sanos sin mostrar síntomas (Rosen, 1929; Beer y Opgenorth, 1976; Keil y van der Zwet, 1972; van der Zwet *et al.*, 1988). La bacteria también puede sobrevivir de esta forma durante el invierno y desarrollar infecciones primarias mediante su progresión hacia órganos sanos. Ello podría explicar la aparición de focos de la enfermedad en plantaciones donde no se ha detectado la presencia de chancros de invierno.

En primavera, el inóculo primario procedente de la propia plantación afectada o de otras áreas es diseminado mediante los diversos vectores a corta o larga distancia. *E. amylovora* llega a las flores, frutos recién cuajados o brotes en crecimiento, donde puede comenzar la infección. Una vez allí, si la humedad es elevada, penetra en los tejidos a través de aberturas naturales (nectarios y estomas) o de heridas causadas por diversos agentes externos (granizo, picaduras de insectos, poda, etc.). Cuando las condiciones climáticas son favorables y el hospedador es receptivo, la bacteria se multiplica rápidamente y la infección avanza en sentido descendente, invadiendo los tejidos.

1.7.2. INÓCULO SECUNDARIO-INFECCIONES SECUNDARIAS

Una vez que ha tenido lugar la infección primaria y el patógeno ha avanzado a través de los tejidos se producen grandes cantidades de inóculo secundario, que será diseminado mediante los diversos agentes bióticos o abióticos descritos anteriormente, dando lugar a nuevas infecciones (infecciones secundarias). El inóculo secundario puede provenir de los exudados bacterianos producidos en brotes, hojas, frutos y ramas. Puede producirse en primavera, verano y otoño y habitualmente está asociado con una brotación o crecimiento tardío de los brotes (pulsación de crecimiento) y abundancia de lluvia.

Las infecciones secundarias son generalmente más numerosas que las primarias y suelen causar daños más graves en los árboles. Cuentan con un mayor número de órganos vegetales en los que se puede multiplicar el inóculo (los frutos inmaduros pueden producir una enorme cantidad de exudados), existen mayores posibilidades de diseminación de la bacteria (los insectos colaboran en la dispersión) y hay un mayor número de órganos susceptibles (floraciones secundarias, frutos inmaduros, brotaciones). Durante el período vegetativo pueden tener lugar varios ciclos (producción de inóculo-infección-formación de chancros) en función de que las condiciones ambientales sean favorables o desfavorables para la multiplicación de la bacteria.

En otoño, o en algunas situaciones desfavorables antes del mismo, la multiplicación de la bacteria disminuye o cesa y *E. amylovora* se instala en los tejidos lignificados, produciendo chancros en la corteza a modo de heridas acompañadas de necrosis del tejido. Durante el otoño, coincidiendo con el descenso de las temperaturas y la parada vegetativa del huésped, el crecimiento de la bacteria en los tejidos de las plantas se paraliza. Estos chancros permiten la supervivencia durante el invierno de una población de células viables del patógeno.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDWINCKLE, H.S., BEER, S.V. 1978. Fire blight and its control. *Horticultural Reviews*, 1: 423-474.
- ALEXANDROVA, M., PORRINI, C., BAZZI, C., CARPANA, E., BIGLIARDI, M., SABATINI, A.G. 2002. *Erwinia amylovora* longevity in beehives, beehive products and honeybees. *Acta Horticulturae*, 590: 201-205.
- BALDUQUE, R., CAMBRA, M.A., LOZANO, C. 1996. El fuego bacteriano de las Rosáceas (*Erwinia amylovora*). *Informaciones Técnicas, 1/1996*. Dirección General de Tecnología Agraria, Departamento de Agricultura, Gobierno de Aragón.
- BALDUQUE, R., CAMBRA, M.A., LOZANO, C. 1998. El fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*). Prevención y lucha. *Informaciones Técnicas, 1/1998*. Dirección General de Tecnología Agraria, Departamento de Agricultura, Gobierno de Aragón.
- BEER, S.V. 2002. Fire Blight: 61-63. En: *Compendium of Apple and Pear Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. ISBN: 0-89054-109-4.
- BEER, S.V., NORELLI, J.L. 1977. Fire blight epidemiology-factors affecting release of *Erwinia amylovora* by cankers. *Phytopathology*, 67: 1119-1125.
- BEER, S.V., OPGENORTH, D.C. 1976. *Erwinia amylovora* on fire blight canker surfaces and blossoms in relation to disease occurrence. *Phytopathology*, 66: 317-322.
- BIOSCA, E., 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.
- BROOKS, A.N. 1926. Studies of the epidemiology and control of fire blight of apple. *Phytopathology*, 16: 665-696.
- EPPO 2006. Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe. *Erwinia amylovora*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*.
- BONN, W.G., VAN DER ZWET, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight: 37-54. En: J.L. Vanneste (ed.). *Fire blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN: 0-85199-294-3.
- BUTRÓN, L. 1995. El fuego bacteriano. Una grave enfermedad para manzanos y perales. *Fruitel*, 10-11
- BURRIL, T.J. 1883. New species of *Micrococcus*. *American Naturalist*, 17: 319-320.
- CALZOLARI, A., FINELLI, F., MAZZOLI, G.L. 1999. A severe unforeseen outbreak of fire blight in the Emilia-Romagna region. *Acta Horticulturae*, 489: 171-176.
- CALZOLARI, A., PEDDES, P., MAZZUCHI, U., MORI, P., GARZENA, C. 1982. Occurrence of *Erwinia amylovora* in buds of asymptomatic apple plants in commerce. *Phytopathologische Zeitschrift*, 103: 156-162.
- CRANE, E. 1984. Bees, honey and pollen as indicators of metals in the environment. *Bee World*, 55: 47-49.
- GOTO, M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, CA, USA.

- HALE, C.N., TAYLOR, R.K., CLARK, R.G., BATCHELOR, T.A. 1996. Quarantine and market access. *Acta Horticulturae*, 411: 63-65.
- HEIMANN, M.F., WOLF, G.L. 1985. Fire blight of raspberry caused by *Erwinia amylovora* in Wisconsin. *Plant Disease*, 69: 360.
- HILDEBRAND, E.M. 1937. The blossom-blight phase of fire blight and methods of control. *Cornell University Agriculture Experiment Station Memoirs*, 207. Ithaca, New York, 40 pp.
- KEIL, H.L., VAN DER ZWET, T. 1972. Recovery of *Erwinia amylovora* from symptomless stems and shoots of Jonathan apple and Barlett pear trees. *Phytopathology*, 62: 39-42.
- KIM, W.S., GARDAN, L., RHIM, S.L., GEIDER, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 899-906.
- KIM, W.S., JOCK, S., RHIM, S.L., GEIDER, K. 2001. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease*, 85: 1183-1188.
- LECOMTE, P. 1990. Risk of fire blight infection associated with pruning of pear trees. *Acta Horticulturae*, 273: 83-89.
- LÓPEZ, M.M., MONTESINOS, E. 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas: 515-558. 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., MONTESINOS, E., SCORTICHINI, M. 1999. Fire blight in Spain: situation and monitoring. *Acta Horticulturae*, 489: 187-191.
- LÓPEZ, M., MONTESINOS, E., LECOMPTE, P., PAULIN, J.P. 1996. El fuego bacteriano del peral, una amenaza permanente: Situación actual, epidemiología y control de la enfermedad. *Fruticultura Profesional*, 78: 79-87.
- LÓPEZ, M.M., NOVAL, C., PALAZÓN, E., SAMPAYO, M. 1987. *El fuego bacteriano. Erwinia amylovora*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 72 pp. ISBN: 84-7479-650-4.
- MAXSON-STEIN, K., MCGHEE, G.C., SMITH, J.J., JONES, A.L., SUNDIN, G.W. 2003. Genetic analysis of a pathogenic *Erwinia* sp. isolated from pear in Japan. *Phytopathology*, 93: 1393-1399.
- MAZZUCCHI, U. (ed.). 1992. *Atti delle giornate di studio sul Colpo di Fuoco da Erwinia amylovora*. Instituto di Patologia Vegetale-Università degli Studi di Bologna.
- MOHAN, S.K., THOMSON, S.V. 1996. An outbreak of fire blight in plums. *Acta Horticulturae*, 411: 73-96.
- MONTESINOS, E., LÓPEZ, M.M. 2000. Fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*): 37-40. En: *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*. Sociedad Española de Fitopatología. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 84-7114-916-8.
- PAULIN, J.P. 1999. Prevención y lucha contra el fuego bacteriano en Francia. *Phytoma España*, 114: 123-127.
- PAULIN, J.P., PRIMAULT, J. 1993. *Feu bactérien et culture du pommier à cidre*. INRA. France: Comité des fruits à cidre et des productions cidricoles, 60 pp.

- PIERSTORFF, A.L. 1931. *Studies of the fire blight organism, Bacillus amylovorus*. Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir 136, Ithaca, New York.
- RHIM, S.L., VÖLKSCH, B., GARDAN, L., PAULIN, J.P., LANGLLOTZ, C., KIM, W.S., GEIDER, K. 1999. *Erwinia pyrifolia*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathology*, 48: 514-520.
- 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.
- ROSEN, H.R. 1929. The life history of the fire blight pathogen, *Bacillus amylovorus*, as related to the means of overwintering and dissemination. *Arkansas Agricultural Experiment Station Bulletin*, 244. Fayetteville, Arkansas, 96 pp.
- ROSEN, H.R. 1935. The mode of penetration of pear and apple blossoms by the fire-blight pathogen. *Science*, 81: 26.
- ROSEN, H.R., GROVES, A.B. 1928. Studies on fire blight: host range. *Journal of Agricultural Research*, 37: 493-505.
- SCHROTH, M.N., MOLLER, W.J., THOMSON, S.V., HILDEBRAND, D.D. 1974. Epidemiology and control of fire blight. *Annual review of Phytopathology*, 12: 389-412.
- SEIDEL, M., STEFFEN, E., SEIDEL, D., WALTER, A. 1994. Survival of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* on bird feet. *Archives of Phytopathological Agricultural Research*, 29: 25-27.
- STARR, M.P., CARDONE, C., FOLSOM, D. 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology*, 41: 915-919.
- TANNI, A. TAMURA, O., OZAKI, M. 1981. The causal agent of a fire blight-like disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 47: 102.
- TEVIOTDALE B.L., WILEY M.F., HARPER D.H. 1991. How disinfectants compare in preventing transmission of fire blight. *California Agriculturae*, 45: 21-23.
- THIBAUT, B., LE LÉZEC, M. 1990. Sensibilité au feu bactérien des principales variétés de pommier et poirier utilisées en Europe. *Agriculture-Agrimed Research Programme. Fire blight of Pomoideae*. CEC-CCE-EUR 12601, EUR. OP. Luxembourg.
- VAN DER ZWET, T. 1969. Study of the fire blight cankers and associated bacteria in pear. *Phytopathology*, 59: 607-613.
- VAN DER ZWET, T., BEER, S.V. 1995. Fire Blight. Its nature, prevention and control: A practical guide to integrated disease management. *United States Department of Agriculture (U.S.D.A.). Agriculture Information Bulletin*, 631, 83 pp.

- VAN DER ZWET T., KEIL H.L. 1979. Fire Blight: A bacterial disease of rosaceous plants. *United States Department of Agriculture Handbook (U.S.D.A.)*, 510. Washington DC, 200 pp.
- VAN DER ZWET, T., BELL, R.L., STROO, H. 1982. Long distance dissemination of *Erwinia amylovora* in apparently healthy pear budwood (Abstr.). *Phytopathology*, 72: 711.
- VAN DER ZWET, T., ZOLLER, B.G., THOMSON, S.V. 1988. Controlling fire blight of pear and apple by accurate prediction of the blossom blight phase. *Plant Disease*, 72: 464-472.
- VANNESTE, J.L. 1996. Honeybees and epiphytic bacteria to control fire blight, a bacterial disease of apple and pear. *Biocontrol News and Information*, 17: 67-78.
- 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.
- ZELLER, W. 1990. Test of pome fruit susceptibility in the Federal Republic of Germany. *Commission of the European Communities, Agriculture, Agrimed Research Programme, EUR 12601*: 110-115.

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 (desferrioximinas)**, 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.

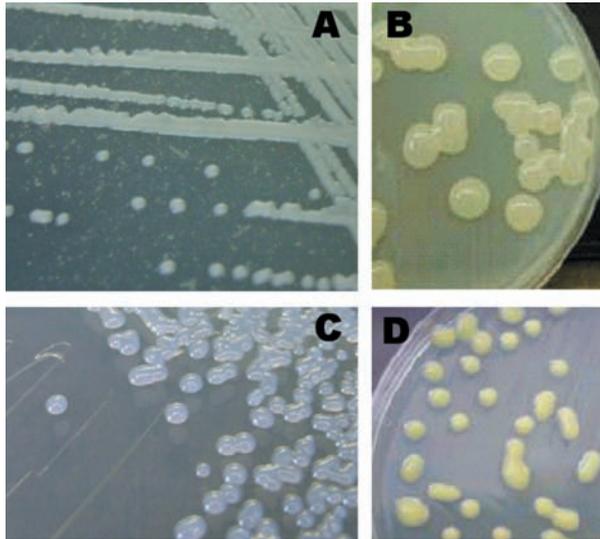
2.2.2.1. Aislamiento

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.

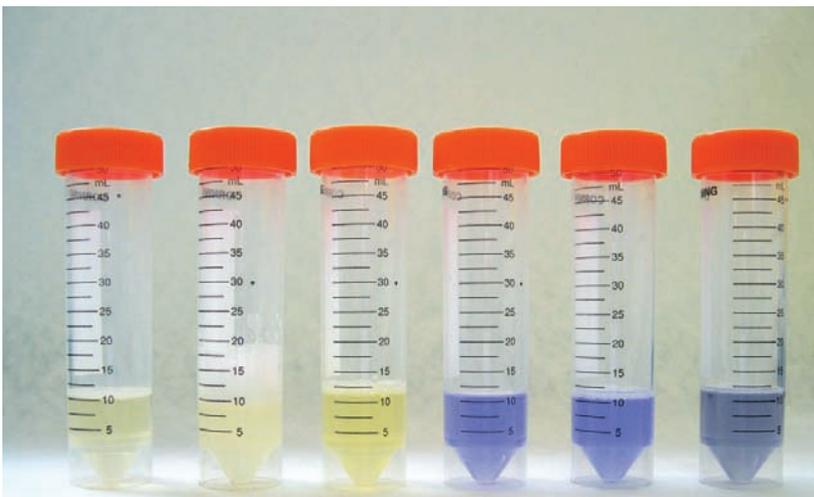
Recientemente se ha desarrollado en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) un medio con cobre denominado RESC (Ordax, 2008), que facilita la recuperación de *E. amylovora* cuando la bacteria está en condiciones de estrés y en el que ésta muestra una morfología característica en 48 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

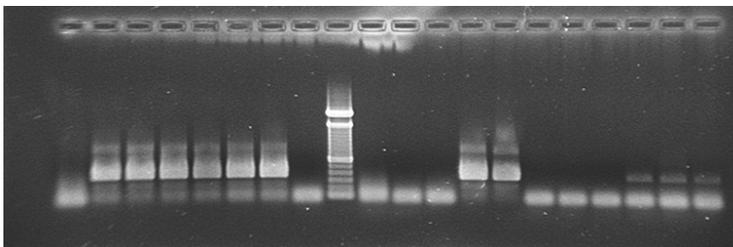
Actualmente las técnicas moleculares más utilizadas para el diagnóstico o detección de *E. amylovora* están basadas en distintas variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La aparición de la técnica de amplificación de ADN mediante PCR ha provocado una revolución en el mundo de la biología 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* (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 amplificadores, 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.

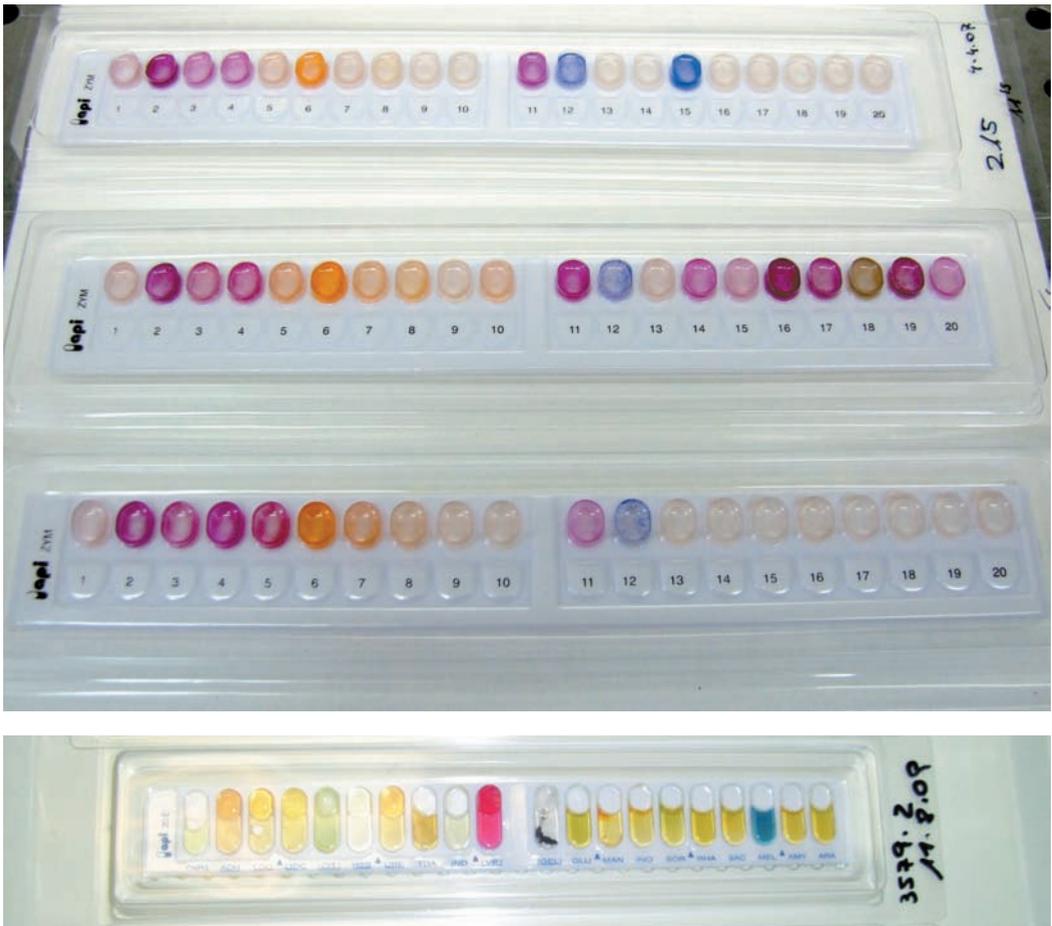
La identificación bioquímica convencional se puede completar con las galerías comerciales API (bioMérieux, Francia) (Donat *et al.*, 2005; 2007) (Foto 2.4), que son sistemas miniaturizados que permiten evaluar 20 reacciones bioquímicas (API 20E), la utilización de 50 carbohidratos y derivados (API 50CH), 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.

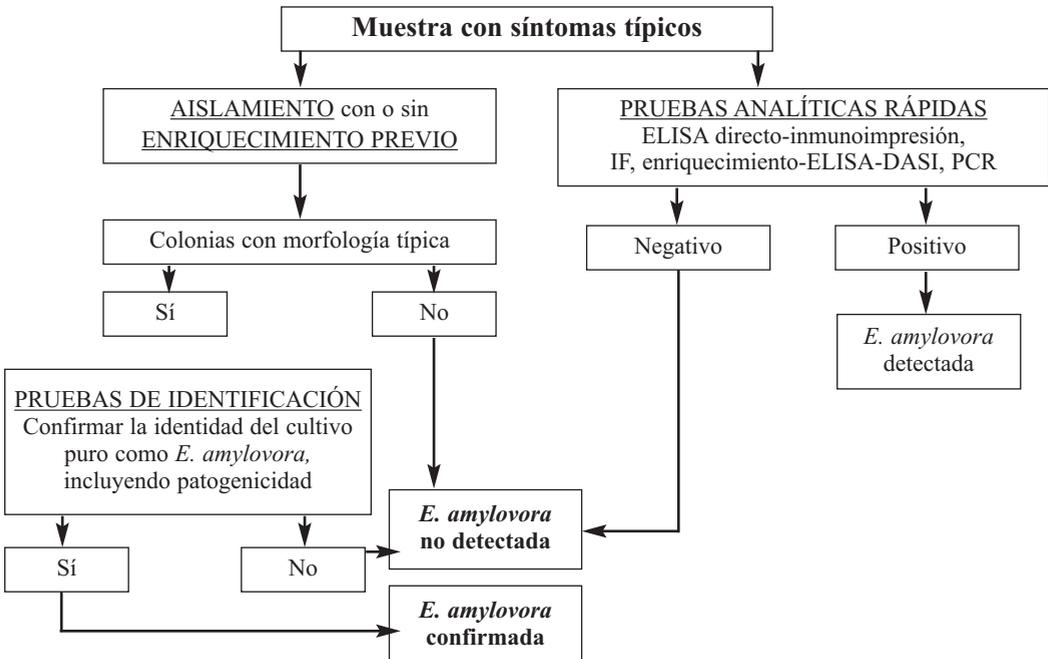
El único protocolo estandarizado para el diagnóstico de *E. amylovora* se ha desarrollado en el proyecto DIAGPRO (Diagnostic Protocols) financiado por la UE. El protocolo, que recoge el procedimiento a seguir desde la toma de muestras de material vegetal hasta su diagnóstico final (Figura 2.1), se ha 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).**

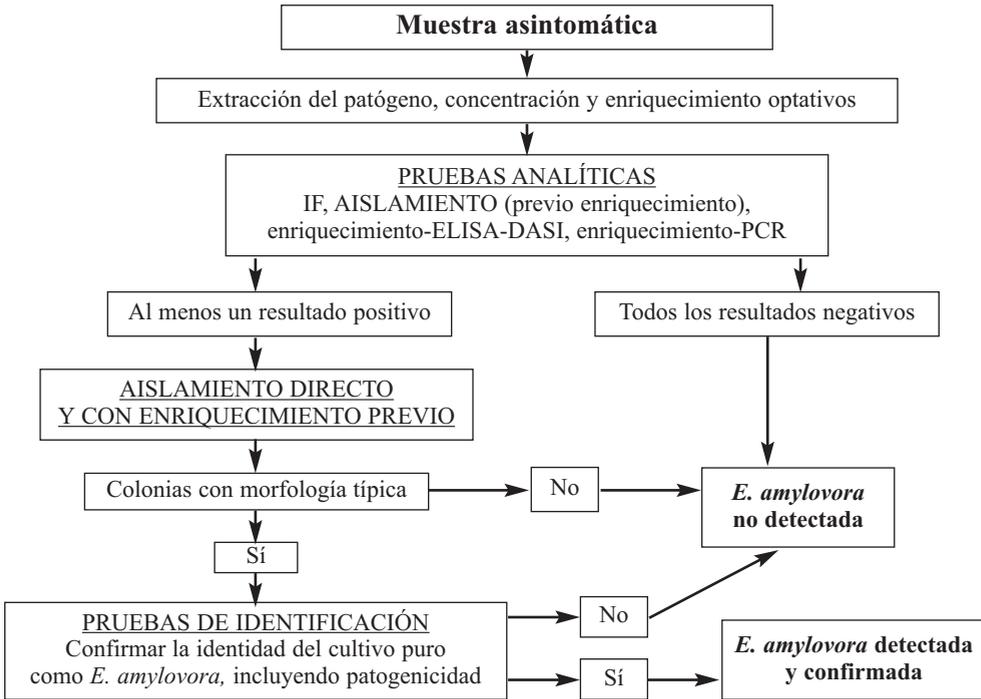
El protocolo aconsejado para el diagnóstico de plantas con síntomas se recoge en la Figura 2.1, e incluye como pruebas iniciales el aislamiento (con o sin enriquecimiento previo, dependiendo de las características de las muestras) y pruebas rápidas serológicas o moleculares. En caso de ser todas positivas, 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.

CAPÍTULO 3

SISTEMAS DE PREDICCIÓN Y MÉTODOS DE CONTROL DEL FUEGO BACTERIANO

EMILIO MONTESINOS¹, ISIDRE LLORENTE¹, ESTHER BADOSA¹, JORDI CABREFIGA¹, ANNA BONATERRA¹, LIDIA RUIZ¹, CONCEPCIÓ MORAGREGA¹, JESÚS FRANCÉS¹

La gravedad del fuego bacteriano, que afecta tanto a frutales de pepita como a plantas ornamentales sensibles, la naturaleza relativamente esporádica pero devastadora de los ataques, y el profundo impacto de su establecimiento en el sector productivo obligan a plantear una **estrategia integrada de control**. Dicha estrategia consiste en utilizar todas las herramientas a nuestro alcance y que incluyen tanto los sistemas de predicción de riesgo como las medidas de control basadas en la prevención y en la convivencia con la enfermedad.

3.1. SISTEMAS DE PREDICCIÓN

3.1.1. INTRODUCCIÓN

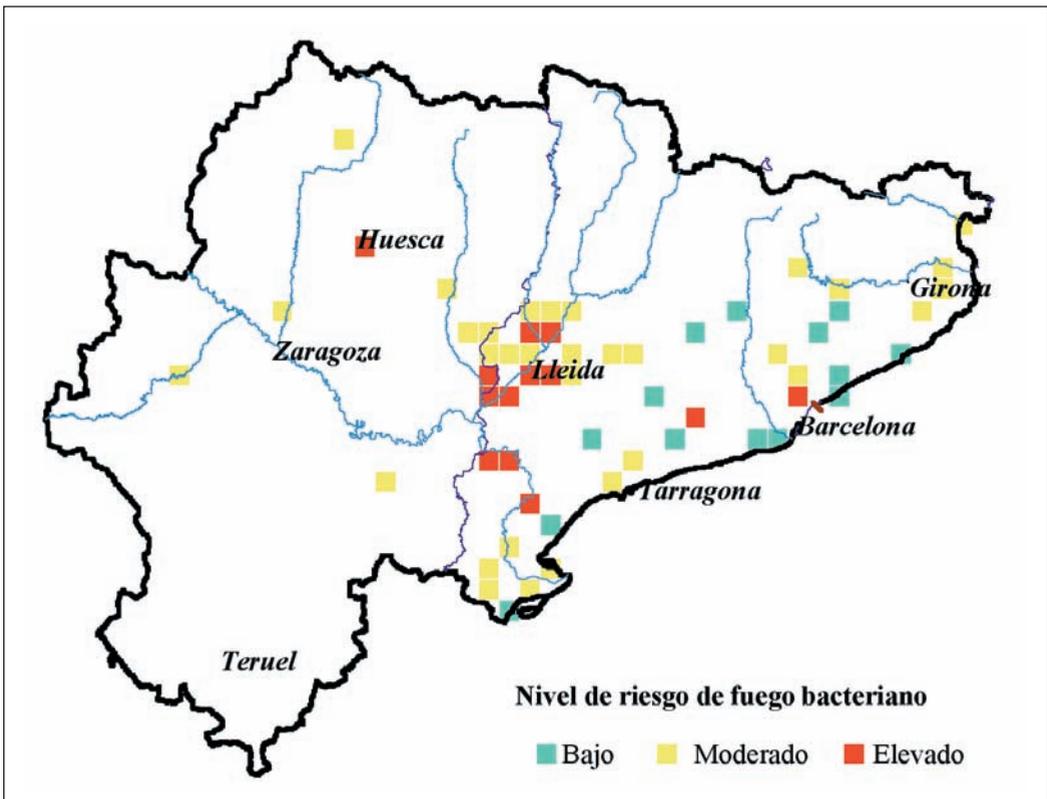
El fuego bacteriano es una enfermedad compleja y las epidemias graves son esporádicas a lo largo de los años, por este motivo es importante conocer aquellos períodos en los que el riesgo de aparición de la enfermedad es mayor. La evolución del fuego bacteriano está en función de la cantidad y virulencia de patógeno presente, de las condiciones ambientales favorables y del grado de susceptibilidad del huésped a la enfermedad. El conocimiento de algunas de estas relaciones ha permitido en los últimos años la elaboración de **modelos de predicción de la enfermedad**. Por otra parte, la facilidad de utilización de estos modelos mediante el uso de soportes informáticos, así como la rapidez en la transmisión de datos, tanto meteorológicos como de avisos fitosanitarios, hacen que sean una herramienta cada vez más utilizada en el manejo del fuego bacteriano en diferentes países.

Existen varios modelos disponibles que parten del estudio de las condiciones favorables para la enfermedad. Estas condiciones favorables son: la presencia del patógeno, que corresponde a la población bacteriana que pueda haber en una planta y en una localización determinada, así como el grado de virulencia de éste patógeno; la receptividad de la planta a la infección, determinada básicamente por la fenología del huésped y su sensibilidad varietal; y finalmente los factores relacionados con el clima, como son la temperatura o la disponibilidad de agua, ya sea en forma de lluvia o de rocío. Los diferentes modelos de predicción del fuego bacteriano han sido elaborados relacionando uno o varios de estos factores y el objetivo es múltiple. En países como Estados Unidos el principal objetivo es la ubicación en el tiempo de los tratamientos con antibióticos como la estreptomycin, pero éste no es el único

¹ Instituto de Tecnología Agroalimentaria- XaRTA-CIDSAV. Universidad de Girona.

objetivo. En países como España, donde la utilización de antibióticos no está autorizada para el control del fuego bacteriano, estos modelos pueden generar una información también muy útil, ya que algunos no sólo predicen el inicio de las infecciones sino también su evolución y el momento en que los síntomas ya son visibles. Esto es de gran ayuda, ya que **asisten al técnico o al responsable en sanidad vegetal para programar las fechas óptimas para realizar inspecciones o muestreos y para delimitar las zonas con más riesgo debido a sus condiciones agroclimáticas**. Considerando que el fuego bacteriano es una enfermedad que progresa muy rápidamente, conocer los días en que es más probable que se observen síntomas incrementa la eficacia de los muestreos. Así mismo, es posible elaborar mapas de riesgo utilizando variables climáticas y la fenología del huésped. En la Figura 3.1 se presenta el resultado de un estudio realizado en la zona nordeste de España a partir de datos climáticos correspondientes a un período comprendido entre 5 y 10 años según las estaciones meteorológicas (Llorente *et al.*, 2002). Mapas de este tipo se pueden elaborar cada año y con una escala mucho mayor, pudiéndose determinar en que fincas concretas es más probable la aparición de la enfermedad si hay inóculo disponible.

Figura 3.1. Mapa de riesgo fenoclimático de fuego bacteriano obtenido mediante el modelo BIS95 en la zona nordeste de España. Los niveles de riesgo se han obtenido a partir de datos climáticos históricos de 5 a 10 años (1990 a 1999) según la estación meteorológica. Las zonas con un riesgo mas elevado, alrededor de Lérida y Huesca, han correspondido con aquellas donde en los años 1998 y 1999 se detectaron focos de fuego bacteriano.



Erwinia amylovora penetra con preferencia en la planta huésped a través de aberturas naturales, especialmente a través de las flores o heridas producidas por heladas tardías, vientos fuertes o granizo. Consecuentemente, **los momentos de mayor riesgo de infección se producirán durante la floración (hasta la caída de pétalos) y en aquellos momentos en que se puedan producir heridas por factores climáticos más o menos extremos.** La multiplicación del patógeno depende de la temperatura, siendo las temperaturas moderadas ($>18^{\circ}\text{C}$) suficientes para que las células se dupliquen. Si se dan conjuntamente estas condiciones de presencia de patógeno, receptividad y susceptibilidad del huésped, la aparición de humectación permitirá el inicio de las infecciones. La progresión de la enfermedad estará en función de la temperatura, apareciendo los síntomas después de un período de tiempo más o menos largo. Uno de los síntomas típicos es la aparición de exudados, como resultado de la colonización de la planta por parte del patógeno, que pueden ser rápidamente dispersados por la lluvia o por la acción de algunos insectos atraídos por la elevada concentración de polisacáridos en los mismos. Así mismo, insectos con aparato bucal picador-chupador también pueden actuar como vectores de la enfermedad. La interacción de estos factores es utilizada por los modelos predictivos para determinar el riesgo y la progresión de las infecciones.

A lo largo de la historia del control del fuego bacteriano se han desarrollado diferentes modelos, siendo los primeros más sencillos. Estos predicen el riesgo de infecciones en función de la superación de un umbral térmico de 18°C (modelos de Powell y Mills) o entre $14,5^{\circ}\text{C}$ y $16,5^{\circ}\text{C}$ (modelo de Thomson) durante el período de floración y en conjunción con humedades relativas elevadas o lluvias (Montesinos y Llorente, 1999). Posteriormente se desarrollaron modelos más complejos en los que aparte de la información relativa a parámetros climáticos también se integraba la actividad de los insectos como agentes de dispersión y el consecuente incremento del riesgo. Destacan los desarrollados por Billing, como el Sistema de Billing Original (BOS), Sistema de Billing Revisado (BRS) y el Sistema de Billing Integrado (BIS95), en los que a partir de los parámetros climáticos de temperatura, humectación y fenología se determina no sólo el inicio de infecciones sino también la duración del período de incubación de estas infecciones y por tanto el momento de aparición de los síntomas (Billing, 1990; Billing, 1992; Billing, 1996). En Francia se elaboró el modelo Parefeu, llamado también Firescreens, el cual integró el potencial de riesgo climático con el potencial de inóculo obtenido a partir del historial de la finca (Jacquart-Romon y Paulin, 1991).

De todos los modelos existentes **los más utilizados actualmente son el llamado Maryblyt y el Cougarblight** o modelo de Smith. Estos modelos están siendo utilizados en Estaciones de Avisos Fitosanitarios en Estados Unidos y en diferentes países europeos, como por ejemplo en Italia.

3.1.2. MODELO MARYBLYT

El modelo Maryblyt fue el primer sistema de previsión de riesgo totalmente informatizado (Steiner, 1990 a; Steiner, 1990 b; Steiner y Lightner, 1996). Se elaboró en la Universidad de Maryland (EE.UU.). El modelo diferencia entre los cultivos de manzano y peral para el cálculo del riesgo. Las entradas requeridas son las temperaturas máximas y mínimas diarias, lluvia y rocío. Pueden incorporarse datos como la aparición de lesiones o la aplicación de antibióticos o derivados cúpricos. También es necesario introducir la fenología para determinar el período de floración. A partir de estos datos se calculan grados día (GD) y grados hora (GH) y se ponen en funcionamiento tres subsistemas con diferentes umbrales, a partir

de los cuales se **determina el porcentaje de flores susceptibles de ser infectadas** ($GD > 4,4^{\circ}\text{C}$), el porcentaje de flores colonizadas por las bacterias ($GH > 18,3$) y **el desarrollo de los síntomas una vez se han iniciado las infecciones** ($GD > 12,7^{\circ}\text{C}$). Este modelo también determina la evolución de los síntomas tanto en flores y brotes como en chancros. Las condiciones específicas para el inicio de infecciones y evolución de las mismas se describen a continuación:

- **Infecciones en flores.** Para que se produzca el inicio de infecciones en flores es necesario que se den varias condiciones:
 - Existencia de flores receptivas (estadio B de Fleckinger).
 - Colonización por bacterias de más del 3 % de las flores. Se calcula mediante el potencial de infecciones epifitas y se corresponde con el momento en que se acumulan más de 110 GH a partir de un umbral de $18,3^{\circ}\text{C}$ y dentro de un período con al menos $44,4$ GD ($> 4,4^{\circ}\text{C}$) en manzano.
 - Presencia de lluvias superiores a 0,25 mm durante el día, o superiores a 2,5 el día anterior.
 - Temperatura media igual o superior a $15,6^{\circ}\text{C}$.

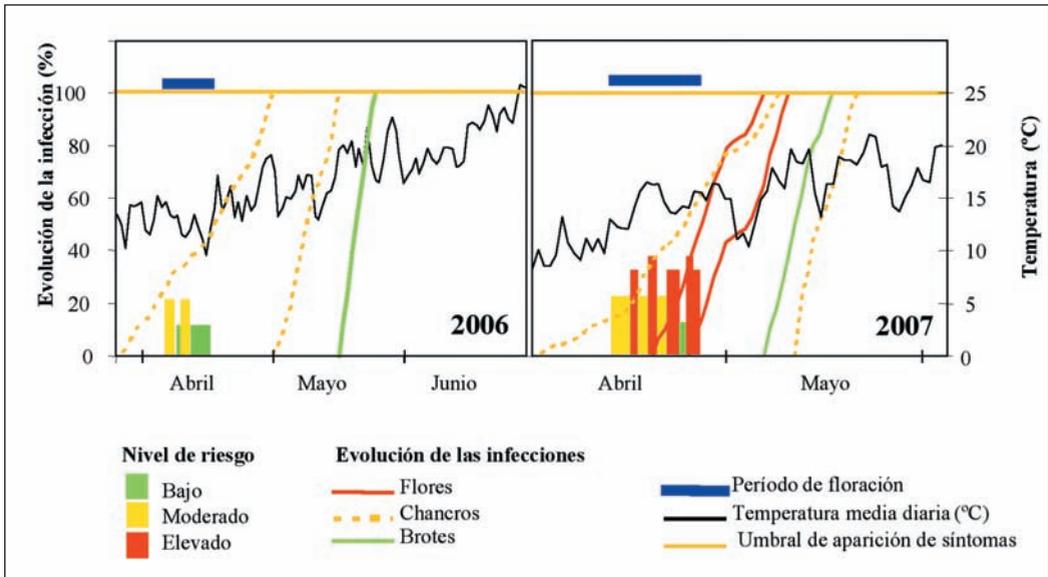
A partir de estos índices de riesgo parciales se genera un **índice de riesgo global (bajo, moderado y elevado o severo)**. Posteriormente se calcula la progresión de estas infecciones y los síntomas se predicen cuando se acumulan 57 GD ($> 12,7^{\circ}\text{C}$).

- **Infecciones en chancros.** En aquellas zonas donde la enfermedad está presente y el patógeno sobrevive en chancros en la madera, se predice el inicio de activación en los márgenes de estos cuando se acumulan al menos 109 GD ($> 12,7^{\circ}\text{C}$), o en todo el chancro (166 GD $> 4,4^{\circ}\text{C}$). El biofix, o momento a partir del cual se empiezan a acumular los grados día, corresponde a la fecha en que el 50% de las yemas presentan tejido verde.
- **Infecciones en brotes.** Se basan en la aparición de síntomas en flores o chancros y en la capacidad de determinados insectos de transmitir la enfermedad. La dinámica poblacional de estos insectos es función de la temperatura. Se considera riesgo al acumularse 375 GD ($> 4,4^{\circ}\text{C}$), si bien estos valores pueden modificarse según las características de las diferentes poblaciones de insectos de cada zona geográfica.
- **Infecciones originadas a partir de lesiones.** Cuando existan heladas tardías, vientos fuertes o granizadas los síntomas aparecerán al acumularse 110 GH ($> 18,3^{\circ}\text{C}$).

El modelo Maryblyt permite por tanto determinar los momentos de infección y el desarrollo de varias fases del ciclo de esta enfermedad y puede ser de gran ayuda. Este modelo, no obstante, asume que en la zona de estudio existe la presencia de inóculo.

En la Figura 3.2 puede observarse gráficamente parte de la información generada por este modelo. Corresponde a un estudio realizado en una finca comercial de peral (variedad Conferencia) en Gerona en los años 2006 y 2007. Se puede determinar claramente que las condiciones fenoclimáticas durante el año 2007 fueron más favorables y, por tanto, existió más riesgo de fuego bacteriano que durante 2006. En una finca comercial cercana se detectó fuego bacteriano durante el año 2007, existiendo por tanto una correlación entre el riesgo fenoclimático y la presencia de la enfermedad.

Figura 3.2. Riesgo de infección de fuego bacteriano determinado mediante el modelo Maryblyt en una finca de peral (Conferencia) en Mas Badia (Gerona) durante los años 2006 y 2007. Las barras verticales representan el riesgo predicho por el modelo (bajo, moderado o elevado) durante el período de floración. Las líneas oblicuas representan la evolución de las infecciones, indicándose el momento de inicio de éstas, la progresión de las mismas y el momento de aparición de los síntomas que corresponden al 100% de evolución (línea horizontal). Se presenta la evolución en flores, chancros y brotes. También se muestran el período de floración y la temperatura media diaria. Durante el año 2007 se detectó la enfermedad en una finca comercial próxima a la zona del estudio, existiendo una correlación entre un año con riesgo fenoclimático elevado y su detección.



3.1.3. MODELO COUGARBLIGHT

En los últimos años se ha utilizado en varios países el **modelo Cougarblight** (Smith, 1993). Este modelo fue desarrollado en la Washington State University (EE.UU.). Es un modelo muy sencillo de utilizar que **predice el riesgo de inicio de infecciones pero no el desarrollo de éstas** y, por tanto, no determina la aparición de síntomas. Este modelo está basado en que la población bacteriana sobrevive durante pocos días (entre tres y cinco) en las flores. Las temperaturas suaves permiten una rápida duplicación de las células, incrementado así la población en las flores, y la presencia de agua proveniente de la lluvia o de humectaciones con duraciones superiores a tres horas favorecen la colonización de los nectarios y la posterior invasión del tejido vegetal. Las variables climáticas que requiere son temperatura, lluvia y humectación. Únicamente se utiliza durante el período de floración. A diferencia del modelo descrito anteriormente, Cougarblight **incorpora el potencial de inóculo** a partir del historial de la parcela de estudio, diferenciando cuatro niveles (de menor a mayor potencial) según si no se ha detectado la enfermedad en la zona durante los últimos dos años, detección de la enfermedad durante el año anterior pero no en zonas vecinas a la parcela de estudio, enfermedad presente en la finca o en zona próximas durante el año ante-

rior y, finalmente, presencia de chancros en la finca o en zonas vecinas. A partir de la temperatura se obtienen los grados hora (GH) o grados día (GD) de las últimas 96 horas (cuatro días). Si el día de consulta ha habido lluvia o humectación con un período superior a tres horas se establece el riesgo de infección en función tanto de este potencial climático como del potencial de inóculo, estableciéndose **cuatro niveles de riesgo (bajo, moderado, alto y extremo)**.

3.2. MÉTODOS DE CONTROL

Como consecuencia de la introducción en España de este organismo nocivo de cuarentena, las medidas de control adquirieron carácter obligatorio y se recogen en la normativa específica de los Reales Decretos RD 58/2005, RD 1201/1999 y RD 1512/2005, por los que se establecen las medidas preventivas contra la introducción de *E. amylovora* y el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas, complementados por la **Ley de Sanidad Vegetal**. Los aspectos relativos a legislación se recogen en detalle en el capítulo 4.

3.2.1. MEDIDAS PREVENTIVAS

Las medidas más efectivas para evitar la difusión y los daños producidos por el fuego bacteriano son sin duda las preventivas, consistentes en el **uso de material vegetal sano** no portador de la bacteria, así como en la plantación de **especies y variedades hospedadoras poco sensibles**.

El pasaporte fitosanitario constituye una herramienta muy eficaz para minimizar el riesgo de introducción del fuego bacteriano. En España se ha realizado un extenso estudio para verificar la fiabilidad del pasaporte fitosanitario CEE en plantas de vivero (frutales y ornamentales) procedentes de diferentes zonas europeas (López *et al.*, 1999). Tras un total de 14.000 análisis mediante métodos inmunoenzimáticos, moleculares y aislamiento en muestras de material procedente de viveros de Bélgica, Inglaterra, Francia e Italia, no se detectó la presencia de *E. amylovora* en dicho material (Montesinos *et al.*, 2000). Sólo algunas muestras presentaron PCR o ELISA positivos, pero no se pudo aislar *E. amylovora*. En consecuencia, después de cuatro años de estudio, se puede concluir que el pasaporte fitosanitario constituye una valiosa herramienta para asegurar un material vegetal sano. No obstante, aunque la acreditación del pasaporte fitosanitario minimiza el riesgo de fuego bacteriano, puede ocurrir que se distribuyan plantas asintomáticas portadoras de poblaciones endofitas de *E. amylovora*, o en las que las poblaciones estén por debajo del límite de detección de las técnicas utilizadas. A pesar de su bajo nivel, estas poblaciones bacterianas podrían ser suficientes para iniciar infecciones una vez introducidas dichas plantas en una Zona Protegida, ya que se ha demostrado que la dosis infectiva media (DI_{50}) de *E. amylovora* en órganos sensibles es del orden de 10-100 bacterias viables (Mazzucchi, 1992; Cabrefiga y Montesinos, 2005).

En consecuencia, **si se realizan importaciones de plantones se debe exigir que vayan acompañadas por el pasaporte fitosanitario para Zona Protegida (ZP)**, ya que el material vegetal sensible a fuego bacteriano que no posea el pasaporte fitosanitario ZP o acredite sólo un pasaporte fitosanitario normal es ilegal. Se debe también limitar la importación de plantones de países afectados por el fuego bacteriano a aquellos casos en los que sea estrictamente

necesario y no se disponga de material similar en España. Obviamente, está prohibido, por ser una práctica ilegal, introducir varetas o material vegetal procedentes de zonas o países con fuego bacteriano.

Si se han efectuado plantaciones con material vegetal procedente de países afectados por la enfermedad, **deben realizarse inspecciones periódicas en primavera, verano y otoño** y avisar a los Servicios de Sanidad Vegetal ante cualquier síntoma sospechoso. **Nunca debe ocultarse la presencia de síntomas.** Ante un síntoma sospechoso, se debe **avisar al Laboratorio Oficial de Diagnóstico correspondiente.** La experiencia demuestra que en estos casos la enfermedad acaba afectando a grandes extensiones, lo que obliga a aplicar medidas de erradicación drásticas con graves consecuencias económicas.

Deben vigilarse con atención las plantaciones de peral, sobre todo en primavera y verano, **así como la aparición de síntomas en otras especies de rosáceas,** tanto en plantaciones de manzano o níspero como en **setos o arbustos ornamentales acompañantes** consistentes en *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Pyracantha*, *Stranvaesia*, e incluso en plantas silvestres de *Crataegus*, *Sorbus*, etc.

3.2.2. MEDIDAS DE CONVIVENCIA

Los métodos de control del fuego bacteriano han sido ineficaces para evitar su extensión y erradicar la enfermedad en los países en que ésta es epidémica (van der Zwet *et al.*, 1988; van der Zwet y Beer, 1995; Sobiczewski *et al.*, 1997; Johnson y Stockwell, 1998; Beer, 2002; Norelli *et al.*, 2003). **Una vez introducido y establecido el fuego bacteriano en una región, solamente es posible utilizar medidas de convivencia para evitar sus efectos,** lo que obliga a una profunda transformación del sector productivo en las zonas afectadas (López *et al.*, 1996, 2002; Montesinos y López, 1996, 1998, 2000; Montesinos y Pagès, 1999).

3.2.2.1. Control químico

Los métodos de **control químico** son en general poco eficaces y se dispone de un número muy limitado de productos, a pesar de la intensa investigación que se lleva realizando desde hace más de cincuenta años. Dichos métodos se aplican preventivamente con el objetivo de evitar la colonización de la planta por el patógeno, ya que no existen tratamientos curativos de la enfermedad (López y Montesinos, 1996).

Los **productos cúpricos** se basan en la liberación controlada de ión cobre, se comercializan mediante diversas formulaciones (sulfato, hidróxido, oxiclورو, óxido, mezcla bordelesa) y se utilizan a dosis de 50-250 g/hl, pero presentan el inconveniente de su fitotoxicidad a medida que los tratamientos se acercan a la floración y, en general, su baja persistencia y penetración en la planta. **Están autorizados en frutales de hoja caduca para el control de diversas bacteriosis, incluido el fuego bacteriano.** Su acción sobre *E. amylovora* es directa, como en otros patógenos de plantas, debido a su efecto microbiocida. Sin embargo, a dosis subletales pueden inducir un cierto grado de tolerancia que se puede traducir en un estado “viable no cultivable” (VNC) de la bacteria (Ordax *et al.*, 2006).

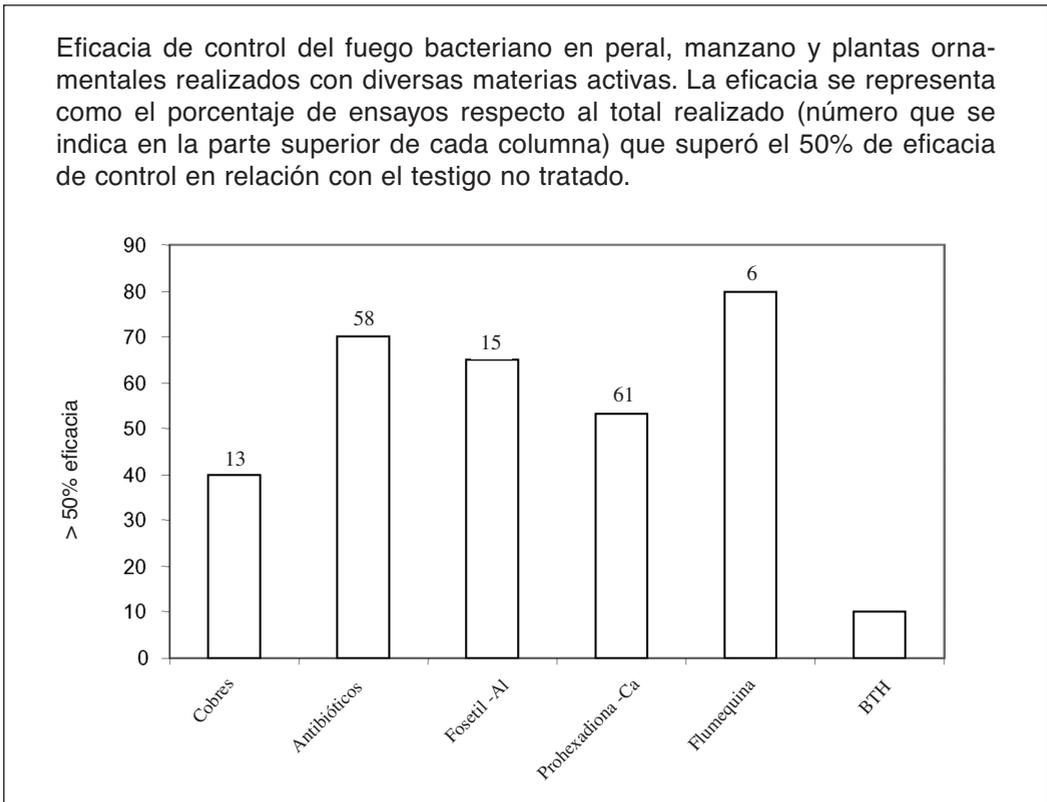
Los **antibióticos tienen un efecto directo, ya que inhiben la multiplicación** de *E. amylovora* y son los productos más efectivos sobre la base de una extensa experiencia de campo en el control del fuego bacteriano en diversos países. Sin embargo, no están autorizados por la legislación de la UE. La estreptomomicina y tetraciclina (utilizados principalmente en Estados Unidos) o la kasugamicina (antiguamente utilizada en Europa) se emple-

an a dosis de entre 2 y 10 g/hl. Otro antibiótico, la flumequina, una quinolona de síntesis, se utilizó en Francia en el pasado para el control del fuego bacteriano. Diversos estudios realizados en manzano y peral tratados con estreptomycin pusieron de manifiesto casos de aparición de cepas de *E. amylovora* resistentes que explicaban la pérdida de eficacia del control en campo (Moller *et al.*, 1981; Chiou y Jones, 1991). De todos estos antibióticos, **sólo la kasugamicina estuvo autorizada en España y únicamente permitida como uso esencial para el control de bacteriosis en manzano y peral hasta el 31 de diciembre de 2007.**

Existen una serie de **materias activas** que no presentan acción inhibitoria directa sobre la bacteria, pero que poseen cierta actividad de control del fuego bacteriano, como el **fosetil-Al, prohexadiona de calcio, benzotiadiazol y harpinas** (Montesinos *et al.*, 2002; Norelli y Miller, 2004). En estudios con estos productos se han puesto de manifiesto diversos efectos sobre el metabolismo de la planta hospedadora que conducen a una estimulación de mecanismos de defensa contra patógenos, pero que no han sido demostrados claramente en todos los casos. El fosetil-Al, un fosfonato utilizado para el control de hongos oomicetes, presenta una actividad moderada contra el fuego bacteriano cuando se aplica a dosis elevadas de 300-400 g/hl, aunque en ensayos de campo ha mostrado una cierta irregularidad en eficacia (Deckers *et al.*, 1990). La prohexadiona de calcio, un regulador de crecimiento utilizado para controlar el vigor en manzano, también presenta una eficacia moderada, pero posee el inconveniente de interferir con el desarrollo vegetativo del hospedador y puede incidir sobre la conducción de la plantación (Kessmann *et al.* 1994; Sticher *et al.*, 1997). El compuesto benzotiadiazol, un análogo del ácido salicílico, induce respuesta sistémica defensiva y mejora la resistencia a fuego bacteriano (Brisset *et al.*, 2000). Las harpinas, proteínas producidas por diversas bacterias fitopatógenas, producen un efecto inductor de la respuesta defensiva en diversas plantas, incluyendo el manzano, y se comercializan como un producto fitoestimulador en diversos cultivos (Oh y Beer, 2005). Sin embargo, ninguno de estos productos está autorizado específicamente en España para el control del fuego bacteriano. Fosetil-Al está autorizado en frutales de pepita contra *Phytophthora*, el benzotiadiazol está registrado para bacteriosis en tomate, la prohexadiona para reducir el desarrollo vegetativo en manzano y peral, y la harpina como fitoestimulador en frutales de hoja caduca. Otro compuesto cuyo mecanismo de acción es desconocido pero que presenta actividad en campo es el ácido oxalínico (Deckers *et al.*, 1990), pero no está autorizado en España.

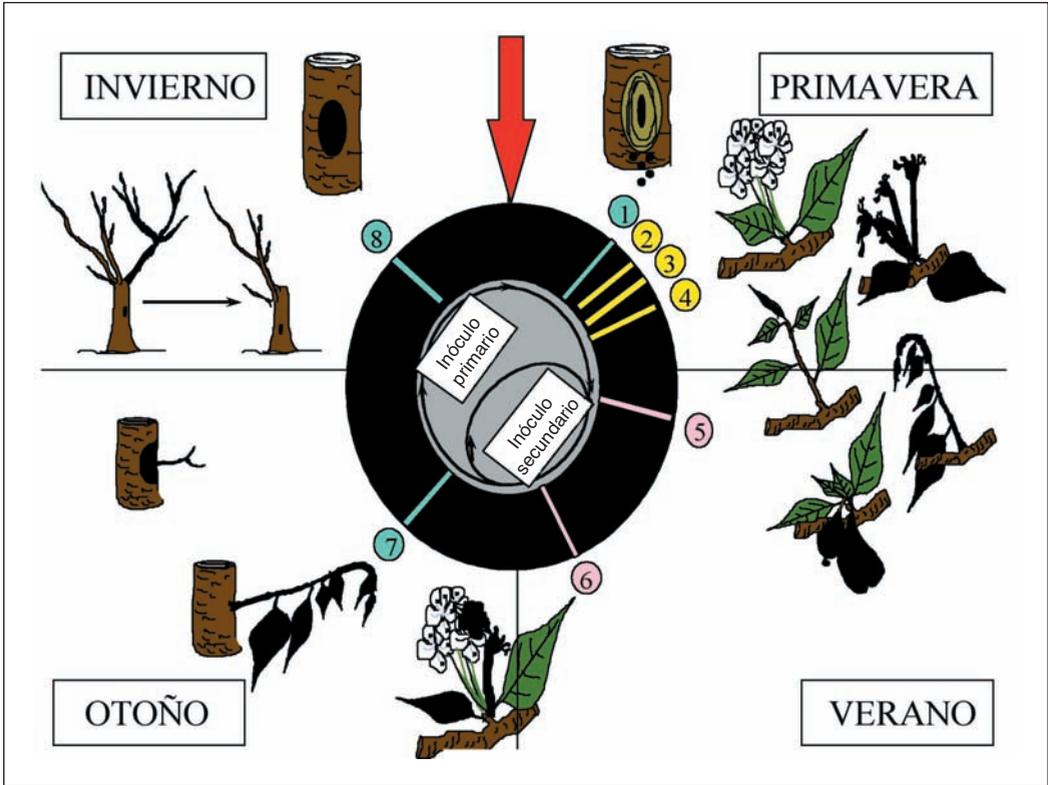
En relación con la eficacia del control químico, se han realizado estudios en la Universidad de Gerona en peral Conferencia y manzano Fuji en condiciones de ambiente controlado y con cepas españolas del patógeno para determinar la eficacia de fosfonatos (fosetil-Al y etefón) y de otros productos de síntesis que actúan estimulando los mecanismos de defensa naturales de la planta (benzotiadiazol), comparándolos con tratamientos convencionales usando derivados de cobre y antibióticos (Ruz *et al.*, 2002). Se concluyó que entre los derivados de cobre, los productos más eficaces son el sulfato de cobre y el oxiclورو de cobre. Además, el fosetil-Al tiene una eficacia moderada, y el benzotiadiazol presenta resultados comparables a los de la estreptomycin, aunque a dosis algo superiores a las recomendadas, en el control de algunas micosis. Sin embargo, el principal inconveniente de fosetil-Al y bezotiadiazol es que su aplicación debe efectuarse preventivamente entre cinco y siete días antes de la inoculación o infección del patógeno, lo que complica su uso en la práctica. En la Figura 3.3 se muestran los resultados de la eficacia de la lucha química mediante diversos productos antimicrobianos obtenidos en ensayos de campo realizados en Francia, Reino Unido, Estados Unidos y Holanda.

Figura 3.3. Eficacia de la lucha química mediante diversos productos antimicrobianos en ensayos de campo, realizados mediante inoculación artificial de *E. amylovora* o inóculo natural. Los resultados proceden de ensayos realizados por INRA (Francia), East Malling (Reino Unido), Universidad de Cornell (EE.UU.), Universidad de Pensilvania (EE.UU.), Universidad de California (EE.UU.) y Universidad de Wageningen (Holanda). La incidencia de la enfermedad en los testigos no tratados variaba del 1 al 95%, dependiendo del ensayo. En la parte superior de cada barra se indican el número de ensayos realizados para cada tipo de producto.



Una estrategia generalmente utilizada para el control químico del fuego bacteriano en frutales de pepita consiste en distribuir, en función del producto autorizado, de tres a cuatro tratamientos durante la prefloración y floración para evitar las infecciones en flores, uno o dos tratamientos durante el crecimiento vegetativo de los brotes, otro tratamiento en otoño después de la caída de hoja y finalmente, otro en invierno, después de la poda. Durante la floración deben aplicarse con cautela los productos cúpricos debido a la posible fitotoxicidad y los tratamientos pueden efectuarse al 5%, 50% y 100% de floración, o a intervalos de cinco días cuando persisten condiciones meteorológicas favorables al desarrollo de la enfermedad (Figura 3.4).

Figura 3.4. Tratamientos de control químico durante el ciclo del fuego bacteriano en un frutal de pepita típico. En la parte exterior se indica la aparición de los diferentes síntomas (chancros, necrosis de las flores y brotes). En el interior, en forma de anillos, se indican los tratamientos en números del 1 al 8 de control químico mediante derivados del cobre (azul), kasugamicina (amarillo) y fosetil-AI (rosa). Comentarios en el texto.



3.2.2.2. Lucha biológica

Los métodos de **lucha biológica** son complementarios de los métodos de control químico y están basados en bacterias antagonistas o competidoras de *E. amylovora*. Las bacterias más utilizadas son *Pantoea agglomerans* (sinónimo de *Erwinia herbicola*) (cepas E325, EHO-10, Eh252, M232A, C9-1, NL18, 112Y, LE-15), *Pseudomonas fluorescens* (cepas A506, EPS62e) y *Bacillus subtilis* (cepas QST713, BD170, BS-F3) (Epton *et al.*, 1994; Lindow *et al.*, 1996; Cabrefiga *et al.*, 2007; Aldwinckle *et al.*, 2002; Alexandrova *et al.*, 2002; Broggin *et al.*, 2005). Las cepas de *P. agglomerans* E325 y EHO-10 y *P. fluorescens* A506 han sido objeto de numerosos estudios, incluidos los de campo, y se comercializan en algunos países como en Estados Unidos. La cepa de *P. fluorescens* EPS62e aislada de peral Conferencia en España ha sido desarrollada por la Universidad de Gerona, y ha sido también objeto de diversos estudios, disponiendo de una formulación deshidratada que ofrece resultados prometedores en nuestras condiciones agroclimáticas (Cabrefiga *et al.*, 2002, 2007; Pujol *et al.*, 2005, 2006, 2007). En Europa, la cepa de *B. subtilis* QST713 está registrada para diferentes usos. Existen además numerosas cepas de *B. subtilis* que se comercializan en Italia, Suiza y Alemania. Cabe destacar que los productos biológicos sólo son

efectivos cuando se aplican durante la floración, ya que su actividad se basa en impedir la infección-colonización de flores y estructuras juveniles por *E. amylovora* y, por lo tanto, las dosis de aplicación efectivas están en el rango de 10^7 a 10^8 ufc/ml. Es precisamente en la época de floración cuando la mayoría de los productos químicos resultan más fitotóxicos y los métodos de control biológico tienen más sentido. Los métodos de lucha biológica ofrecen buenas expectativas comerciales, pero presentan una cierta inconsistencia en cuanto a eficacia, limitada supervivencia del agente de control biológico y baja compatibilidad con otros métodos químicos. No obstante, estos problemas se están resolviendo mediante mejora fisiológica utilizando procedimientos de osmoadaptación y formulación adecuada, así como empleando mezclas de cepas que presentan un efecto sinérgico (Bonaterra *et al.*, 2007).

3.2.2.3. Lucha biotécnica

Respecto a la **lucha biotécnica**, se han ensayado **metabolitos producidos por microorganismos antagonistas de *E. amylovora*, extractos de plantas o péptidos antimicrobianos**. Entre dichos productos se destacan las bacteriocinas producidas por enterobacterias como cepas de *E. herbicola* (Jabrane *et al.*, 1996), enzimas derivados de virus bacteriófagos de *E. amylovora* que afectan específicamente al exopolisacárido amylovorano, que es un factor de virulencia en el patógeno (Deckers *et al.*, 1990), aceites esenciales o terpenos y compuestos complejos de extractos de hiedra y otras plantas (Mosch y Zeller, 1989; Mosch *et al.*, 1993; Scortichini y Rossi, 1993). Sin embargo, ninguno de estos métodos ha mostrado eficacia suficiente para ser considerados con buenas expectativas de futuro. Recientemente, se han descrito péptidos antimicrobianos sintéticos que poseen una eficacia comparable a los antibióticos en el control de fuego bacteriano en condiciones de ambiente controlado (a concentraciones de 50-100 ppm), pero que no se han ensayado todavía en campo. Se trata de undecapéptidos lineales y ciclodecapéptidos diseñados específicamente basándose en péptidos antimicrobianos naturales presentes en las plantas, animales o microorganismos que ofrecen expectativas muy interesantes. Sin embargo, todavía es necesaria investigación adicional, sobre todo a nivel de producción y formulación, para poder realizar ensayos de campo que permitan su evaluación en el control del fuego bacteriano (Ferré *et al.*, 2006; Monroc *et al.*, 2006 a, b; Badosa *et al.*, 2007).

3.2.2.4. Termoterapia

También se han ensayado métodos dirigidos al control del patógeno en material vegetal destinado a propagación como es el caso de la **termoterapia** (Keck *et al.*, 1995). Esta técnica se ha aplicado a **plantones de frutales y de plantas ornamentales**, mediante tratamientos con calor seco a 45°C durante 60 minutos, disminuyendo muy significativamente la población de una cepa avirulenta de *E. amylovora* inoculada artificialmente y con el mínimo efecto en la viabilidad (brotación) del material vegetal (Ruz *et al.*, 2003). Sin embargo, este método es todavía experimental y hay que realizar el proceso con mucho cuidado para no producir efectos negativos irreversibles en el material vegetal.

3.2.2.5. Variedades transgénicas

La problemática de control del fuego bacteriano, al igual que en otras enfermedades de las plantas, se ha abordado desde la perspectiva del desarrollo de **variedades transgénicas**. Se

han obtenido variedades de manzano (Royal Gala y Galaxy) y de peral con niveles de resistencia a fuego bacteriano significativos (Norelli *et al.*, 1999; Norelli *et al.*, 2003; Malnoy *et al.*, 2004). Dicha resistencia se consigue mediante la introducción y sobreexpresión de genes que codifican para la síntesis de péptidos-proteínas antimicrobianas como atacina y lisozima, depolimerasas de bacteriófagos que degradan la cápsula de *E. amylovora*, y harpinas que estimulan la respuesta defensiva en el hospedador. Aunque algunas de estas variedades ya se han estudiado desde diferentes aspectos tanto genéticos como agronómicos, tras evaluaciones de cuatro a cinco años en parcelas en producción, **ninguna de ellas está disponible en el mercado ni está autorizada en Europa.**

3.2.2.6. Medidas agronómicas

Finalmente, las medidas de tipo agronómico pueden resultar un **complemento de todas las anteriores, especialmente cuando la enfermedad ya se ha establecido en una zona y se requieren medidas de convivencia.** Entre las recomendaciones más adecuadas cabe citar: evitar el excesivo vigor mediante limitación del abonado nitrogenado; controlar las refloraciones de otoño a que son propensas algunas variedades y que son inducidas por algunos reguladores de crecimiento; eliminar y destruir mediante fuego las plantas afectadas y evitar la poda en verde, realizándola durante la dormancia invernal.

BIBLIOGRAFÍA

- ALDWINCKLE, H.S., BHASKARA REDDY, M.V., NORELLI, J.L. 2002. Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Horticulturae*, 590: 325-331.
- ALEXANDROVA, M., BAZZI, C., LAMERI, P. 2002. *Bacillus subtilis* strain BS-F3: colonization of pear organs and its action as a biocontrol agent. *Acta Horticulturae*, 590: 291-297.
- BADOSA, E., FERRÉ, R., PLANAS, M., FELIU, L., BESALÚ, E., CABREFIGA, J., BARDAJÍ, E., MONTESINOS, E. 2007. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides*, 28: 2276-2285.
- BEER, S.V. 2002. Fire Blight: 61-63. En: *Compendium of Apple and Pear Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. ISBN: 0-89054-109-4.
- BILLING, E. 1990. Fire blight concepts and a revised approach to risk assessment. *Acta Horticulturae*, 273: 163-170.
- BILLING, E. 1992. Billing's revised system (BRS) for fire blight risk assessment. *OEPP/EPPO Bulletin*, 22: 1-102.
- BILLING, E. 1996. BIS95, an improved approach to fire blight risk assessment. *Acta Horticulturae*, 411: 121-126.
- BONATERRA, A., CABREFIGA, J., CAMPS, J., MONTESINOS, E. 2007. Increasing survival and efficacy of a bacterial biocontrol agent of fire blight of rosaceous plants by means of osmoadaptation. *FEMS Microbiology Ecology*, 61: 185-195.
- BRISSET, M.N., CESBRON, S., THOMSON, S.V., PAULIN, J.P. 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 529-536.
- BROGGINI, G.A.L., DUFFY, B., HOLLIGER, E., SCHARER, H.J., GESSLER, C., PATOCCHI, A. 2005. Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro (R)) in a Swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 93-100.
- CABREFIGA, J., BONATERRA, A., MONTESINOS, E. 2002. Prospección, selección y ensayos de control biológico del fuego bacteriano mediante bacterias antagonistas. *Phytoma España*, 144: 95-98.
- CABREFIGA, J., MONTESINOS, E. 2005. Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology*, 95: 1430-1437.
- CABREFIGA, J., BONATERRA, A., MONTESINOS, E. 2007. Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *International Microbiology*, 10:123-132.
- CHIOU, C.S., JONES, A.L. 1991. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 81: 710-714.
- DECKERS, T., PORREYE, W., MARTENS, P.H. 1990. Three years of experience in chemical control of fire blight in pear orchards in Belgium. *Acta Horticulturae*, 273: 367-376.
- EPTON, H.A.S., WILSON, M., NICHOLSON, S.L., SIGEE, D.C. 1994. Biological control of *Erwinia amylovora* with *Erwinia herbicola*: 335-352. En: Blakeman J.P., Williamson B.

- (eds.). *Ecology of Plant Pathogens*. CAB International Biddles, Guilford. ISBN: 0851988768.
- FERRÉ R., BADOSA E., FELIU L., PLANAS, M., MONTESINOS, E., BARDAJÍ, E. 2006. Inhibition of plant pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3302-3308.
- JABRANE, A., LEDOUX, L., THONAR, T., DECKERS, T., LEPOIVRE, P. 1996. The efficacy in vitro and in vivo of bacteriocin against *Erwinia amylovora*: Comparison of biological and chemical control of fire blight. *Acta Horticulturae*, 411: 355-359.
- JACQUART-ROMON, C., PAULIN, J.P. 1991. A computerized warning system for fire blight control. *Agronomie*, 11: 511-519.
- JOHNSON, K.B., STOCKWELL, V.O. 1998. Management of fire blight: A case study in Microbial Ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 227-248.
- KECK, M., R CHARTIER, W., ZISLAVSKY, P., LECOMPTE, P., PAULIN, J.P. 1995. Heat treatment of plant propagation material for the control of fire blight. *Plant Pathology*, 44: 1-24.
- KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., HERZOG, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 439-459.
- LINDOW, S.E., MCGOURTY, G., ELKINS, R. 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury. *Phytopathology*, 86: 841-848.
- LÓPEZ, M.M., LLOP, P., RICO, A., ORTIZ, A., MURILLO, J., DONAT, V., PEÑALVER, 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., MONTESINOS, E. 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas: 515-558. En: G. LLácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello (eds). *Patología Vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología-Agrupupli. Vol.1. ISBN: 84-921910-07.
- LÓPEZ, M.M., MONTESINOS, E., LECOMPTE, P., PAULIN, J.P. 1996. El fuego bacteriano del peral, una amenaza permanente: Situación actual, epidemiología y control de la enfermedad. *Fruticultura Profesional*, 78: 79-87.
- LÓPEZ, M.M., MONTESINOS, E., SCORTICHINI, M. 1999. Problemática de las infecciones latentes de *Agrobacterium* spp., *Erwinia amylovora* y *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en viveros de frutales. *Phytoma España*, 114: 142-145.
- LLORENTE, I., BADOSA, E., VILARDELL, P., MONTESINOS, E. 2002. Epidemiological studies of Fire Blight (*Erwinia amylovora*) in Spain. *Acta Horticulturae*, 596: 535-538.
- MALNOY, M., FAIZE, M., VENISSE, J.S., GEIDER, K., CHEVREAU, E. 2004. Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. *Plant Cell Reports*, 23: 632-638.
- MAZZUCCHI, U. (ed.). 1992. *Atti delle giornate di studio sul Colpo di Fuoco da Erwinia amylovora*. Instituto di Patologia Vegetale-Università degli Studi di Bologna.
- MOLLER, W.J., SCHROTH, M.N., THOMSON, S.V. 1981. The scenario of fire blight and streptomycin resistance. *Plant Disease*, 65: 563-568.

- MONROC, S., BADOSA, E., BESALÚ, E., PLANAS, M., BARDAJÍ, E., MONTESINOS, E., FELIU, L. 2006a. Improvement of cyclic decapeptides against plant pathogenic bacteria using a combinatorial chemistry approach. *Peptides*, 27: 2575-2584.
- MONROC, S., BADOSA, E., FELIU, L., PLANAS, M., MONTESINOS, E., BARDAJÍ, E. 2006b. De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria. *Peptides*, 27: 2567-2574.
- MONTESINOS, E., LÓPEZ, M.M. 1996. Métodos de control de las bacteriosis: pp.653-678. En G. LLácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello (eds). *Patología Vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología-Agropupli. Vol.1. ISBN: 84-921910-07.
- MONTESINOS E., LÓPEZ M.M. 1998. El fuego bacteriano de las rosáceas. Situación actual y perspectivas de control. *Phytoma España*, 104: 24-36.
- MONTESINOS, E., LÓPEZ, M.M. 2000. Fuego Bacteriano (*Erwinia amylovora*): 37-40. *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 84-7114-916-8.
- MONTESINOS, E., LLORENTE, I. 1999. Evolución del fuego bacteriano y estudio preliminar de las zonas de riesgo climático en el nordeste español. *Fruticultura Profesional*, 103: 5-22.
- MONTESINOS, E., LLORENTE, I., BADOSA, E., VILARDELL, P. 2000. New disease outbreaks and epidemiological studies of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Spain. Integrated Control of Pome Fruit Diseases. *IOBC/WPRS Bulletin*, 23: 217-220.
- MONTESINOS, E., MORAGREGA, C., RUZ, L., BADOSA, E., BONATERRA, A., VILARDELL, P., LLORENTE, I., CABREFIGA, J., FRANCÉS, J. 2002. Nuevas estrategias en el control de las enfermedades bacterianas de los cultivos. *Phytoma España*, 138: 78-87.
- MONTESINOS, E., PAGÈS, J.J. 1999. El fuego bacteriano, una grave amenaza para España. *Producción y Comercio Ornamental. Extra* 99: 66-68.
- MOSCH, J., ZELLER, W. 1989. Control of fire blight with plant extracts based on resistance induction. *Acta Horticulturae*, 489: 577-58.
- MOSCH, J., MENDE, A., ZELLER, W., RIECK, M., ULRICH, W. 1993. Plant extracts with a resistance induction effect against fireblight (*Erwinia amylovora*). *Acta Horticulturae*, 338: 389-395.
- NORELLI, J., JONES, A. L., ALDWINCKLE, H.S. 2003. Fire blight management in the twenty-first century. Using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, 87: 756-765.
- NORELLI, J.L., MILLER, S.L. 2004. Using prohexadione-calcium (Apogee) to control fire blight in young apple trees. *Abstracts of the 10th International Workshop on Fire Blight*. Bologna, Italy, p. 49.
- NORELLI, J.L., BOREJSZA-WYSOCKA, E., MOMOL, M.T., MILLS, J.Z., GRETHEL, A., ALKWINCKLE, H.S., KO, K., BROWN, S.K., BAUER, D.W., BEER, S.V., ABDULKADER, A.M., HANKE, V. 1999. Genetic transformation for fire blight resistance in apple. *Acta Horticulturae*, 489: 295-296.
- OH, C.S., BEER, S.V. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters*, 253: 185-192.

- 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.
- PUJOL, M., BADOSA, E., MONTESINOS E. 2007. Epiphytic fitness of a biological control agent of fire blight in apple and pear orchards under Mediterranean weather conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 186-193.
- PUJOL, M., BADOSA, E., CABREFIGA, J., MONTESINOS, E. 2005. Development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biocontrol agent of fire blight. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 343-352.
- PUJOL, M., BADOSA, E., MANCEAU, C., MONTESINOS, E. 2006. Assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight *Pseudomonas fluorescens* EPS62e on apple by culturable and real-time PCR methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2421-2427.
- SCORTICHINI, M., ROSSI, M.P. 1993. *In vitro* behavior of *Erwinia amylovora* towards some natural compounds showing bactericidal activity. *Acta Horticulturae*, 338: 191-198.
- 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*.
- SMITH, T.J. 1993. A predictive model for forecasting fire blight of pear and apple in Washington State. *Acta Horticulturae*, 338: 153-157.
- STEINER, P. W. 1990a. Predicting apple blossom infection by *Erwinia amylovora* using the Maryblyt model. *Acta Horticulturae*, 273: 139-148.
- STEINER, P. W. 1990b. Predicting canker, shoot and trunk blight phases of apple fire blight epidemics using the Maryblyt model. *Acta Horticulturae*, 273: 149-158.
- STEINER, P. W., LIGHTNER, G.W. 1996. *MaryblytTM 4.3. A predictive program for forecasting fire blight disease in apples and pears*. University of Maryland. College Park.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B., METRAUX, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 235-270.
- RUZ, L., MORAGREGA, C., MONTESINOS, E. 2002. Ensayos de control químico del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en manzano y peral en condiciones de ambiente controlado. Eficacia de derivados de cobre, antibióticos, fosfonatos e inductores de defensa. *Phytoma España*, 142: 77-78.
- RUZ, L., MORAGREGA, C., MONTESINOS, E. 2003. Eficacia de la termoterapia en el control del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en material vegetal de propagación. *Phytoma España*, 147: 26-30.
- VAN DER ZWET, T., BEER, S.V. 1995. Fire Blight. Its nature, prevention and control: A Practical guide to integrated disease management. *United States Department of Agriculture (U.S.D.A.). Agriculture Information Bulletin*, 631, 83 pp.
- VAN DER ZWET, T., ZOLLER, B.G., THOMSON, S.V. 1988. Controlling fire blight of pear. *Plant Disease*, 72: 464-472.

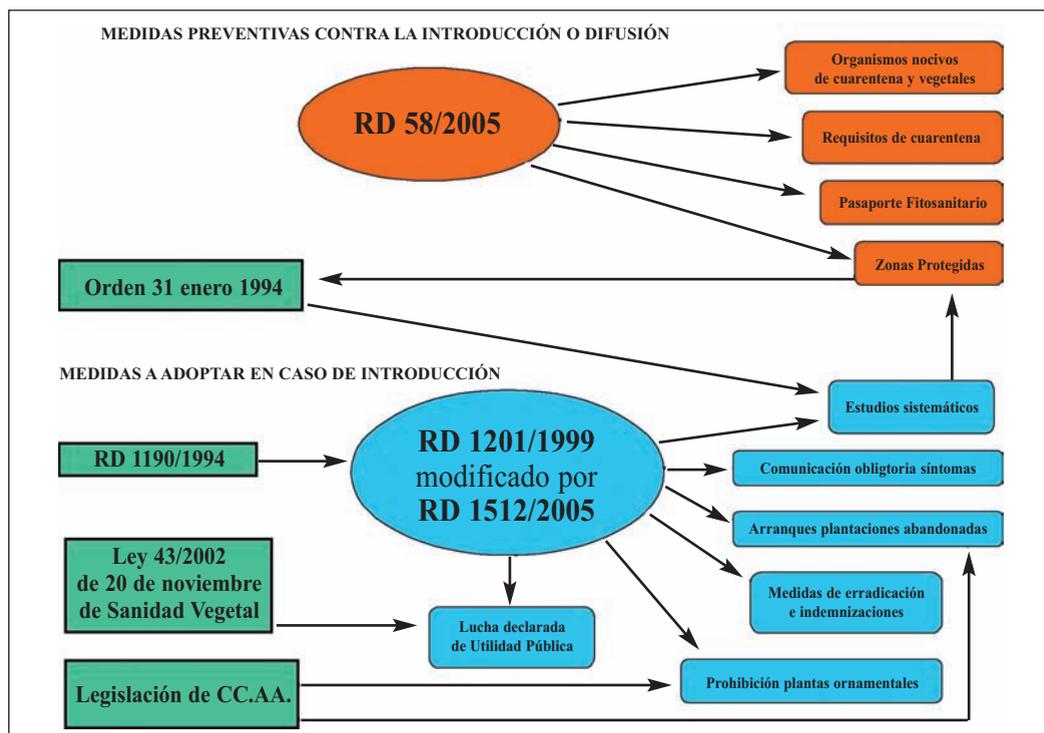
CAPÍTULO 4

LEGISLACIÓN RELACIONADA CON EL FUEGO BACTERIANO

MIGUEL A. CAMBRA¹, CARMEN DÍAZ²

A partir de 1993, con el ingreso de España en UE y la desaparición de las fronteras comunitarias, entró en vigor la legislación europea. Las prohibiciones y los controles en frontera que se venían efectuando se sustituyeron por un conjunto de medidas preventivas que persiguen evitar la introducción o difusión de *Erwinia amylovora* a través de vegetales, y adoptar medidas de erradicación y control en caso de introducción del patógeno.

Figura 4.1. Legislación relacionada con *E. amylovora*.



¹ Centro de Protección Vegetal (Gobierno de Aragón). Zaragoza.

² Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria (MARM). Madrid.

4.1. MEDIDAS PREVENTIVAS CONTRA LA INTRODUCCIÓN O DIFUSIÓN DE *E. amylovora* A TRAVÉS DE VEGETALES

El RD 2071/1993 de 26 de noviembre y sus posteriores modificaciones fueron derogadas por el **RD 58/2005** de 21 de enero (BOE núm. 19, de 22 de enero) actualmente en vigor, por el que se adoptan medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros. En esta normativa se establecen las disposiciones de régimen fitosanitario comunitario y se especifican las condiciones, los procedimientos y los trámites de carácter fitosanitario que deben cumplirse para la introducción de vegetales y productos vegetales en la Comunidad Europea o su desplazamiento en el interior de ésta. En relación con *Erwinia amylovora*, este RD contempla entre otros los siguientes aspectos:

- ***Erwinia amylovora* está considerado como organismo nocivo objeto de cuarentena** de cuya presencia se tiene constancia en la Comunidad Europea y cuyos efectos son importantes en toda ella, por lo que se prohíbe su introducción y propagación en todos los Estados Miembros si se presenta en los siguientes vegetales: *Amelanchier*, *Chaenomeles*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Malus*, *Mespilus*, *Photinia davidiana*, *Pyracantha*, *Pyrus* y *Sorbus* (Anexo II, Parte A, Sección II, Apartado b, Punto 3, página 2.601).
- Se define **Zona Protegida (ZP)** como países o zonas de un país donde un determinado organismo nocivo no es endémico ni está establecido, y donde la introducción y desplazamiento de vegetales están sometidos a unos requisitos especiales de cuarentena más severos. **Se reconoce a España como ZP con respecto a *E. amylovora***, por lo que se prohíbe su introducción y propagación si se presenta en partes de vegetales, con inclusión del polen activo para la polinización, de los 12 géneros de vegetales anteriormente citados (Anexo II, Parte B, Apartado b, Punto 2, página 2.604). Incluso queda prohibida la introducción en las Zonas Protegidas de esas plantas y polen vivo para la polinización si son originarios de países terceros no reconocidos como exentos de fuego bacteriano (Anexo III, Parte B, Puntos 1 y 2, página 2.606).
- **Los requisitos especiales o exigencias particulares de cuarentena que deben establecer los Estados Miembros para la introducción y desplazamiento por España como ZP** figuran en el Anexo IV, Parte B, Punto 21, página 2.642. Estos requisitos permiten la introducción de vegetales si son originarios de países o zonas exentas de *E. amylovora*, o de vegetales producidos o trasladados y mantenidos (al menos 7 meses, siempre y cuando esté incluido en el período 1 abril a 31 de octubre) en parcelas situadas en una denominada y reconocida oficialmente “zona tampón”, donde se realizan controles mediante inspecciones y análisis tanto de la parcela en cuestión como de los vegetales de sus alrededores. También está regulada la introducción de colmenas en España como ZP (según los requisitos del Anexo IV, parte B Sección II, punto 21.3, página 2.644).

Si España perdiera el estatus de ZP serían de aplicación otros requisitos especiales de cuarentena mucho más laxos, ya que permiten la introducción de vegetales producidos en parcelas que son inspeccionadas visualmente, con la única restricción de que los vegetales que han mostrado síntomas han sido destruidos (Anexo IV, parte A, Sección I, punto 17, página 2.612 y Sección II, punto 9, página 2.628).

- **Se establece como aval el pasaporte fitosanitario**, que debe acompañar a los vegetales y que se plasma en una etiqueta oficial que evidencia el cumplimiento de las disposiciones legales en relación con las normas fitosanitarias y requisitos especiales. Los movimientos de los vegetales huéspedes de *E. amylovora* tanto para entrar como para desplazarse por España deben acompañarse del Pasaporte Fitosanitario con el **distintivo ZP-E**, de acuerdo con el Anexo V, parte A, II, punto 1.3, página 2.652.

4.2. MEDIDAS A ADOPTAR EN CASO DE INTRODUCCIÓN DE *E. amylovora*

El RD 1190/1998 de 12 de junio (BOE núm. 141, de 13 de junio de 1998), por el que se regulan los programas nacionales de erradicación o control de organismos nocivos de los vegetales aún no establecidos en el territorio nacional, establece las normas para la elaboración, planificación, ejecución, coordinación, seguimiento y evaluación de los programas nacionales de erradicación o, si esto no fuera posible, de control de la propagación de organismos nocivos de los vegetales en el territorio español. Para ello se crea el **Comité Fitosanitario Nacional**, como un órgano de cooperación adscrito al Ministerio de Agricultura donde están representadas todas las CC.AA. Es un RD de carácter general aplicable a cualquier organismo nocivo, que sirve de base para la elaboración de un determinado programa nacional de erradicación específico de un organismo nocivo concreto.

Así, en el **RD 1201/1999** de 19 de julio (BOE núm. 184, de 3 de agosto de 1999) se establece el **programa nacional de erradicación y control de fuego bacteriano de las rosáceas**. En el año 2005, se efectuaron diversas modificaciones del RD 1201/1999 mediante el **RD 1512/2005** de 22 de diciembre (BOE núm. 312, de 30 de diciembre de 2005). Estos Reales Decretos contemplan entre otros los siguientes aspectos:

- Se declara de utilidad pública las medidas de lucha adoptadas, de acuerdo con lo establecido en la Ley 43/2002 de 20 de noviembre de Sanidad Vegetal (BOE núm. 279, de 21 de noviembre), lo que implica un mayor grado de severidad y de intervención de las medidas oficiales, así como la aplicación de diferentes ayudas e indemnizaciones. También posibilita a las CC.AA. a establecer medidas fitosanitarias adicionales.
- Considera que la enfermedad está establecida en Guipúzcoa y en el norte y centro de Navarra, por lo que estas zonas son de aplicación de medidas fitosanitarias aplicables a zonas no protegidas, como arranques y destrucción de vegetales que muestren síntomas o solo la poda de síntomas. El movimiento de vegetales debe ir acompañado del pasaporte fitosanitario ZP (según Anexo A, II, punto 1.3, página 2.652 del RD 58/2005).
- Obliga a agricultores, silvicultores, comerciantes, importadores y profesionales a notificar inmediatamente la existencia de vegetales con síntomas de fuego bacteriano. Obliga a instancias de la Administración a destruir las plantaciones abandonadas de las especies de plantas hospedantes. Para estos vegetales también obliga a conservar los documentos de compra-venta durante 3 años para poder investigar el origen del material infectado.
- Define los estudios sistemáticos necesarios para el reconocimiento por la UE de España como ZP (de acuerdo con lo previsto en la Orden de 31 de enero de 1994) (BOE núm. 33, de 8 de febrero) que consisten en:
 - Inspecciones visuales de plantas hospedantes situadas en una red de puntos e itinerarios permanente.

- Inspecciones visuales y toma de muestras en los viveros que produzcan o comercialicen vegetales hospedantes.
 - Prospecciones dirigidas en función de los análisis epidemiológicos que se realicen en cada momento para controlar movimientos de material vegetal con riesgo de estar contaminado o de las posibilidades de contaminación natural.
- Tras la confirmación oficial de un foco inicial de fuego bacteriano, se efectuará la destrucción de los vegetales infectados de forma inmediata. Se adoptarán una serie de medidas preventivas para evitar la dispersión de la enfermedad, estableciendo una **zona de seguridad** de al menos 1 km de radio donde se aplicarán una serie de medidas: arranques y destrucciones sin necesidad de análisis, prohibiciones de movimiento de vegetales y de plantación, realización de tratamientos preventivos y obligación de desinfección de herramientas. También limita el movimiento de las colmenas de abejas en un círculo de 3 km de radio desde el foco detectado. Además, obliga a una investigación del origen de la infección.
 - Establece la naturaleza y cuantía de las indemnizaciones.
 - Prohíbe la plantación de especies ornamentales hospedantes en las vías o jardines públicos de las zonas que determine cada CC.AA.

4.3. LEGISLACIÓN DE LAS COMUNIDADES AUTÓNOMAS

Basándose en los Reales Decretos 1201/1999 y 1512/2005, las Comunidades Autónomas pueden adoptar además otras medidas complementarias que refuercen los efectos que se persiguen. Concretamente, pueden determinar las zonas de riesgo donde queda prohibida la plantación de especies ornamentales, los conceptos de plantaciones en mal estado fitosanitario y abandonadas para aplicar las medidas correspondientes de arranque y destrucción, y regular el movimiento de las colmenas de abejas situadas en un círculo de 3 km de radio desde un foco. Actualmente existe la siguiente legislación autonómica:

4.3.1. ARAGÓN

Orden de 23 de febrero de 2001, del Departamento de Agricultura por la que se prohíbe la plantación de diversas especies ornamentales hospedantes del Fuego Bacteriano (**B.O.A. núm. 27, de 5 de marzo de 2001**) y corrección de errores de la ORDEN de 23 de febrero de 2001 (**B.O.A. núm. 41 de 6 de abril de 2001**).

Orden de 15 de enero de 2007, del Departamento de Agricultura y Alimentación, por la que se establecen medidas de aplicación en materia de sanidad vegetal para plantaciones de frutales (**B.O.A. núm. 9, de 22 de enero de 2007**).

4.3.2. CASTILLA Y LEÓN

ORDEN AYG/72/2008, de 15 de enero, por la que se establece el baremo de indemnizaciones derivadas de las medidas fitosanitarias adoptadas para la erradicación y control de la bacteria *Erwinia amylovora* en la Comunidad de Castilla y León (**BOC y L. núm. 17, de 25 de enero de 2008**).

Orden AYG/663/2008, de 14 de abril de 2008, de la Consejería de Agricultura y Ganadería, por la que se establecen medidas para la prevención del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en la Comunidad Autónoma de Castilla y León **(BOC y L. núm. 81, de 29 de abril)**.

4.3.3. CATALUÑA

Decreto 42/2007, de 20 de febrero, por el que se establecen medidas para la prevención del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) **(DOGC núm. 4827, de 22 de febrero)**.

4.3.4. LA RIOJA

Decreto 105/2003, de 5 de septiembre de 2003, del Consejero de Agricultura y Desarrollo Económico, por la que se prohíbe la plantación de algunas especies ornamentales en el territorio de la Comunidad Autónoma de La Rioja en el marco de la lucha contra el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) **(BOR núm. 112, de 9 de septiembre)**.

Resolución de la Dirección General del Instituto de Calidad, por la que se regula el movimiento de colmenas de abejas e las zonas de seguridad establecidas para el fuego bacteriano de las rosáceas en la Comunidad Autónoma de La Rioja **(BOR núm. 38, de 22 de marzo de 2007)**.

Orden 11/2009, de 20 de febrero de 2009, de la Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, por la que se prohíbe la plantación de algunas especies ornamentales en el territorio de la Comunidad Autónoma de La Rioja en el marco de la lucha contra el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) **(BOR núm. 27, de 27 de febrero de 2009) y corrección de errores (BOR núm 33, de 11 de marzo de 2009)**.

4.3.5. NAVARRA

Orden Foral, de 28 de julio de 1997, del Consejero de Agricultura, Ganadería y Alimentación, por la que se dispone la adopción de medidas contra el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en el territorio de la Comunidad Foral de Navarra **(BON núm. 93, de 4 de agosto)**.

Decreto Foral 46/1999, de 15 de febrero, por el que se prohíbe la plantación del género *Pyracantha* en el territorio de la Comunidad Foral de Navarra y se limita la trashumancia de colmenas, en el marco de la lucha contra el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) **(BON núm. 26, de 1 de marzo)**.

Decreto Foral 280/2002, de 30 de diciembre, por el que se aprueba el reglamento de ayudas estatales de la Comunidad Foral de Navarra al sector agrario **(BON núm. 26, de 28 de febrero de 2003)**.

