

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS



INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL Y BIOTECNOLOGÍA



INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE
AISLADOS ESPAÑOLES DE *Erwinia amylovora***

Memoria presentada por:

MARÍA VICTORIA DONAT LUIS

Para optar al grado de:

**DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA DE VALENCIA**

Directoras:

Dra. MARÍA MILAGROS LÓPEZ GONZÁLEZ

Dra. ELENA GONZÁLEZ BIOSCA

Valencia, 2004

Fotografías portada y contraportada: V. Donat

D^a María Milagros López González, Doctor Ingeniero Agrónomo, del Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, y D^a Elena González Biosca, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular de Universidad del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN:

Que D^a María Victoria Donat Luis ha realizado bajo su dirección, en el Laboratorio de Bacteriología de Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, el trabajo que, con el título "Caracterización fenotípica y genotípica de aislados españoles de *Erwinia amylovora*", presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 22 de Noviembre de de 2004.

Dra. María Milagros López González

Dra. Elena González Biosca

A mi madre, mi primera maestra.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Florentino Juste, Director del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, y a María Milagros López, responsable del Laboratorio de Bacteriología de dicho Instituto, la concesión de la beca que me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral. Quiero dar gracias a mis dos Directoras de Tesis: a María Milagros López (Chiqui) y a Elena González Biosca. A Chiqui, por permitirnos, a los que por aquí hemos pasado, aprender de su dilatada experiencia en Fitobacteriología y por poner a nuestra disposición los medios de que dispone el Laboratorio de Referencia que ella dirige. A Elena por su rigurosidad científica, su actitud didáctica, su trato amable y por transmitirme confianza de cara al desarrollo de mi Tesis.

También quiero agradecer la contribución de todos aquellos que, en mayor o menor medida, directa o indirectamente, han aportado algo a mi Tesis. Para empezar, a todos los compañeros de “fatigas predoctorales” que tan bien me comprenderán, y empiezo por nuestro laboratorio de Bacteriología: a Paola Caruso, que desde el primer día me brindó un apoyo, una confianza, una comprensión y escucha que no me abandonaron nunca mientras ella estuvo en el IVIA; además, nos alegraba la vida a todos con su buen humor y su espontaneidad. A Pablo Llop, que ha acabado mostrándome su lado amable y colaborador, y su sentido del humor, cuando lo tiene bueno, que es...casi siempre. Gracias también a él por la parte que le toca en el cuarto capítulo de esta Tesis. A José Miguel Quesada, por hacer tan, tan fácil la convivencia en el laboratorio y ser un ejemplo en el respeto a los demás y en el trato con la gente. ¡Y por su sorprendente y afilado sentido del humor! También a Belén Álvarez por su sinceridad, generosidad y buen compañerismo. ¡Y por los buenos ratos en la sala de becarios, que han sido balones de oxígeno puro para el día a día! A Mónica Ordax le tengo que agradecer la enorme confianza que depositó en mí y en mi flaca experiencia con *Erwinia amylovora*. Espero haberle sido de ayuda y seguir siéndolo en lo que pueda... También le agradezco su consuelo en los

momentos de tristeza y aliento en los momentos de desánimo. Del vecino laboratorio de Virología e Inmunología, doy gracias a Edson Bertolini, por estar siempre, siempre, sin excepción, en buena disposición para resolver dudas (informáticas, principalmente) y ayudar de mil amores y entre bromas. ¡Y por las caipirinhas, menudo lujo! A Maite Gil, por su simpatía, animosidad y su capacidad para contagiar optimismo. Y del otro laboratorio de Virología, a Susana y Patricia por las risas durante las comidas de fiambarrera...y a todos ellos, por su amistad y los buenos momentos compartidos tanto en el IVIA como fuera de él.

Sigo dando gracias, ahora a aquellos otros con los que no he compartido "fatigas predoctorales", pero sí "laborales": de Bacteriología, a Ana Palacio, la compañera más respetuosa que he conocido nunca, buena amiga y mejor persona; a Montse Roselló, excepcionalmente cariñosa y ejemplo de fuerza de voluntad y constancia; a Javier Peñalver, que con su meticulosidad en el trabajo nos facilita la labor a los que compartimos bacteria con él, además de mostrarse comprensivo con nuestras "fatigas" de los dos tipos; a Raquel González, otra "maestra" del respeto y la convivencia y a Ester Marco-Noales, que nunca duda en sacrificar su propio tiempo para ayudar a los demás. También a Ramón, por aguantar con humor las merecidas broncas que se lleva cuando nos causa catástrofes por ir a la suya, a Carmina por haberme hablado siempre con amabilidad y a Clara por ser, en ocasiones, muy cariñosa (a pesar de sus desproporcionadas actuaciones policiales). De nuestros vecinos de Virología, a M^a Carmen Martínez, a la que jamás he conocido malos gestos o palabras. Doy gracias también a los que, en su breve paso por nuestros laboratorios, trajeron alegría, simpatía y buen compañerismo: Silvia Martín, Patricia Pinto (buena técnico de laboratorio con espíritu colaborador), Juanjo, Hélène, Jaime, Arantxa, y un largo etcétera de gente que tuvo un paso más o menos fugaz; pido disculpas a los que seguro habré olvidado nombrar.

Quiero agradecer especialmente a Margarita Rodríguez la parte que le corresponde en el cuarto capítulo de esta Tesis, así como la alegría y el humor

explosivo que nos regaló día a día durante su estancia. Le doy gracias, además, por habernos revelado algún pequeño secretillo del genoma bacteriano y por la modestia con que atesora tantos conocimientos sobre él. A Klaus Geider le agradezco su amable y atenta acogida en Alemania y la oportunidad de aprender en su laboratorio cosas que aquí no me fue posible aprender; lo primero también debo agradecerse a mis compañeros de aquel laboratorio, Vladimir Jakovljević y Heike Salm, con cuya ayuda no me sentí abandonada en ningún momento, ni en el trabajo ni fuera de él. Por otro lado, esta estancia hubiera sido inviable sin la beca que me concedió el Deutscher Akademischer Austauschdienst.

Y bueno, por qué no, también agradezco el cambio final de actitud de aquellos que me hicieron poco o nada fácil la integración y la convivencia a mi llegada al IVIA.

Gracias también a mis padres, por haber hecho posible que yo llegara hasta aquí, y esto también hay que entenderlo en su sentido más literal, ya que sin el coche, efectivamente, otro gallo hubiera cantado para poder llegar al IVIA todos los días...

Finalmente, doy gracias a los miembros del Tribunal por haber aceptado evaluar esta Tesis.

ÍNDICE

	Pág.
• RESUMEN	1
• CAPÍTULO 1: Introducción, objetivos y justificación	5
1.1. El fuego bacteriano: la enfermedad	7
1.1.1. Importancia económica y distribución mundial	8
1.1.2. Situación del fuego bacteriano en Europa y países del Mediterráneo	10
1.1.3. El fuego bacteriano en España: evolución y estado actual	11
1.1.4. Rango de hospedadores	14
1.1.5. Sintomatología	16
1.1.6. Epidemiología y ciclo de la enfermedad	18
1.1.7. Erradicación y métodos de control	21
1.1.7.1. Legislación europea y española	22
1.1.7.2. Sistemas de predicción y medidas preventivas	23
1.1.7.3. Lucha química: cobre, antibióticos y otros compuestos	25
1.1.7.4. Luchas biológica y biotécnica	28
1.1.7.5. Lucha genética: material vegetal resistente	29
1.1.8. Métodos de diagnóstico de <i>Erwinia amylovora</i>	30
1.1.8.1. Aislamiento e identificación del agente causal	31
1.1.8.2. Técnicas serológicas de detección	36
1.1.8.3. Técnicas moleculares de detección	38
1.1.8.4. Protocolos oficiales de diagnóstico	40

1.2. <i>Erwinia amylovora</i> : el agente causal del fuego bacteriano	44
1.2.1. Descripción taxonómica	45
1.2.1.1. El género <i>Erwinia</i>	45
1.2.1.2. La especie <i>E. amylovora</i>	47
1.2.2. Características generales	50
1.2.2.1. Condiciones de cultivo	50
1.2.2.2. Morfología colonial y celular	51
1.2.2.3. Movilidad	51
1.2.2.4. Envolturas celulares	52
1.2.2.5. Propiedades serológicas	53
1.2.2.6. Susceptibilidad a antibióticos	54
1.2.2.7. Sensibilidad a bacteriófagos	54
1.2.3. Características genéticas. Plásmidos	55
1.2.4. Factores implicados en el poder patógeno	58
1.2.4.1. Genes <i>hrp</i>	59
1.2.4.2. Exopolisacáridos: amilovorano y levano	61
1.2.4.3. Sideróforos: desferrioxaminas	63
1.2.4.4. Exoenzimas y toxinas	65
1.2.5. Caracterización fenotípica	66
1.2.5.1. Caracterización bioquímica y fisiológica	67
1.2.5.2. Caracterización serológica	68
1.2.5.3. Perfil de ácidos grasos y otros métodos de caracterización	69

1.2.6. Caracterización genotípica	69
1.2.6.1. PCR basada en secuencias del pEA29	70
1.2.6.2. PCR-ribotipado	70
1.2.6.3. PCR de elementos repetitivos (rep-PCR)	71
1.2.6.4. Repeticiones de secuencia corta (SSR)	72
1.2.6.5. Amplificación aleatoria de los fragmentos polimórficos de ADN (RAPD)	73
1.2.6.6. Análisis de restricción de amplificados de ADN ribosómico (ARDREA)	74
1.2.6.7. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	74
1.2.6.8. Análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	75
1.2.6.9. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)	76
1.3. Objetivos y justificación	78
• CAPÍTULO 2: <i>Erwinia amylovora</i> strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics	81
2.1. Summary	83
2.2. Introduction	84
2.3. Materials and methods	87
2.3.1. Bacterial strains and growth conditions	87
2.3.2. DASI-ELISA	90
2.3.3. PCR analysis	91

2.3.4. Growth and colonial morphology on SNA, CCT, MS, MM1Cu and MM2Cu media	91
2.3.5. Antibiotic susceptibility	92
2.3.6. Biochemical characterization	92
2.3.7. Hypersensitivity and pathogenicity tests	92
2.4. Results	93
2.4.1. Characteristics of the Spanish strains	93
2.4.2. Biochemical characterization and pathogenicity of selected strains	96
2.5. Discussion	98
2.6. Acknowledgements	104
• CAPÍTULO 3: Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of <i>Erwinia amylovora</i> strains with PFGE analysis	105
3.1. Summary	107
3.2. Introduction	108
3.3. Results	109
3.3.1. General classification of <i>E. amylovora</i> strains from Europe	109
3.3.2. PFGE pattern types of <i>E. amylovora</i> strains isolated in England, France, Germany and Poland	112
3.3.3. Strains from Belgium and The Netherlands	119
3.3.4. Strains from Italy	119
3.3.5. PFGE patterns of strains from Spain	121

3.3.6. Strains with small differences to pattern types Pt1 through to Pt4	121
3.4. Discussion	122
3.5. Experimental procedures	127
3.5.1. Bacterial strains and PFGE analysis	127
3.6. Acknowledgements	128
• CAPÍTULO 4: Polyphasic analyses of Spanish strains of <i>Erwinia amylovora</i> from eight regions	129
4.1. Summary	131
4.2. Introduction	132
4.3. Materials and methods	135
4.3.1. Bacterial strains and growth conditions	135
4.3.2. Identification by DASI-ELISA, PCR and pathogenicity tests	135
4.3.3. API 20E, API 50CH, ATB G-5 and API-ZYM	136
4.3.4. BIOLOG metabolic fingerprinting	137
4.3.5. MSP-PCR, AFLP and RAPD analyses	135
4.3.6. PCR-ribotyping	138
4.3.7. Macrorestriction of genomic DNA and PFGE	138
4.4. Results	138
4.4.1. Identification by DASI-ELISA, PCR and pathogenicity tests	138
4.4.2. API 20E, API 50CH, ATB G-5 and API-ZYM	139
4.4.3. BIOLOG metabolic fingerprinting	141
4.4.4. MSP-PCR, AFLP and RAPD analyses	141
4.4.5. PCR-ribotyping	142

4.4.6. PFGE analyses	143
4.5. Discussion	148
4.6. Acknowledgements	154
• CAPÍTULO 5: A fully virulent <i>Erwinia amylovora</i> strain carrying no plasmid pEA29 isolated in nature	155
5.1. Summary	157
5.2. Introduction	158
5.3. Materials and methods	159
5.3.1. Bacterial strains and culture properties	159
5.3.2. Phenotypic characterization	160
5.3.3. Molecular characterization	161
5.3.4. Plasmid and hybridization analyses	161
5.3.5. Pathogenicity and virulence assays	162
5.4. Results	164
5.4.1. Phenotypic and molecular characterization	164
5.4.2. Plasmid profiles and hybridization analyses	166
5.4.3. Pathogenicity and virulence assays	169
5.5. Discussion	172
5.6. Acknowledgements	176

• CAPÍTULO 6: Discusión general y conclusiones	177
6.1. Discusión general	179
6.2. Conclusiones	191
• BIBLIOGRAFÍA	193
• ANEJOS: Publicaciones relacionadas	213
Chronicle of a disease foretold (that advances slowly): the 2001 Spanish situation. 2002. <i>Acta Horticulturae</i> 590:35-38.	217
Characterization of an <i>Erwinia</i> sp. isolated from necrotic pear blossoms in Valencia, Spain. 2002. <i>Acta Horticulturae</i> 590:139-142.	223
A <i>Erwinia amylovora</i> strain without plasmid pEA29 isolated in a nursery from hawthorn. 2004. <i>Acta Horticulturae</i> (in press).	229
European protocol for diagnosis of <i>Erwinia amylovora</i> . 2004. <i>Acta Horticulturae</i> (in press).	237

RESUMEN

El fuego bacteriano de las rosáceas es una enfermedad de fácil diseminación y difícil control que afecta a los frutales de pepita, principalmente peral y manzano, y a plantas ornamentales. El agente etiológico de esta enfermedad es *Erwinia amylovora*, una enterobacteria considerada como organismo de cuarentena en la Unión Europea. Esta bacteria ha sido identificada en la mayoría de los países del centro y norte de Europa, y en los últimos veinte años también se ha extendido por los países del Mediterráneo. En España, se han detectado diversos focos desde 1995 en distintos hospedadores procedentes de varias Comunidades Autónomas, habiéndose aplicado programas intensivos de erradicación en casi todas ellas.

En esta investigación se ha llevado a cabo una caracterización fenotípica y genotípica de una amplia colección de aislados españoles de *E. amylovora* de diversos orígenes geográficos, hospedadores y años de aislamiento. La evaluación de los datos obtenidos, tras la realización de análisis fisiológicos, bioquímicos y moleculares de las cepas españolas, ha mostrado su escasa diversidad fenotípica y genotípica. No obstante, los resultados de la caracterización molecular mediante electroforesis en campo pulsante y otras técnicas, apoyan dos hipótesis sobre el origen y la diseminación del fuego bacteriano en nuestro país: en primer lugar, la introducción de material vegetal infectado procedente de otros países de Europa como posible responsable de varios de los focos de infección de esta enfermedad en España, y en segundo lugar, la existencia de, al menos, tres fuentes de inóculo distintas. Por otro lado, la primera descripción de una cepa de *E. amylovora* que carece del plásmido pEA29 de forma natural, representa una novedad con implicaciones importantes para el diagnóstico molecular de la

enfermedad, así como para las hipótesis acerca del papel de este plásmido en la virulencia del patógeno del fuego bacteriano.

RESUM

El foc bacterià de les rosàcies és una malaltia de fàcil disseminació i difícil control que afecta els fruiters de llavor, principalment a la perera i pomera, i a plantes ornamentals. L'agent etiològic d'aquesta malaltia és *Erwinia amylovora*, una enterobactèria considerada com a organisme de quarantena a la Unió Europea. Ha estat identificada en la majoria dels països del centre i nord d'Europa, i en els últims vint anys també s'ha estés pels països de la Mediterrània. A Espanya, s'han detectat diversos focus des de 1995 en distints hostes provinents de diferents Comunitats Autònomes, la majoria de les quals hi han aplicat programes intensius d'erradicació.

En aquesta investigació s'ha dut a terme una caracterització fenotípica i genotípica d'una extensa col·lecció d'aïllats espanyols d'*E. amylovora* de diversos orígens geogràfics, hostes i anys d'aïllament. Una vegada avaluades les dades obtingudes, després de la realització d'anàlisis fisiològiques, bioquímiques i moleculars de les soques espanyoles, s'ha observat l'escassa diversitat fenotípica i genotípica dels esmentats aïllats. Tanmateix, els resultats de la caracterització molecular mitjançant electroforesi en camp polsant i d'altres tècniques, recolzen dues hipòtesis sobre l'origen i la disseminació del foc bacterià al nostre país: en primer lloc, la introducció de material vegetal infectat procedent d'altres països d'Europa com a possible responsable de més d'un dels focus d'infecció d'aquesta malaltia a Espanya i, en segon lloc, l'existència d'almenys tres fonts d'inòcul distintes. D'altra banda, la primera descripció d'una soca d'*E. amylovora* que manca el plàsmid pEA29 de forma natural, representa

una novetat amb implicacions importants, no només per al diagnòstic molecular de la malaltia, sinó també per a les hipòtesis relatives al paper d'aquest plàsmid en la virulència del patògen del foc bacterià.

SUMMARY

Fire blight of rosaceous plants is an easy spreading and difficult to control disease, mainly affecting pear and apple fruit trees, as well as ornamental plants. *Erwinia amylovora*, an enterobacterial pathogen, is the causal agent of this disease and it is considered a quarantine organism in the European Union. This bacterium has been identified in most Northern and Eastern European countries, and in the last two decades it has also spreaded around the Mediterranean countries. In Spain, several foci have been detected since 1995 in different hosts and regions, followed by intensive eradication programs in most of the affected areas.

In this study, a phenotypical and genotypical characterization of a wide collection of Spanish *E. amylovora* isolates from different geographical origins, host and years of isolation has been carried out. The data obtained from the physiological, biochemical and molecular analysis performed have been evaluated, showing a scarce phenotypic and genotypic diversity of the Spanish strains. Nevertheless, the results of molecular characterization by means of pulsed-field gel electrophoresis and other techniques, support two hypothesis about the origin and dispersal of fire blight in our country: 1) the introduction of infected plant material from other European countries as a possible cause of several of the Spanish outbreaks and 2) the existence of, at least, three distinct sources of inoculum. On the other hand, the first report of a strain of *E. amylovora* naturally lacking pEA29 plasmid represents a novelty with important

consequences for molecular diagnosis of this disease, as well as for making hypothesis about the role of this plasmid in the virulence of the fire blight pathogen.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 1: Introducción, objetivos y justificación

1.1. El fuego bacteriano: la enfermedad

El fuego bacteriano es una de las enfermedades más graves que afectan a los frutales de pepita en el mundo. Está causado por *Erwinia amylovora*, bacteria de cuarentena en la Unión Europea (UE) que origina elevadas pérdidas económicas en los cultivos de manzano y peral en numerosas zonas frutícolas, afectando también a numerosas rosáceas ornamentales y silvestres (López *et al.*, 1987, 1996; Jones y Aldwinckle, 1990; van der Zwet y Beer, 1995; López y Montesinos, 1996; Montesinos y López, 2000). Esta enfermedad es altamente contagiosa y de difícil control una vez introducida en una zona, ocasionando la muerte progresiva de los árboles de variedades sensibles, afectando a la producción, modificando la estructura varietal del sector frutícola e incrementando los costes de producción.

Tanto agricultores como científicos coinciden en considerar el fuego bacteriano como una enfermedad única (Vanneste, 2000), por varias razones: sus efectos devastadores con un elevado impacto económico; los característicos síntomas, que permiten distinguirlo de otras enfermedades; su rápida migración en la planta, siendo capaz de destruir árboles de variedades sensibles en un periodo vegetativo; su gran capacidad de diseminación por distintos medios y de sobrevivir en los tejidos de las plantas hospedadoras; el limitado rango de hospedadores (no presenta patovares reconocidos) y, finalmente, por ocupar 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).

1.1.1. Importancia económica y distribución mundial

El fuego bacteriano no sólo es destructivo para la cosecha del año en curso, sino también para las propias plantas. Si se dan las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad durante la floración y épocas posteriores, la producción se reduce considerablemente y en algunos casos es prácticamente nula, pudiendo quedar significativamente afectada la productividad del año siguiente. La infección puede progresar tan rápidamente en variedades muy sensibles que, una vez infectado un árbol, puede morir en pocos meses. En algunas zonas de Estados Unidos y de Europa, el cultivo del peral ha sido abandonado a causa de la enfermedad, aunque la estimación precisa de las pérdidas anuales causadas por el fuego bacteriano en cada región es difícil de obtener (van der Zwet y Keil, 1979). Sin embargo, en 1998, las pérdidas en el noroeste de los Estados Unidos se estimaron en más de 68 millones de dólares (Bonn, 1999).

El fuego bacteriano se describió por primera vez en 1780 en el estado de Nueva York (USA) (Burrill, 1883; Winslow *et al.*, 1920), extendiéndose posteriormente a todas las zonas circundantes a Ontario (Canadá) y a otros estados de la zona atlántica, así como a la costa del Pacífico. La enfermedad se detectó en Japón en 1903, en Nueva Zelanda en 1919 y en Europa en 1957, en el sur de Inglaterra (van der Zwet, 2000). Posteriormente, se identificó en África hacia 1960, en el valle del Nilo en Egipto y, de nuevo en Europa, en 1966 (en los Países Bajos). En 2004, su distribución en el continente americano incluye los siguientes países: Bermuda, Canadá, Guatemala, México y Estados Unidos (van der Zwet, 2002, comunicación personal, 2004), aunque con importancia variable en los mismos (Figura 1). Actualmente, el fuego bacteriano también está presente en la mayoría de los países del centro y norte de Europa y en el

área del Mediterráneo y en los últimos años se ha extendido desde el norte de Europa y el sur del Mediterráneo hasta la franja de países antes considerados como libres de esta bacteriosis. También se ha detectado en Oriente Medio, concretamente en Armenia, Chipre, Irán, Israel, Líbano, Siria y Turquía (van der Zwet, 2002).

En la actualidad esta bacteriosis ha sido citada en 44 países, pero no ha sido descrita en zonas frutícolas del hemisferio sur como Sudáfrica, Chile, Argentina o Brasil, que son hoy en día importantes exportadores de fruta de pepita. Tampoco hay citas sobre su existencia en la mayoría de los países de América del Sur ni de África (exceptuando Egipto), ni en China (van der Zwet, 2002, comunicación personal, 2004). Tras casi 50 años de diseminación en Europa y Asia, las distintas introducciones han dado como resultado la presencia del fuego bacteriano en casi todos los países de Europa y Oriente Medio. El seguimiento de su dispersión en regiones de distintas condiciones climatológicas evidencia que esta enfermedad es considerablemente más grave en zonas templadas y húmedas, que en aquellas más frías o secas (van der Zwet, 2000).

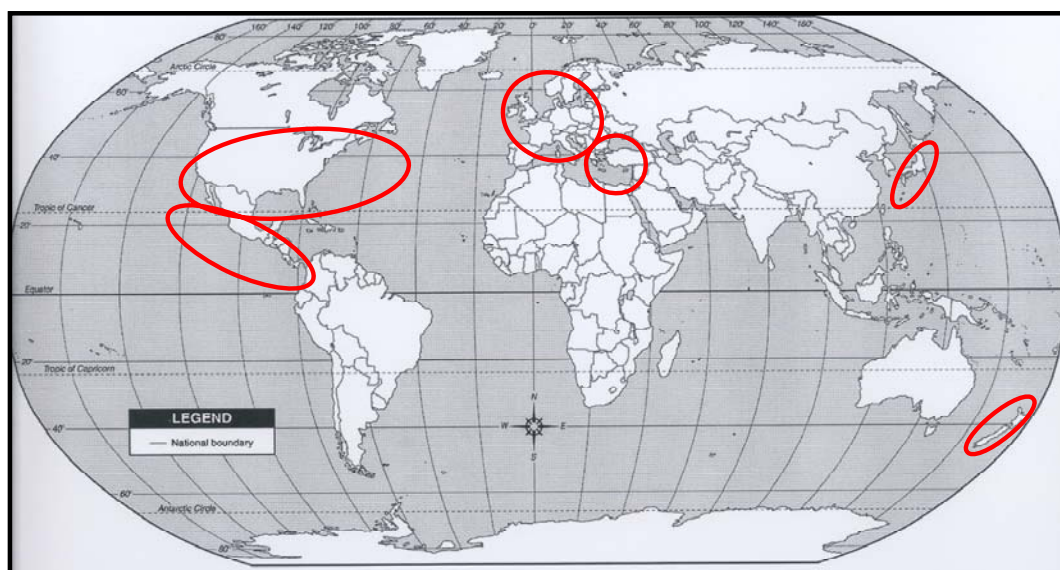


Figura 1. Distribución mundial del fuego bacteriano (Donat, 2004).

1.1.2. Situación del fuego bacteriano en Europa y países del Mediterráneo

Desde la aparición del fuego bacteriano en el sur de Inglaterra en 1957, la enfermedad fue identificada sucesivamente en los siguientes países del Centro y Norte de Europa: Holanda y Polonia (1966), Dinamarca (1968), Alemania (1971), Bélgica (1972), Francia (1972), Luxemburgo (1982), Irlanda (1986), Noruega y Suecia (1986), República Checa (1987), Suiza (1989), Austria (1993) y Moldavia (1994) (van der Zwet, 1996). Desde hace años, también se extendió por distintos países mediterráneos con características climáticas y de cultivo similares a las españolas, como Chipre (1984), Israel (1985), Turquía (1985), Grecia (1986), la antigua Yugoslavia (1990), Italia (1990), Bulgaria y Rumanía (1992) (van der Zwet, 1996) y Hungría y Albania (1996) (van der Zwet y Bonn, 1999). Más recientemente, la enfermedad se ha detectado también en Ucrania (van der Zwet, 2002) y Eslovaquia (2003) (van der Zwet, comunicación personal, 2004). En Portugal nunca se ha detectado el fuego bacteriano, y en el resto de países europeos no ha sido declarado, aunque se sospecha su presencia en algunos de ellos.

La instauración de la enfermedad obligó, en algunos casos, a llevar a cabo una profunda reconversión varietal, como ocurrió en Francia en la década de los 80, ya que la producción de pera y manzana tuvo que convivir en muchas zonas con el fuego bacteriano. En el cultivo del peral, se llegó prácticamente a la eliminación de variedades muy sensibles, como Passe Crassane, cuya plantación se prohibió por la legislación francesa. La experiencia italiana es más reciente y la producción de pera se concentra principalmente en la región de Emilia-Romagna, estando dominada por material muy sensible, con la variedad Abate Fetel como la más abundante y también la más afectada. Estas circunstancias han provocado una evolución rapidísima de la enfermedad en la

última década, a pesar de las medidas de erradicación y control adoptadas (Montesinos y López, 1998; Montesinos *et al.*, 1999).

1.1.3. El fuego bacteriano en España: evolución y estado actual

La producción de fruta de pepita en España constituye una actividad agrícola importante, ya que representa alrededor del 30% del mercado estatal de frutas. Casi toda la producción de fruta de pepita es de manzano y peral, siendo España el segundo país europeo productor de pera y el cuarto de manzana. La mayor parte de esta producción está ubicada en el valle del Ebro y su zona de influencia, principalmente en Cataluña, Aragón y La Rioja, zonas en donde se concentra aproximadamente un 70% de la producción española (Montesinos y López, 1998). El cultivo del níspero también proporciona un elevado rendimiento económico y se concentra básicamente en la provincia de Alicante y en Andalucía. Además, la producción de plantas de vivero y ornamentales sensibles a esta enfermedad es asimismo una actividad importante del sector viverista español (Montesinos y López, 1998). Por tanto, la lucha contra esta bacteriosis es de gran interés desde el punto de vista económico, tanto por la gravedad de los daños directos que causa como por su enorme facilidad de diseminación y la escasez de métodos eficaces de control.

Desde hace años se esperaba la aparición del fuego bacteriano en España, debido principalmente a la proximidad de los focos del sur de Francia, detectados en 1978, y a la gran cantidad de importaciones de plantones de frutales y planta ornamental, procedentes de países donde está presente esta enfermedad (López *et al.*, 1987). Por este motivo, en España se trabajó activamente desde 1993 para evitar su introducción, tomando distintas medidas: legislación nacional, información de los riesgos y análisis

de plantas importadas (López *et al.*, 1996, 1999a). Desde 1993 España se consideró un país protegido del fuego bacteriano, de acuerdo con la legislación de la UE (López *et al.*, 1996, 1999a). En este mismo año, se estableció una red de vigilancia con inspecciones anuales y análisis de muestras sospechosas, enviándose anualmente los resultados a la Comisión Europea. No obstante, en agosto de 1995 se detectó un foco de fuego bacteriano por primera vez en España, en Lezo (Guipúzcoa) en manzanos de sidra a 10 Km. de la frontera con Francia. Posteriormente, la enfermedad se detectó en el noroeste con la aparición de 25 focos declarados en 1996 y 66 en 1997 en esta provincia, que se debieron en su mayor parte a infecciones en manzanos de sidra. Desde entonces, se desconoce el estado exacto de la situación del fuego bacteriano, aunque se sospecha que está extendido por la provincia de Guipúzcoa, y más recientemente (desde 1999) aparecieron focos en Vizcaya en diversas fincas de peral Conference (López *et al.*, 1999a, 2002a), y en Álava a partir de 2000.

En Navarra se detectó en 1996 y, más tarde, se encontraron más focos en el norte y centro de esta Comunidad, siendo *Pyracantha* una de las especies más afectadas. En la zona norte se detectaron numerosos focos en diez municipios del valle de Baztán. En la zona de Pamplona, se describieron también múltiples focos en la ciudad de Pamplona y en más de veinte municipios. No obstante, una activa erradicación ha permitido limitar el avance de la enfermedad y evitar, de momento, su desplazamiento hacia la zona sur, que es la zona con mayor abundancia de frutales sensibles (Montesinos y López, 1998).

En Castilla-León, también se detectaron y erradicaron focos en un vivero de Segovia en 1996, y otros en 2000. En Castilla-La Mancha, se detectó el fuego bacteriano en otro vivero en Guadalajara, en 1998, en el que se vieron afectados *Crataegus* y diversas rosáceas, incluidos frutales. En este último caso, la situación ha

sido más grave en cuanto a su alcance y han aparecido nuevos focos en 1999 y en 2000. Igualmente se detectó la enfermedad en el año 2000 en setos de *Pyracantha* cerca de Madrid en la M30, habiendo sido todos ellos erradicados (López *et al.*, 1999a , 2002a).

En Cataluña, se diagnosticó el fuego bacteriano en 1998 en Lérida y se erradicaron seis focos en diversas fincas comerciales de peral de extensión variable, una de ellas de 10 ha., situada en los términos municipales de Torreserona y Corbins. Al año siguiente, se detectaron y erradicaron ocho focos de menor alcance en fincas comerciales de peral, que parecían estar relacionados con el brote original (Montesinos *et al.*, 1999). En este caso, la rápida erradicación de la enfermedad evitó, o al menos retrasó, su extensión en esta importante zona de producción de manzana y pera. Este hecho ha sido constatado por la ausencia de focos de la enfermedad en dicha zona desde el año 2000 hasta el 2003, en el que apareció un nuevo foco en Puigcerdà, muy cerca de la frontera con Francia, que se relaciona con la diseminación de focos de dicho país.

En Aragón se detectaron focos en 1998, 1999 y 2000 en plantas ornamentales de jardines de Jaca (Huesca). En el año 2000, aparecieron diversos focos cerca de Zaragoza en la zona de Épila (Cambra *et al.*, 2004). Igualmente, en esta época se observaron diversas parcelas comerciales de peral Conference en Logroño (La Rioja) con árboles afectados y con un total de alrededor de 6 ha. arrancadas, tras lo cual no se han identificado nuevos focos (López *et al.*, 2002a).

Resulta evidente que una expansión de los focos de fuego bacteriano en la mayor zona de cultivo de frutales de pepita de España, que abarca el valle del Ebro y su zona de influencia (La Rioja, Aragón y Cataluña), podría resultar gravísima para el sector frutícola español. Como ejemplos de las consecuencias que la introducción de esta enfermedad podría suponer, cabe citar la necesaria reconversión realizada en Francia

desde que se declaró la primera epidemia en la década de los setenta, y la más reciente experiencia italiana tras la rápida diseminación de la enfermedad desde su introducción en la región de Emilia-Romagna. En la mayoría de las Comunidades Autónomas españolas se han tomado drásticas medidas de erradicación que han permitido retrasar, al menos de momento, la diseminación de *E. amylovora*. En nuestro país todavía no se han sufrido las gravísimas pérdidas económicas y la reconversión varietal que la enfermedad ha causado en otros países europeos. En consecuencia, parece claro que los esfuerzos en España deben orientarse a frenar o retrasar el avance del fuego bacteriano por todos los medios disponibles. Paralelamente, el sector debería adaptar la estructura varietal, y convendría utilizar variedades poco sensibles o tolerantes al fuego bacteriano en las nuevas plantaciones (Montesinos y López, 1998).

1.1.4. Rango de hospedadores

El fuego bacteriano ha sido descrito en más de 200 especies de plantas de 40 géneros pertenecientes a la familia de las rosáceas (van der Zwet y Keil, 1979). Pese a que no todas las rosáceas son sensibles a *E. amylovora*, las especies susceptibles deben tener en común uno o varios factores que las hacen sensibles a esta enfermedad, aunque hasta ahora no se conoce su naturaleza. La familia *Rosaceae* se divide en cuatro subfamilias según el tipo de fruto que producen: *Spiraeoideae*, *Rosoideae*, *Amygdaloideae* (*Prunoideae*), y *Maloideae* (*Pomoideae*). Los géneros más frecuentemente afectados por *E. amylovora* se encuentran dentro de ésta última y son: *Pyrus* (peral), *Malus* (manzano), *Cydonia* (membrillero) y *Eriobotrya* (níspero). Entre las plantas ornamentales y silvestres destacan los géneros *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Pyracantha*, *Photinia*, *Chaenomeles*, *Stranvaesia* y *Sorbus* (van der Zwet y Beer, 1995;

Anónimo, 2003). Dentro de la subfamilia *Rosoideae*, cabe señalar a *Rubus* como género afectado, entre otras ornamentales. La enfermedad también ha sido descrita sobre *Prunus salicina* (ciruelo japonés) (Mohan y Thomson, 1996), especie perteneciente a la subfamilia *Amygdaloideae*. En la subfamilia *Spiraeoideae* se han descrito algunas especies sensibles, pero basándose en inoculaciones artificiales (Van der Zwet y Keil, 1979).

Dentro de las especies susceptibles al fuego bacteriano existen diferencias en cuanto a sensibilidad entre variedades. Los frutales de pepita presentan una clara sensibilidad varietal diferencial (Thibault y Le Lezec, 1990; Paulin y Primault, 1993; Lecomte *et al.*, 1996) aunque en una misma variedad, los distintos factores ambientales y de cultivo pueden afectar a su susceptibilidad. Así, las variedades de manzano de consumo en fresco Fuji, Reina de Reinetas y Verde Doncella son muy sensibles; Granny Smith es medianamente sensible, y Golden Delicious, Royal Gala y Starking son poco sensibles (Montesinos y López, 1998). En manzano de sidra la sensibilidad es elevada en la variedad Avrolles, mediana en Peau de Chien y baja en Judor. En peral la mayoría de las variedades de interés comercial son muy sensibles (Alexandrine, Williams, Mantecosa Hardy, Passa Crassane, Abate Fetel, Blanquilla, Guyot, Comice, Passe Crassane, General Leclerc, Limonera y Santa María) o medianamente sensibles (Conference), y todos los portainjertos son poco sensibles. En níspero las variedades Argelino y Tanaka se han mostrado como muy sensibles (Montesinos y López, 1998).

1.1.5. Sintomatología

El nombre del fuego bacteriano responde a su síntoma más típico, que es el aspecto quemado de las partes de la planta afectadas, como consumidas por el fuego. Normalmente, los primeros síntomas se presentan en primavera, durante las épocas de floración y brotación. En primer lugar, se observa la necrosis de las flores del corimbo, que se dirige hacia el pedúnculo floral, el cual aparece ennegrecido, marchito y con aspecto húmedo. Seguidamente, el avance de la infección continúa a gran velocidad a lo largo del pedúnculo, hasta alcanzar las hojas de la base de la planta y así poder llegar hasta las demás ramas (van der Zwet y Beer, 1995; Montesinos *et al.*, 1999; Montesinos y López, 2000). También pueden ser los brotes herbáceos en crecimiento activo los que muestren síntomas en un principio, observándose pardeamiento o ennegrecimiento en las hojas afectadas (Figura 2) y, al igual que los brotes florales, también se humedecen y se marchitan. Además, muestran una pérdida de rigidez que ha llevado a denominar este síntoma como "cayado de pastor" por la forma que toman al curvarse.

El síntoma inicialmente visible en las hojas es la necrosis del nervio principal, que puede ir acompañada de otras manchas necróticas por los márgenes y la superficie de la hoja. Ambas lesiones se van extendiendo, y cuando *E. amylovora* alcanza la base de una rama, se produce rápidamente la marchitez de todas sus hojas (Figura 2). El follaje de las ramas afectadas adquiere coloración rojiza o parda en manzano, níspero, *Pyracantha*, *Crataegus* y *Cotoneaster*. Cuando el grado de humedad relativa es elevado, los brotes con síntomas pueden presentar exudados en forma de gotas y/o filamentos mucilaginosos que contienen gran número de células bacterianas (van der Zwet y Beer, 1995; Montesinos *et al.*, 1999; Montesinos y López, 2000).



Figura 2. Síntomas del fuego bacteriano: Arriba, izquierda: gotas de exudado y ennegrecimiento del nervio central en *Cotoneaster* inoculado con *E. amylovora* (Foto: INRA, Francia). Arriba, centro: chancro en tronco de peral y oscurecimiento de algunas hojas (Foto: M.M. López, España). Arriba, derecha: necrosis en brote de peral (Foto: M.A. Cambra, Centro de Protección Vegetal, Zaragoza, España). Abajo: Frutos jóvenes de peral ennegrecidos y momificados (Foto: MAPA, España).

La especie hospedadora de *E. amylovora* que muestra la sintomatología más llamativa es el peral, cuyas hojas toman un color negro o muy oscuro. Además, éstas se necrosan y desecan, aunque sin desprenderse de la rama, y permanecen de esta manera a lo largo de todo el periodo vegetativo, hasta el otoño. Los frutos presentan inicialmente un aspecto húmedo y, más tarde, necrosis y color oscuro, pudiendo desarrollar síntomas desde que empiezan a formarse hasta que comienzan a madurar. Finalmente, quedan momificados en el propio árbol y, en este estado, pueden mostrar gotas de exudado en su superficie (Figura 2). Otras partes de la planta, como el cuello y las raíces, se ven afectadas por la infección con menos frecuencia, pero cuando presentan síntomas, tiene lugar la muerte del árbol de forma rápida. La edad de la planta no importa a la hora de ser infectada por *E. amylovora*, pudiendo incluso verse afectadas desde el vivero cuando

se trata de patrones o variedades muy sensibles (van der Zwet y Walter, 1996; Montesinos y López, 2000).

1.1.6. Epidemiología y ciclo de la enfermedad

Se necesitan un hospedador susceptible y unas condiciones ambientales favorables para que *E. amylovora* desarrolle la enfermedad del fuego bacteriano. Por ello, la gravedad de la enfermedad puede ser variable de unos lugares a otros y según los años. Como condiciones favorables para la enfermedad se señalan generalmente las temperaturas de 18°C a 29°C y la presencia de elevada humedad relativa, lluvia o rocío (van der Zwet y Beer, 1995). El ciclo del fuego bacteriano ha sido descrito por diferentes autores (Jones y Aldwinckle, 1990; van der Zwet y Beer, 1995), pero existen aún algunos aspectos poco estudiados en el mismo. Se considera que se inicia en primavera, ya que las infecciones primarias se producen generalmente en esa época, a partir del inóculo de la propia plantación afectada, o de aquél procedente de otras áreas, puesto que la bacteria se puede diseminar por distintas vías (Sobiczewski *et al.*, 1997; Thomson, 2000) (Figura 3), siendo este aspecto inicial del ciclo el que mayores incógnitas plantea.

La bacteria se multiplica preferentemente en el estigma, nectarios y anteras de las flores en condiciones de humedad elevada, produciendo finalmente infecciones en flores (a través de aperturas naturales como nectarios y estomas) o, más tarde, en los extremos de brotes en crecimiento (microlesiones). A partir de estos puntos de entrada a la planta, la infección avanza en sentido descendente invadiendo posteriormente los tejidos de los pedúnculos florales, los brotes, las hojas y los frutos inmaduros. A lo largo de la progresión de la infección y de la multiplicación de la bacteria en los tejidos,

ésta produce exudados típicos que contienen grandes cantidades de células bacterianas y mucopolisacáridos que la protegen. Los exudados se observan en tejidos infectados, especialmente en condiciones de humedad relativa elevada y pueden ser transportados por los insectos, la lluvia o el viento, asegurando las primeras infecciones de las flores en primavera y las infecciones secundarias durante el resto del periodo vegetativo (van der Zwet y Beer, 1995; Thomson, 2000).

Si la planta presenta una cierta resistencia (o al final del periodo vegetativo), la progresión de la infección se detiene y la bacteria se instala en los tejidos lignificados produciendo chancros, heridas en la corteza acompañadas de necrosis del tejido cortical. Estos chancros permiten la supervivencia de una población de células viables del patógeno durante el invierno. Algunos chancros, especialmente los que presentan márgenes difusos, se activan de nuevo al principio de la primavera constituyendo el inóculo primario para el siguiente ciclo de la enfermedad. Las condiciones de mayor riesgo de ataque de fuego bacteriano en manzano y peral se dan en primavera, si los periodos lluviosos con temperaturas medias superiores a 19-20°C coinciden con la floración, ya que las flores son los órganos más sensibles. El riesgo es especialmente elevado si también cae granizo o se han producido tormentas. Las floraciones secundarias que aparecen durante el verano también pueden ser afectadas. Además, se ha demostrado la existencia de *E. amylovora* como bacteria endófitas, en distintos órganos de plantas asintomáticas en varias especies vegetales (van der Zwet y Beer, 1995).

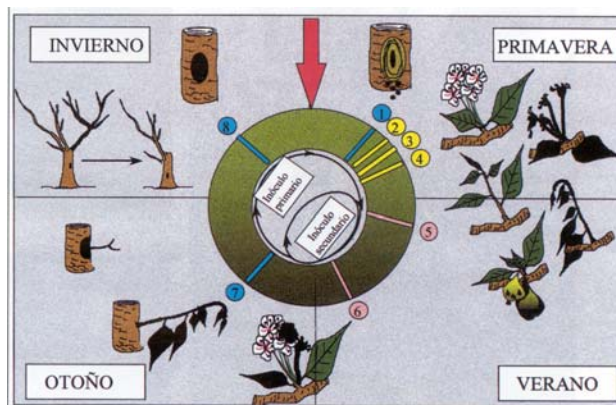


Figura 3. Ciclo del fuego bacteriano en un frutal de pepita. En la parte exterior se indica la aparición de los diferentes síntomas (chancros, necrosis de flores y brotes) (Tomado de Montesinos y López, 1998).

En la diseminación de la enfermedad se han implicado tanto factores climáticos (lluvia, viento o aerosoles), labores en las plantaciones (poda, recolección, etc.), insectos polinizadores y pájaros (Thomson, 2000). Respecto al papel de las abejas y otros insectos como vectores, se ha constatado que la supervivencia de *E. amylovora* es de sólo 48 horas en las abejas (Alexandrova *et al.*, 2002), pero puede ser de una a varias semanas en el polen, néctar y miel (Vanneste, 1996). Recientemente, se ha demostrado la supervivencia y mantenimiento del poder patógeno de esta bacteria en agua durante al menos 6 meses, lo que apoya el hecho de que el agua de riego también podría ser un reservorio y vehículo de transmisión del patógeno (Biosca *et al.*, 2004). No obstante, parece que el mayor riesgo de difusión de la enfermedad a zonas protegidas reside en la introducción de material vegetal asintomático portador de *E. amylovora* (Calzolari *et al.*, 1982; van der Zwet *et al.*, 1982; Mazzuchi, 1992; López *et al.*, 1999b) principalmente a través de material de vivero.

1.1.7. Erradicación y métodos de control

Los métodos de control del fuego bacteriano no han resultado eficaces en la mayoría de los países para evitar su extensión y erradicación (Vanneste, 2000). Una vez introducida la enfermedad en una zona, en la mayoría de los casos ha sido necesario utilizar medidas de convivencia, lo que ha obligado en las zonas afectadas a una profunda transformación del sector productivo de manzana, pera y níspero. Las medidas de control más efectivas son, sin duda, el uso de material vegetal sano (es decir, no portador de la bacteria) y de variedades poco sensibles. El Pasaporte Fitosanitario (Montesinos *et al.*, 1999), necesario para la comercialización del material vegetal sensible al fuego bacteriano en la UE, minimiza el riesgo de introducción del fuego bacteriano, pero puede no constituir una garantía total, debido a que se otorga basándose exclusivamente en la ausencia de síntomas en las plantas del sector protegido (que es el vivero) (Montesinos y López, 1998).

Durante los controles y en casos dudosos, los síntomas se confirman mediante aislamiento en cultivo del patógeno, que es una técnica cuya sensibilidad puede verse afectada por distintos factores (Ordax *et al.*, 2004). Por ello, aunque con baja frecuencia, podría ocurrir que se distribuyera planta asintomática portadora de poblaciones endófitas de *E. amylovora*. Se sospecha que estas poblaciones del patógeno podrían pasar desapercibidas durante las inspecciones visuales y análisis rutinarios de laboratorio, que se realizan casi exclusivamente mediante el cultivo del patógeno. Estas poblaciones, aunque bajas, podrían ser suficientes para iniciar infecciones una vez introducida dicha planta en una Zona Protegida (ZP), ya que se ha demostrado que la dosis infectiva media de esta bacteria en órganos sensibles es muy baja, pudiendo llegar a 10-100 bacterias viables (Mazzuchi, 1992; Cabrefiga, 2004).

1.1.7.1. Legislación europea y española

La Unión Europea (UE) publicó ya en 1977 la Directiva 77/93/CEE de 21-12-1976 sobre la circulación de organismos nocivos de las plantas. En ella se incluyó el fuego bacteriano como una enfermedad de cuarentena (presente en países de la UE, pero no en todos), imponiendo restricciones a la distribución de material vegetal procedente de zonas epidémicas y se determinaron las Zonas Protegidas (ZP) para esta enfermedad, entre las que figura todo el territorio español. Los diferentes países de la Unión que no estaban afectados, establecieron una red de supervisión, seguimiento y mantenimiento de estas zonas. De acuerdo con ello, todo material vegetal sensible a la enfermedad debe comercializarse acompañado del Pasaporte Fitosanitario con las siglas ZP (Montesinos *et al.*, 1999).

En España, la normativa de lucha contra el fuego bacteriano comenzó con una Orden Ministerial (O.M.) de 1975 sobre la prohibición de la importación de plantas de frutales de países contaminados. Posteriormente, se amplió con las siguientes normas: la O.M. de 1985; el Real Decreto (R.D.) 2071/1993; la O.M. del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del 31.1.94 en que se creó el Programa Oficial de Reconocimiento y Mantenimiento de España como Zona Protegida; y el R.D. 1190/1998 que regula los programas nacionales de erradicación y control de organismos nocivos de los vegetales no establecidos en el territorio español (Montesinos *et al.*, 1999).

En 1999, se publicó el R.D. 1201/1999 por el que se establece el Programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas, que se basa en la legislación europea, pero con modificaciones para adaptarla a la situación española. En éste se determinan como obligatorias, en zonas libres de la enfermedad, las siguientes

medidas: a) declaración oficial de la enfermedad, b) destrucción del material vegetal afectado por parte de particulares y entes públicos, y c) realización de estudios y prospecciones sistemáticas por parte de las Comunidades Autónomas. Se establecen, además, las atribuciones legales para la confirmación oficial, así como las medidas preventivas para evitar la diseminación de la enfermedad, en el caso de ser detectado un foco de fuego bacteriano, y la naturaleza de las indemnizaciones a los afectados. Finalmente, se determinan las medidas fitosanitarias obligatorias en las zonas donde la enfermedad está presente para frenar su propagación, así como la prohibición de plantación de especies ornamentales hospedadoras en vías y jardines públicos en las zonas de riesgo según determine cada Comunidad Autónoma (Montesinos *et al.*, 1999).

Más recientemente, en 2000 se publicó en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) la Directiva 2000/29/CE del Consejo, de 8 de Mayo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. Finalmente, la Ley de Sanidad Vegetal (Ley 43/2002, de 20 de noviembre de 2002) regula ampliamente aspectos generales relativos a la prevención y lucha contra plagas. Además, algunas Comunidades Autónomas españolas, como Aragón y Navarra, disponen de legislación propia para favorecer la rápida erradicación de la enfermedad en su territorio (Boletín Oficial de Aragón de 5 de Marzo de 2001 para Aragón y Orden Foral de 28 de Julio de 1997 y Decreto Foral de 15 de Febrero de 1999 para Navarra).

1.1.7.2. Sistemas de predicción y medidas preventivas

La gravedad del fuego bacteriano varía en función de las condiciones climáticas (año, zona geográfica), el hospedador (especie y variedad) y la cantidad de inóculo; por

tanto, el riesgo de infecciones no es uniforme durante todo el ciclo vegetativo de la planta (Billing, 2000). Por ello, se utilizan sistemas de predicción de riesgo de fuego bacteriano, cuyo objetivo es la determinación de los momentos y niveles de riesgo para racionalizar y aplicar selectivamente los tratamientos bactericidas o guiar los muestreos de campo (López y Cambra, 1996). La aplicación de estos sistemas permite el ahorro en el número de aplicaciones de los tratamientos químicos y, como consecuencia, una reducción en la contaminación medioambiental y/o los residuos y efectos secundarios que provoca un exceso de dichos tratamientos en los cultivos (López y Cambra, 1996).

Los sistemas de predicción se basan principalmente en la inferencia de los niveles poblacionales de la bacteria y del riesgo de infección, a partir de datos meteorológicos y fenológicos. Para ello existen dos aproximaciones: el umbral térmico y los índices de riesgo (Billing, 2000). La primera de ellas es la utilizada por el sistema americano MARYBLTY (Steiner, 1989), que estudia la superación de valores de temperatura críticos para el desarrollo de la enfermedad. La otra aproximación es la base de los sistemas de predicción más utilizados en Europa, entre ellos, el BRS de Billing (Billing, 1992), que es el más extendido y determina, entre otros factores, las duplicaciones potenciales diarias de la bacteria. Otro sistema es el PARAFEU del INRA-MétéoFrance (Paulin *et al.*, 1994), basado en el de Billing, pero que además tiene en cuenta otros factores de riesgo agronómico.

Las medidas de tipo agronómico se aplican preventivamente con el objeto de evitar la colonización bacteriana de la planta, ya que no existen tratamientos curativos de la enfermedad y son un complemento de los tratamientos químicos, especialmente cuando la enfermedad ya se ha instalado en una zona y se requieren medidas de convivencia. Dichas medidas incluyen: evitar el excesivo vigor mediante limitación del

abonado nitrogenado, controlar las refluoraciones de otoño a las que son propensas algunas variedades y que son inducidas por algunos reguladores de crecimiento, la eliminación y destrucción de las plantas afectadas y la poda sanitaria en verde o durante la dormencia invernal (Jones y Aldwinckle, 1990; van der Zwet y Beer, 1995). Los tratamientos de la enfermedad se basan en la lucha química con productos cúpricos y antibióticos, y la lucha biológica con microorganismos antagonistas, y serán explicados con más detalle a continuación.

1.1.7.3. Lucha química: cobre, antibióticos y otros compuestos

Los productos químicos se aplican para eliminar o inactivar a las bacterias fitopatógenas antes de que éstas penetren en los tejidos de la planta hospedadora, así como para que en la superficie de la planta tratada se impida el establecimiento de nuevas infecciones (Psallidas y Tsiantos, 2000). En el caso del fuego bacteriano, esto se consigue, bien eliminando la fuente de inóculo como los chancros y otros posibles hospedadores, o bien protegiendo los sitios potenciales de entrada como flores, estomas o heridas. Una vez establecida la enfermedad, los productos químicos actuales tienen escaso efecto, ya que la mayoría de los compuestos disponibles muestran débil penetración en el tejido vegetal, no actúan a nivel sistémico y, consecuentemente, sólo pueden evitar la instauración y penetración de la bacteria en la planta. El control químico del fuego bacteriano ha proporcionado resultados poco consistentes en los experimentos en campo, ya que hay diversos factores que influyen en su efectividad: el nivel de inóculo, el tiempo y los métodos de aplicación, las condiciones climáticas, la susceptibilidad de las especies vegetales o variedades hospedadoras y su estado fisiológico (Psallidas y Tsiantos, 2000).

Los compuestos químicos utilizados se dividen en cuatro grupos: productos cúpricos, antibióticos, carbamatos y compuestos misceláneos, siendo los dos primeros los más importantes en el control del fuego bacteriano del peral y el manzano. Los productos cúpricos utilizan cobre en sus diferentes formulaciones, siendo el ingrediente activo el ión cobre divalente solubilizado. Tanto los exudados bacterianos como los de la planta contienen compuestos capaces de solubilizar el cobre, y una vez formado el ión, interferirá con el metabolismo de la bacteria o causará su muerte. No obstante, estas formulaciones cúpricas presentan distintos inconvenientes, ya que son fitotóxicos, dañando hojas y frutos, además de mostrar baja persistencia y escasa penetración en la planta (Psallidas y Tsiantos, 2000). Por otro lado, no está demostrado que el cobre provoque la muerte de las células de *E. amylovora*, sino que parece inducir su entrada en el estado viable no cultivable (VBNC), efecto que requiere nuevos estudios a fin de optimizar las estrategias de control del fuego bacteriano (Ordax *et al.*, 2004).

Los antibióticos son los productos más eficaces para el tratamiento de bacteriosis en campo, pero su uso sólo está permitido en algunos países y no en la UE. Muchos antibióticos inhiben el crecimiento de *E. amylovora in vitro*, aunque sólo unos pocos son válidos para su uso en el campo, por su toxicidad para plantas o mamíferos, falta de actividad sistémica y baja persistencia. Los más utilizados son la estreptomicina, la oxitetraciclina (ambos permitidos en Estados Unidos y en otros países) y la kasugamicina (en España). Los tres cumplen los requisitos necesarios para su aplicación en campo, pero únicamente la kasugamicina, de momento, está autorizada en España (y no en el resto de los países europeos) para el control de bacteriosis en frutales.

La estreptomicina es un aminoglicósido capaz de inhibir a distintas especies de bacterias fitopatógenas Gram-positivas y Gram-negativas. Actualmente se usa en

Estados Unidos (solo o en combinación con oxitetraciclina), en Nueva Zelanda y, recientemente, en algunos países europeos y de Oriente Medio (Psallidas y Tsiantos, 2000). Aunque este antibiótico está considerado como uno de los productos más efectivos contra el fuego bacteriano, con escasa fitotoxicidad a las dosis recomendadas, su uso agrícola se ha prohibido en muchos países, debido a la aparición de aislados resistentes de *E. amylovora*, lo que explica la pérdida de eficacia del control en campo (Moller *et al.*, 1981; Chiou y Jones, 1991) y a los posibles riesgos de transmisión de la resistencia a bacterias patógenas del hombre. Es posible que dicha resistencia pudiera transferirse de *E. amylovora* a otros microorganismos de la superficie vegetal, del suelo, del agua e incluso a posibles patógenos del hombre o los animales (Jones y Schnabel, 2000, Pezzella *et al.*, 2004). Este problema dificulta en la práctica el control de la enfermedad, ya que la estreptomicina ha sido considerada como el producto más eficaz (Psallidas y Tsiantos, 2000). Sin embargo, existen regulaciones especiales en ciertos países, como Bélgica, Alemania, Grecia, Israel y Holanda, donde se permite su uso sólo durante el periodo de floración primaria. Otros antibióticos utilizados en la lucha contra el fuego bacteriano son la flumequina y el ácido oxolínico, aunque no se han revelado tan efectivos como la estreptomicina (Psallidas y Tsiantos, 2000).

Existen otros compuestos que presentan actividad en campo, aunque con resultados variables, y que han sido ensayados en distintos países, aunque su uso no parece estar extendido todavía a nivel comercial en la UE. Recientemente se ha empleado con éxito frente a microorganismos fitopatógenos el ácido S-acilbenzolar, un derivado de los benzotiadiazoles que estimula los mecanismos de defensa de la planta. Este producto, comercializado bajo el nombre de "Bion", ha mostrado cierta efectividad en el control del fuego bacteriano (Thomson *et al.*, 1999). También se ha utilizado el

fosetyl-aluminio, un fungicida sistémico que probablemente induce mecanismos de defensa en la planta hospedadora (Chase, 1993). La prohexadiona de calcio es un compuesto regulador del crecimiento de la planta que frena el crecimiento de los brotes y además impide el desarrollo del fuego bacteriano en manzano, mostrándose efectivo en árboles maduros (Norelli y Miller, 2004). La harpina, proteína desencadenante de la reacción de hipersensibilidad producida por *E. amylovora*, es capaz también de desarrollar en el hospedador la resistencia sistémica adquirida, por lo que se comercializa para el control de la enfermedad (Wei *et al.*, 1992).

1.1.7.4. Luchas biológica y biotécnica

Los métodos de lucha biológica se basan en el uso de bacterias antagonistas que son fuente de compuestos activos potencialmente útiles en el control del fuego bacteriano, o de otros microorganismos que utilizan otros mecanismos frente a *E. amylovora*. La mayoría de los productos biológicos dirigidos contra este patógeno se basa en la utilización de bacterias asociadas a plantas, como *Pantoea agglomerans* (antes *Erwinia herbicola*) o *Pseudomonas fluorescens* (Epton *et al.*, 1994; Lindow *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 2001), capaces de competir eficientemente con el patógeno. Sin embargo, su uso parece presentar algunos inconvenientes a corto plazo a nivel comercial, debido, en muchos casos, a la falta de consistencia de resultados, a la baja supervivencia del agente de biocontrol y a las limitaciones de compatibilidad con otros métodos químicos. No obstante, cuando funcionan, su eficacia es equivalente a la de los productos químicos (Montesinos *et al.*, 2002; Montesinos, 2003; Bonaterra *et al.*, 2003).

A nivel de lucha biotécnica, generalmente sólo se han ensayado *in vivo* metabolitos producidos por bacterias antagonistas de *E. amylovora* o extractos de

plantas. Cabe citar una bacteriocina producida por *Serratia plymithicum* (Jabrane *et al.*, 2002), enzimas de bacteriófagos de *E. amylovora* que afectan específicamente al amilovorano (Kim y Geider, 2000; Kim *et al.*, 2004), aceites esenciales o terpenos, y compuestos complejos de extractos de hiedra (Mosch *et al.*, 1993; Scortichini y Rossi, 1993; Vanneste y Boyd, 2002) o extractos acuosos de brotes jóvenes de peral (Jin y Sato, 2003).

1.1.7.5. Lucha genética: material vegetal resistente

La mejora genética de los cultivos es una parte importante en el control integrado de las enfermedades de especies vegetales frutales y ornamentales. En la mejora se suele utilizar la combinación de la resistencia a una enfermedad con los mejores caracteres de los cultivos susceptibles a ella, pero para conseguir resultados en plantas leñosas mediante mejora tradicional se requieren varias generaciones, de ahí la necesidad de proyectos de mejora a largo plazo, cuidadosamente diseñados (Lespinasse y Aldwinckle, 2000). Tradicionalmente, la resistencia al fuego bacteriano se ha venido estudiando en brotes o árboles en condiciones de invernadero o de campo, aunque no sólo el genotipo de la planta influye en la resistencia o las diferencias en susceptibilidad, sino también otros factores ambientales o las prácticas agronómicas (Aldwinckle y Beer, 1978). No obstante, estos experimentos en condiciones controladas constituyen una fuente de información válida, habiéndose publicado estudios sobre la resistencia al fuego bacteriano de distintas especies. En el género *Pyrus*, los genotipos se han agrupado en cuatro clases: altamente resistentes, resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles (van der Zwet y Keil, 1979).

Una aproximación mucho más rápida para la producción de material vegetal resistente al fuego bacteriano es la creación de variedades transgénicas, ya que es posible transferir genes de resistencia a esta enfermedad tanto a peral como a manzano mediante ingeniería genética (James *et al.*, 1993; Mourgues *et al.*, 1996; Malnoy *et al.*, 2004a,b), aunque todavía no se ha liberado ninguna de estas variedades para su uso comercial. Existen varios programas que usan la ingeniería genética para aumentar la resistencia al fuego bacteriano, introduciendo en la planta construcciones de ADN que contienen una región que codifica para una proteína de interés y varias secuencias reguladoras que controlan cómo, cuándo y donde se expresará la proteína en la planta (Norelli y Aldwinckle, 2000). Hasta la fecha, los genes más ampliamente estudiados y usados para la resistencia al fuego bacteriano en peral y en manzano son aquellos que codifican para péptidos antimicrobianos tales como las cecropinas y la atacina (Boman y Hultmark, 1987) y enzimas bacteriolíticos como las lisozimas (Düring, 1996). Actualmente, la tecnología para la transformación eficiente de peral y manzano está lo bastante desarrollada para obtener las líneas transgénicas de forma fiable y relativamente rápida, algunas de las cuales muestran elevada resistencia en los experimentos de campo. No obstante, su comercialización será complicada debido a los requisitos legales (Norelli y Aldwinckle, 2000).

1.1.8. Métodos de diagnóstico de *Erwinia amylovora*

Los síntomas de la enfermedad causada por *E. amylovora* no son suficientes para su diagnóstico puesto que en algunos casos pueden confundirse con los de otras enfermedades, como por ejemplo, la necrosis causada por *Pseudomonas syringae* en flores, hojas y brotes de peral. Por tanto, siempre es necesario confirmar la presencia de

E. amylovora o de algún componente específico de ésta para asegurar la fiabilidad del diagnóstico. Los métodos de diagnóstico se basan en el aislamiento de la bacteria y su identificación mediante pruebas bioquímicas, inmunodiagnóstico, amplificación génica específica y verificación del poder patógeno. La detección de *E. amylovora* mediante métodos cada vez más sensibles y fiables está suponiendo un avance importante en el establecimiento de las fuentes de inóculo y las vías de transmisión de la enfermedad, aspecto que hoy por hoy es poco conocido y sometido a bastante especulación (Montesinos y López, 1998).

1.1.8.1. Aislamiento e identificación del agente causal

Los métodos de aislamiento y obtención de cultivos puros permiten identificar los aislados bacterianos de *E. amylovora* mediante pruebas bioquímicas, fisiológicas y ensayos de patogenicidad. Estos métodos requieren un trabajo considerable y son lentos, aunque eran los únicos reconocidos para el diagnóstico fiable (Lelliot y Stead, 1987; Schaad, 1988; Jones y Geider, 2001). Previamente al aislamiento se prepara la muestra vegetal, seleccionando flores, brotes, yemas, hojas, frutos y/o el tejido subcortical que aparece tras descortezar los chancros en ramas o tallo. Tras ello, se macera en un tampón antioxidante, tampón fosfato salino o agua estéril para el aislamiento directo. Si se observa la presencia de exudados, éstos se pueden procesar directamente tras diluirlos en agua estéril o tampón (López, 2004). Antes de la siembra directa de los extractos vegetales y/o sus diluciones en medio sólido, puede realizarse un paso previo de enriquecimiento en medios líquidos selectivos y/o comunes. Este paso se recomienda especialmente para material vegetal asintomático, con el fin de favorecer la multiplicación de la población inicial cultivable de *E. amylovora* en la muestra (López

et al., 1997). Tras la siembra en medio sólido de los extractos vegetales, los exudados o los enriquecimientos, y posterior incubación a 26°C, se obtienen colonias, cuya morfología varía según el medio de cultivo empleado (López, 2004).

El aspecto de *E. amylovora* en los medios más comunmente usados para su aislamiento se describe a continuación: en el medio no selectivo B de King (KB) (King *et al.*, 1954) tiene un crecimiento rápido y las colonias son blancas, circulares, mucosas y con un diámetro de 2-5 mm a los 1-2 días (Paulin y Samson, 1973). Las colonias de *E. amylovora* se pueden distinguir de las de *Pseudomonas syringae* en el medio B de King porque ésta última produce un pigmento fluorescente visible bajo luz ultravioleta. En el medio no selectivo Agar Nutritivo Sacarosa (*Sucrose Nutrient Agar*, SNA), que contiene un 5% de sacarosa (Lelliot, 1967; Hildebrand *et al.*, 1988), *E. amylovora* tiene un aspecto muy característico, siendo las colonias blancas, mucosas, típicamente abombadas, circulares y de 3-7 mm de diámetro a los 2-3 días (Billing *et al.*, 1961). El aspecto abombado se debe a la producción del exopolisacárido levano a partir de la sacarosa presente en este medio (Figura 4). En cambio, hay que señalar que otras bacterias levano positivas, como *P. syringae*, muestran una morfología similar en SNA pero con crecimiento más lento.

El medio semiselectivo CCT (Ishimaru y Klos, 1984) es uno de los más utilizados para su aislamiento y contiene, como fuentes de carbono, sacarosa al 10% y sorbitol al 1%; como inhibidores, tergitol aniónico, nitrato de talio, cicloheximida y cristal violeta; por último, agar nutritivo. En este medio, la bacteria es de crecimiento más lento y las colonias son abombadas, de color azul violáceo pálido opalescente, superficie lisa y con un diámetro de 3-10 mm a los 2-3 días (Figura 4). El CCT muestra un buen nivel de selectividad, y aunque algunas especies asociadas a las plantas hospedadoras de *E.*

amylovora (como *Pantoea agglomerans* (antes *Erwinia herbicola*) y ciertas *Pseudomonas* spp.) crecen también en este medio, exhiben distinto aspecto colonial y su crecimiento se ve ligeramente inhibido (Ishimaru y Klos, 1984).



Figura 4. Morfología característica de *E. amylovora* en el medio SNA (izq.) y los medios semiselectivos CCT (centro) y MM2Cu (dcha.) (Fotografías: V. Donat).

Otro medio selectivo y fácil de preparar es el medio mínimo MM2Cu, en el que *E. amylovora* forma colonias mucosas de un color amarillo característico (Figura 4), que pueden ser útiles para su identificación (Bereswill *et al.*, 1998). Este medio contiene sulfato de cobre (responsable de la formación del color amarillo) y asparagina (para compensar la inhibición del crecimiento provocada por el cobre). También se usa el medio selectivo MS (Miller y Schroth, 1972), en el que forma colonias rojo-anaranjadas características como resultado de la fermentación del sorbitol al 1% con azul de bromotimol como indicador, pero es un medio caro, de preparación dificultosa y de corta duración de almacenamiento. Más recientemente, se ha descrito la utilidad del medio de diagnóstico rápido Agar Coliformes (Merck KGaA, Alemania) para *E. amylovora*, que incluye en su composición una mezcla cromogénica. En él, el patógeno del fuego bacteriano forma colonias mucosas, abombadas, blancas, brillantes y con un anillo central que se torna rojizo alrededor de las 23 h, siendo fácilmente distinguibles de las que forman otras bacterias y hongos habituales en peral en este mismo medio

(Kritzman *et al.*, 2003). Otros medios citados en la literatura (Schaad, 1988; Jones y Geider, 2001) tienen menor aplicación práctica y por ello no se comentan en este trabajo.

Las pruebas bioquímicas y fisiológicas suelen ser las primeras en realizarse con el fin de confirmar la identidad de los cultivos puros de los aislados con morfología colonial característica de *E. amylovora*. La selección de pruebas convencionales para su identificación presuntiva aparecen indicadas en la Tabla 1 (López, 2004). La identificación bioquímica se puede completar con los sistemas comerciales miniaturizados API (bioMérieux, Francia) (Figura 5), que permiten obtener un perfil típico con las galerías API 20E y API 50CH, en las que se ensayan, respectivamente, veinte reacciones bioquímicas y la utilización de cincuenta carbohidratos y derivados (heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos). Las galerías API-ZYM proporcionan un espectro característico de hasta 19 actividades enzimáticas del microorganismo estudiado, que puede ser útil en la identificación de *E. amylovora*. Otro método de identificación, en este caso automatizado, es el sistema BIOLOG (Biolog Inc., USA), basado en la utilización de 95 fuentes de carbono en una sola microplaca (Figura 5).



Figura 5. Pruebas miniaturizadas para la identificación bioquímica del patógeno del fuego bacteriano: API ZYM (izq.), API 20E (centro) y BIOLOG (dcha.) (Fotografías: V. Donat).

Tabla 1. Pruebas básicas para la identificación preliminar de *E. amylovora* (López, 2004).

Prueba	Resultado esperado
Tinción de Gram	-
Producción de levano	+
Producción de pigmento fluorescente en King B (bajo UV)	-
Metabolismo oxidativo/fermentativo (O/F)	O+/F+
Oxidasa de Kovac	-
Reducción de nitratos	-
Utilización de citrato	+
Crecimiento a 39°C	-
Licuefacción de gelatina	+
Producción de ureasa	-
Producción de indol	-
Sustancias reductoras de la sacarosa	+
Producción de acetoina	+

La verificación del poder patógeno de la bacteria en plantas o frutos inmaduros de especies susceptibles es una prueba adicional, pero imprescindible para su correcto diagnóstico, ya que otros ensayos (como el de la reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco) también son positivos para muchas otras bacterias fitopatógenas (Figura 6).



Figura 6. Verificación del poder patógeno de *E. amylovora* en brotes de peral (arriba, izq.) y reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (arriba, dcha.). Ensayos de patogenicidad en frutos inmaduros de especies hospedadoras de *E. amylovora* (abajo): pera (izq.), níspero (centro) y no hospedadoras: albaricoque (dcha) (Fotografías: V. Donat).

1.1.8.2. Técnicas serológicas de detección

Los métodos serológicos son necesarios para confirmar el diagnóstico de *E. amylovora* (López *et al.*, 1987; López y Cambra, 1996), ya que se trata de una bacteria muy homogénea desde el punto de vista serológico (Gorris *et al.*, 1996a,b). La técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), en sus diferentes variantes, es la que se utiliza rutinariamente para la detección y diagnóstico de *E. amylovora* (Sobiczewski *et al.*, 1997). Presenta la ventaja de que, con anticuerpos altamente específicos, como los monoclonales (*monoclonal antibodies*, M_{Ab}), se puede emplear directamente sobre material vegetal, en presencia de otras bacterias saprofitas de la planta, y permite el procesado rápido y automático de un gran número de muestras.

Otra técnica para la detección del patógeno del fuego bacteriano es la inmunofluorescencia (IF), que permite visualizar en el microscopio óptico, con epiluminación ultravioleta, las células individuales marcadas específicamente. Las células bacterianas se observan de color verde si se utiliza isotiocianato de fluoresceína como marcador de los anticuerpos, o de color rojo si se utiliza rodamina. La IF ha sido aplicada a *E. amylovora* con una mezcla de M_{Ab} específicos de esta bacteria (Hutschemackers *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1987), aunque también se han utilizado M_{Ab} únicos para evitar en lo posible las reacciones cruzadas (Gorris *et al.*, 1996a). Su sensibilidad es relativamente elevada (generalmente, 10^3 - 10^4 ufc/ml) y los resultados son más subjetivos que en la técnica ELISA, en la que se obtienen valores de densidad óptica. Otras alternativas para la visualización *in situ* de las células bacterianas al microscopio son *Immuno gold staining* (IGS) e *Immuno gold silver staining* (IGSS) (Van Laere *et al.*, 1985), que presentan la ventaja de un marcado permanente. Otro método serológico utilizado en la identificación de *E. amylovora* es el ensayo de

aglutinación en porta (Lelliot, 1967), basado en la elevada homogeneidad de los antígenos termoestables (lipopolisacáridos, LPS) de esta bacteria. En las reacciones positivas, las suspensiones bacterianas ensayadas aglutinan con el antisuero y se pueden observar a simple vista. Dado que la sensibilidad de esta técnica es muy baja, se requieren elevadas concentraciones bacterianas y generalmente no puede ser utilizada para la detección de la bacteria en material vegetal.

Los métodos serológicos, cuando se usan anticuerpos policlonales, pueden presentar reacciones cruzadas con otras bacterias presentes en las muestras, creando problemas de especificidad que sólo pueden ser resueltos con el uso de M_{Ab} . McLaughlin *et al.* (1989) utilizaron una mezcla de M_{Ab} específicos obteniendo una sensibilidad de 10^5 - 10^6 ufc/ml mediante DAS-ELISA (*Double antibody sandwich ELISA*). Gugerli y Gouk (1994) encontraron que gran parte de estos M_{Ab} presentaban reacciones cruzadas con *Pantoea agglomerans* (antes *Erwinia herbicola*), aunque permitían distinguir a *E. amylovora* de otros géneros de bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Posteriormente, Gorris *et al.* (1996a,b) obtuvieron varios M_{Ab} (usando exopolisacáridos y células enteras no capsuladas como antígenos de *E. amylovora*). Los anticuerpos obtenidos fueron, en su mayoría, específicos para *E. amylovora*, lo que permitió la detección de dicha bacteria con una sensibilidad de 10^5 ufc/ml mediante DAS-ELISA (*double antibody sandwich indirect ELISA*).

En los Laboratorios de Bacteriología y de Virología e Inmunología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) se ha desarrollado uno de los métodos serológicos más sensibles y específicos para la detección de *E. amylovora*: DAS-ELISA-enriquecimiento (ELISA indirecto de doble *sandwich* de anticuerpos), que

permite la detección de 10 ufc/ml (Gorris *et al.* 1996a,b). Se basa en una etapa de enriquecimiento mediante cultivo previo en el medio selectivo CCT o el medio no selectivo B de King, y posterior inmunodetección mediante ELISA-DASI, utilizando M_{Ab} específicos frente a *E. amylovora* (Gorris *et al.*, 1996a,b). Este sistema está disponible comercialmente en forma de estuche completo de diagnóstico (PlantPrint Diagnostics). En estos mismos laboratorios del IVIA se ha desarrollado además otra técnica sencilla y efectiva para la detección de *E. amylovora*: la inmunoimpresión-ELISA (Cambra *et al.*, 1996). En ésta, se utilizan membranas de nitrocelulosa para inmovilizar muestras de material vegetal fresco y tiene la ventaja de que puede ser usada incluso en condiciones de campo, sin necesidad de preparar extractos, siendo posible almacenar las membranas impresas hasta su revelado mediante ELISA con M_{Ab}. Esta técnica se recomienda para confirmar si ciertos síntomas están causados por *E. amylovora*, pero no es apropiado utilizarla con cualquier tipo de material vegetal, dependiendo del color de la impresión de dicho material en la membrana.

1.1.8.3. Técnicas moleculares de detección

Los métodos moleculares más utilizados en el diagnóstico del fuego bacteriano son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación de ADN, pudiendo ser utilizados para detección directa en material vegetal. La hibridación de ácidos nucleicos se aplicó por primera vez a la detección de *E. amylovora* en el trabajo de Falkenstein *et al.* (1988) utilizando como sonda un fragmento del plásmido de 29 kb de *E. amylovora* (pEA29). En la detección mediante PCR se pueden emplear distintas secuencias específicas de este patógeno, como las presentes en plásmido pEA29 (Bereswill *et al.*, 1992), que producen un fragmento de alrededor de 1 kb, mientras que

con otras especies del género *Erwinia* y otros géneros bacterianos asociados a plantas, los fragmentos obtenidos son de distinto tamaño.

En la búsqueda de una herramienta óptima para el diagnóstico de esta enfermedad, se han desarrollado técnicas más sensibles como una *nested*-PCR con dos pares de iniciadores, uno externo y otro interno (McManus y Jones, 1995a), basados también en secuencias del plásmido pEA29. Esta variante permite detectar hasta 20 ufc/ml en extractos de material vegetal, y es tan sensible como para poder detectar una célula de *E. amylovora* (en cultivo puro). Sin embargo, para el diagnóstico rutinario, presenta el inconveniente de las contaminaciones frecuentes al realizarse la reacción de amplificación en dos etapas. No obstante, este problema ha sido resuelto mediante el desarrollo de una *nested*-PCR en un solo tubo, desarrollada en el Laboratorio de Bacteriología del IVIA, que permite detectar el patógeno en material vegetal asintomático con una sensibilidad cercana a 1 ufc/ml en cultivo puro (Llop *et al.*, 2000). Otros métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa son la *PCR-dot blot* y la *PCR-reverse-blot*, en los que se inmoviliza el ADN en un filtro y posteriormente se realiza una hibridación (McManus y Jones, 1995a). En el primer caso, el producto de amplificación se transfiere al filtro y se hibrida con una sonda marcada, y en el segundo caso se marca el amplicón y se hibrida con el ADN inmovilizado. Ambas técnicas son menos sensibles que la *nested*-PCR, pero la primera proporciona menos falsos positivos y la segunda es útil para cultivos puros por su rapidez (McManus y Jones, 1995a).

También se utilizan secuencias del gen cromosómico *amsB* que codifica para un enzima implicado en la síntesis del amilovorano (Bereswill *et al.*, 1995), amplificándose una zona de unos 1600 pb sólo en el caso de *E. amylovora*. Otras secuencias cromosómicas empleadas son las del gen del ARN ribosómico 16S (Bereswill *et al.*,

1995), de las que se obtiene un producto de 1500 pb para *E. amylovora* y otras erwinias y bacterias fitopatógenas, aunque tras una restricción producen un patrón específico para el patógeno del fuego bacteriano. Maes *et al.* (1996) amplificaron 565 pb a partir de secuencias del gen del ARN ribosómico 23S de *E. amylovora*, mientras que con otras especies bacterianas no tuvo lugar la amplificación. Otra alternativa basada en secuencias cromosómicas la constituyen los iniciadores de Guilford *et al.* (1996) que proporcionan un producto específico de 187 pb. La sensibilidad de estos métodos se sitúa, en las mejores condiciones, alrededor de 100-1000 ufc/ml de extracto de material vegetal.

Un problema importante de la aplicación de la PCR en la detección de bacterias en material vegetal es la presencia de compuestos inhibidores como los polifenoles, que inhiben la acción de la ADN polimerasa y la hibridación durante los ciclos sucesivos de la reacción. En este sentido, se han desarrollado protocolos de extracción adaptados para procesar material vegetal (Llop *et al.*, 1999), así como combinaciones de métodos basados en la PCR y la serología para evitar o disminuir el efecto de estos inhibidores (Guilford *et al.*, 1996; Merighi *et al.*, 2000).

1.1.8.4. Protocolos oficiales de diagnóstico

Debido a las cuantiosas pérdidas económicas que ocasionan cada año los microorganismos patógenos de plantas, entre ellos *E. amylovora*, bacteria de cuarentena en la UE y en los países de la Organización Europea de Protección de las Plantas (OEPP), se han desarrollado protocolos de cuarentena, como el publicado en 1992 por la OEPP, sobre métodos de muestreo y ensayos para la detección de *E. amylovora* que sólo incluía como técnicas de detección el aislamiento y la IF (Anónimo, 1992).

En general, la sensibilidad de los métodos de detección de *E. amylovora* en material vegetal, teniendo en cuenta el procesado de la muestra, es variable, situándose en 10^2 - 10^3 ufc/g de peso fresco para el aislamiento directo, ELISA-DASI-enriquecimiento y PCR, dependiendo de la presencia y cantidad de inhibidores en la muestra. La detección por PCR es más sensible y menos laboriosa que los métodos tradicionales basados en el aislamiento en medios de cultivo, pero con el inconveniente de que no distingue entre células viables, células muertas o células viables pero no cultivables (VBNC). Además, como la distribución de la bacteria en la muestra no es homogénea, el análisis (especialmente el de plantas asintomáticas) podría dar falsos resultados negativos en el caso de infecciones latentes.

Recientemente, la UE financió el proyecto DIAGPRO (2000-2002), destinado al diseño de protocolos de diagnóstico de diversos organismos nocivos para las plantas, con el fin de estandarizar los métodos para su detección e identificación. En el marco de este proyecto, se puso a punto un protocolo de diagnóstico para *E. amylovora* en el Laboratorio de Bacteriología del IVIA, validado con ensayos interlaboratorios, y que constituirá el sistema oficial de la OEPP para la detección e identificación del patógeno del fuego bacteriano (López *et al.*, 2002b, 2004; López, 2004).

Para el diseño del protocolo DIAGPRO de *E. amylovora*, se han seleccionado las técnicas más precisas y de fácil manejo así como las sondas más apropiadas, y se han optimizado los protocolos buscando las máximas sensibilidad y especificidad. Dichos procedimientos incluyen el aislamiento directo (con un paso previo de enriquecimiento para las muestras asintomáticas), así como las técnicas de inmunofluorescencia (IF), ELISA-DASI-enriquecimiento, inmunopresión-ELISA y PCR (simple y *nested*). Asimismo, se ha diseñado un esquema de detección para material vegetal, tanto

sintomático como asintomático, que incluye la identificación de la bacteria mediante caracterización fenotípica y genotípica y ensayos de patogenicidad. El protocolo desarrollado (López *et al.*, 2002b, 2004; López, 2004) se esquematiza a continuación (Figura 7) y va a ser publicado próximamente por el boletín de la OEPP, encontrándose disponible actualmente en: www.csl.gov.uk/prodserv/knowndiagproErwinia.pdf.

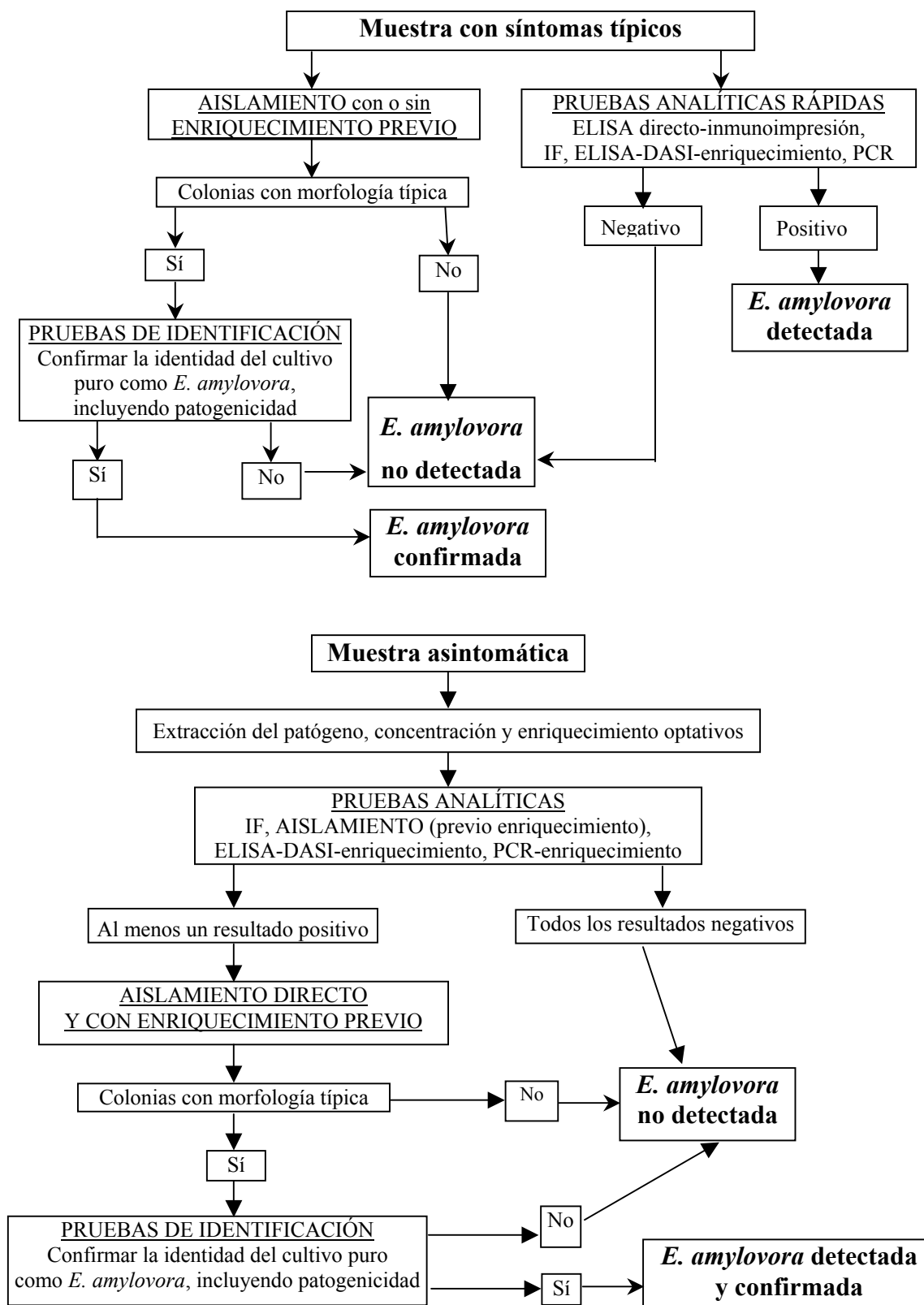


Figura 7. Diagramas de flujo para el diagnóstico del fuego bacteriano en plantas hospedadoras con y sin síntomas (López, 2004).

1.2. *Erwinia amylovora*: el agente causal del fuego bacteriano

E. amylovora es la única bacteria capaz de inducir el fuego bacteriano, 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*. Las investigaciones sobre el patógeno del fuego bacteriano en los años 80 permitieron la identificación de algunos de los factores implicados en su patogenicidad. Sin embargo, es muy significativo que, hasta ahora, ninguno de ellos puede explicar la especificidad de *E. amylovora* como patógeno vegetal de las rosáceas. Quizá sea la combinación de todos los factores de virulencia (identificados o no), la responsable de la capacidad de esta bacteria para causar la enfermedad en las rosáceas (Vanneste, 2000).

E. amylovora es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y se dispone de mucha información sobre su morfología, fisiología y características serológicas (Paulin, 2000). Aunque como patógeno no es tan bien conocida, se han identificado tres grandes grupos de genes implicados en su patogenicidad: los genes *ams*, responsables de la biosíntesis del exopolisacárido amilovorano; los genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*), necesarios para el poder patógeno y la inducción de la respuesta hipersensible; y los genes *dsp* (*disease specific*), implicados en el desarrollo de la enfermedad. Se ha identificado, de forma adicional, otro factor que interviene en la virulencia de *E. amylovora*: la producción del sideróforo desferrioxamina E. Asimismo, se ha propuesto también un papel en la virulencia para el plásmido de 29 kb de *E. amylovora* (pEA29) (Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*, 1989).

Uno de los rasgos más característicos y sorprendentes de esta especie es su gran homogeneidad, tanto a nivel fenotípico como genotípico (Vanneste, 1995). No se han

podido distinguir en *E. amylovora* subgrupos o patovares basados en el espectro de hospedadores, con una excepción: las cepas aisladas de *Rubus* parecen infectar específicamente a este género y son incapaces de causar la enfermedad en la subfamilia *Maloideae*, motivo por el cual se les denominó *forma specialis* (f.sp.) *rubi* (Starr *et al.*, 1951), aunque actualmente no es una denominación taxonómica aceptada. Otro conjunto de cepas que parece mostrar cierta especialización hacia el hospedador es el llamado grupo “Hokkaido”, formado por aislados de peral de Japón incapaces de producir la enfermedad en manzano. Se trata de cepas de *E. amylovora* que, aunque difieren de las cepas típicas de esta especie en varias características, causan fuego bacteriano propiamente dicho (Beer *et al.*, 1996; Maxon-Stein, 2003). Al margen de estas dos excepciones, la profundización en el conocimiento de la diversidad del resto de cepas de este patógeno sería de gran utilidad en el seguimiento de la propagación de *E. amylovora* en el espacio y en el tiempo. Asimismo, contribuiría a la mejora de las estrategias de control para, al menos, permitir el mantenimiento de la producción comercial de manzana y pera en las zonas donde está presente la enfermedad.

1.2.1. Descripción taxonómica

1.2.1.1. El género *Erwinia*

El género *Erwinia* fue creado en memoria del fitopatólogo Erwin F. Smith en 1920 para reunir a los bacilos Gram negativos, fermentativos, no formadores de esporas y con flagelación peritrica, responsables de importantes enfermedades en plantas (Winslow *et al.*, 1920). Los miembros de este género, además, incluían enterobacterias saprofitas ecológicamente asociadas a plantas, así como patógenos oportunistas del

hombre y animales (Brenner, 1984). Esta heterogeneidad de especies fue la causa de que el género *Erwinia* haya sido objeto de varias reclasificaciones (Waldee, 1945; Slade y Tiffin, 1984; Perombelon, 1992, 1994), ya que su definición original presentaba limitaciones y agrupaba microorganismos que no necesariamente tenían una estrecha relación filogenética. Así pues, se propuso la creación de cuatro grupos dentro de él: “*amylovora*”, que designaba a los patógenos causantes de marchitez y necrosis; “*carotovora*”, que incluía a los causantes de podredumbre blanda; “*herbicola*”, correspondiente a las bacterias saprofitas y, finalmente, las erwinias atípicas (Dye, 1968, 1969a,b,c). Posteriormente, a raíz de algunos estudios taxonómicos (Mergaert *et al.*, 1984; Verdonck *et al.*, 1987) hubo varias propuestas para fraccionar este género en varios, bien preexistentes o nuevos (Starr y Chatterjee, 1972; Starr, 1981). Más tarde el género *Erwinia* se presentó como un único grupo de 17 especies (Holt *et al.*, 1994) incluyendo algunas anteriormente situadas en los grupos “*amylovora*”, “*carotovora*” y “*herbicola*” (Lelliot y Dickey, 1984; Holt *et al.*, 1994). Otras especies del antiguo grupo “*carotovora*” se situaron taxonómicamente en el género *Pectobacterium* (Lelliot y Dickey, 1984). Asimismo, las bacterias saprofitas del antiguo grupo “*herbicola*” se clasificaron como *Pantoea agglomerans* (Holt *et al.*, 1994).

Más recientemente, el estudio de Hauben *et al.* (1998) basado en la comparación de las secuencias del ADN ribosómico 16S, propone clasificar a las especies del género *Erwinia* en cuatro grupos filogenéticos correspondientes a cuatro géneros. El grupo I corresponde al género *Erwinia* y contiene a las siguientes especies: *E. amylovora* (especie tipo), *E. mallotivora*, *E. persicinus*, *E. psidii*, *E. rhapontici* y *E. tracheiphila*. El grupo II, denominado género *Pectobacterium*, incluye las cepas pectinolíticas del antiguo grupo “*carotovora*”, que incluye las especies *P. carotovorum* subsp.

atrosepticum, *P. carotovorum* subsp. *betavasculatorum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae*, *P. cactacidum*, *P. chrysantemi* y *P. cyripedii*. El grupo III comprende el género *Brenneria* con las especies *B. alni*, *B. nigrifluens*, *B. paradisiaca*, *B. quercina*, *B. rubrifaciens* y *B. salicis*, patógenos de plantas leñosas, en las que suelen producir chancros con exudados. Finalmente, el género *Pantoea* forma el grupo IV, que contiene patógenos oportunistas de plantas, animales y del hombre.

1.2.1.2. La especie *E. amylovora*

E. amylovora es la especie tipo del género *Erwinia* y en la descripción de la especie según Lelliot y Dickey (1984) se citan las siguientes características: las colonias en agar nutritivo con 5% de sacarosa son blancas y abombadas (levano positivas) tras 2-3 días a 27°C; las formas levano negativas se aíslan raramente; es serológicamente homogénea y tiene pocos aglutinógenos en común con especies relacionadas o saprofitas presentes en material sintomático; causa el fuego bacteriano en la mayoría de especies de la subfamilia *Maloideae* y en otras subfamilias de la familia *Rosaceae*, existiendo una *forma specialis* aislada de *Rubus idaeus* (Starr *et al.*, 1951); y el porcentaje de (G+C) en el ADN oscila entre 53.6 y 54.1.

En la caracterización bioquímica de Holt *et al.* (1994) se proponen siete características de cultivo y fisiológicas, de entre las 28 usadas para el género, que distinguen a esta especie de otras erwinias: movilidad mediante flagelación peritrica, crecimiento anaeróbico débil, crecimiento mucoso, producción de sustancias reductoras de sacarosa, producción de acetoína, licuefacción de gelatina y un requerimiento de ácido nicotínico en medio mínimo (Tabla 2). En cuanto a producción de ácido a partir

de compuestos orgánicos, la reacción es positiva para fructosa, galactosa, glucosa, ribosa, sacarosa y trehalosa (Tabla 2). Como fuentes de carbono y energía, *E. amylovora* utiliza citrato, formato y lactato, pero no tartrato, galacturonato ni malonato (Holt *et al.*, 1994). Esta descripción fue posteriormente suplementada por Rijckaert (1994), citado en Hauben *et al.* (1998), donde indica que las cepas hidrolizan esculina, producen ácido a partir de sorbitol, crecen con melibiosa y sorbitol como fuentes de carbono, pueden utilizar isoleucina, metionina y treonina como fuentes de nitrógeno y son sensibles a furadolizona.

En cuanto a la utilización de nitrógeno inorgánico, *E. amylovora* y otras especies de este género no reducen el nitrato a nitrito, hecho que llama la atención ya que no es la norma general en la familia *Enterobacteriaceae*. Por ello, esta característica se encuentra entre las seleccionadas para la identificación de la bacteria (Billing *et al.*, 1961; Lelliot, 1967; Paulin y Samson, 1973). Con respecto a la utilización de nitrógeno orgánico, los aminoácidos que *E. amylovora* utiliza como fuente única de nitrógeno se indican en diversos estudios taxonómicos (Slade y Tiffin, 1984; Verdonck *et al.*, 1987; Holt *et al.*, 1994), pudiendo variar los resultados según la técnica utilizada.

La única auxotrofia descrita para *E. amylovora* es el requerimiento para el ácido nicotínico (Starr y Mandel, 1950), que no es común entre las erwinias, por lo que se ha propuesto como prueba bioquímica para la caracterización de esta especie (Holt *et al.*, 1994). También se ha descrito el requerimiento de tiamina en cepas curadas del plásmido pEA29, en este patógeno (Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*, 1989).

A. Prueba		B. Producción de ácido a partir de:	
Movilidad	+	D-Adonitol	-
Crecimiento anaeróbico	débil	L-arabinosa	débil
Requerimiento de factores de	+	Celobiosa	-
Producción de pigmentos	-	Dextrina	-
Crecimiento mucoso	+	Dulcitol	-
Crecimiento a 36°C	-	Esculina	-
H ₂ S a partir de cisteína	-	Fructosa	+
Sustancias reductoras de la sacarosa	+	D-Galactosa	+
Producción de acetoina	+	D-Glucosa	+
Producción de ureasa	-	α-metil-D-	-
Degradación de pectato	-	Glicerol	-
Oxidación de gluconato	-	Mio-inositol	-
Gas a partir de D-glucosa	-	Inulina	-
Hidrólisis de caseína	-	Lactosa	-
Licuefacción de gelatina	+	Maltosa	-
Fenilalanina desaminasa	-	D-Manitol	-
Producción de indol	-	D-Manosa	-
Reducción de nitratos	-	Melecitosa	-
		Melibiosa	-
		Rafinosa	-
		L-ramnosa	-
		Ribosa	+
		Salicina	-
		D-sorbitol	débil
		Almidón	-
		Sacarosa	+
		Trehalosa	+
		D-Xilosa	-

Tabla 2. A: Características de cultivo, fisiológicas y bioquímicas de *E. amylovora* (adaptado de Holt *et al.*, 1994). **B:** Producción de ácido a partir de compuestos orgánicos, +: positivo para el 80% o más de las cepas, -: positivo para el 20% de las cepas o menos, débil: positivo para el 21-79% de las cepas (adaptado de Paulin, 2000).

Es interesante señalar que recientemente se ha descrito en Corea una nueva especie, *Erwinia pyrifoliae*, que causa necrosis y síntomas similares al fuego bacteriano en peral japonés, pero que ha mostrado ser distinta a *E. amylovora* desde el punto de vista fenotípico y genotípico (Kim *et al.*, 1999). En España, se aisló en 1999 una *Erwinia* sp. que produce necrosis en flores de peral y presenta muchas similitudes con *E. amylovora*, aunque su posición taxonómica exacta aún está por determinar (Roselló *et al.*, 2002).

1.2.2. Características generales

1.2.2.1. Condiciones de cultivo

E. amylovora puede crecer entre 3-5°C y 37°C, siendo su temperatura óptima de 25-27°C (Billing *et al.*, 1961, 1974; Paulin, 2000). Su crecimiento muestra una relación lineal con la temperatura entre 9°C y 18°C, mostrando un cambio brusco a partir de 18°C, temperatura por encima de la cual un incremento de 10°C produce un descenso moderado en el tiempo de duplicación (de 21 h a 14 h). Por tanto, es posible que este valor de 18°C sea significativo en la epidemiología de la enfermedad (Billing, 1974; Paulin, 2000). Se ha estudiado la resistencia de las células bacterianas a la alta temperatura con el intento de proponer una técnica para eliminar la contaminación interna de material vegetal mediante tratamiento térmico. Se encontró que una temperatura de 45°C durante 70 min. o 50°C durante 50 min. era suficiente para destruir cultivos de la bacteria en material vegetal naturalmente infectado (Keck *et al.*, 1995).

1.2.2.2. Morfología celular y colonial

Las células de *E. amylovora* son bacilos Gram-negativos de aproximadamente 0.3 μm \times 1-3 μm de tamaño, y en los medios con la composición adecuada para ello, se muestran rodeadas por una cápsula visible al microscopio óptico (van der Zwet y Keil, 1979).

La morfología de las colonias de *E. amylovora* depende del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento, y ya se ha descrito su aspecto en los medios más frecuentemente utilizados para el aislamiento del patógeno y el diagnóstico del fuego bacteriano (medios King B, SNA, CCT, MS y MM2Cu). En ocasiones se han observado en ciertos medios de cultivo colonias típicas y atípicas de un mismo aislado (Billing *et al.*, 1960; Paulin y Samson, 1973), siendo capaz cada tipo colonial de dar lugar al otro. Esta variabilidad de la morfología colonial puede observarse tanto en el aislamiento directo a partir de lesiones, como a partir de suspensiones bacterianas procedentes de un tipo colonial y, según Paulin y Samson (1973), este fenómeno no parece estar relacionado con diferencias fisiológicas o de patogenicidad.

1.2.2.3. Movilidad

Como la mayoría de las bacterias fitopatógenas, especialmente las del género *Erwinia*, *E. amylovora* es móvil por medio de dos a siete flagelos peritricos por célula. La movilidad en esta bacteria se ha asociado con una quimiotaxis específica, dependiente de la temperatura y el pH (Raymundo y Ries, 1980a,b), aunque no se han observado células móviles en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales infectados. En la superficie de la planta es posible que la movilidad de *E. amylovora* se exprese más fácilmente, ya que se han observado células móviles, varios días después

de su liberación desde la superficie del estigma (Thomson, 1986). Recientemente se ha descrito que en la regulación de la síntesis de los flagelos también se encuentran implicados los genes de patogenicidad de *E. amylovora* (Cesbron, *et al.*, 2004).

1.2.2.4. Envolturas celulares

Existe poca información acerca de la membrana externa de *E. amylovora*, pero se ha sugerido un posible defecto en dicha membrana y su hipotética relación con la patogenicidad (Chatterjee *et al.* 1977). Estos autores observaron una elevada susceptibilidad de las envolturas celulares de esta bacteria a los agentes surfactantes, así como la liberación espontánea de enzimas del espacio periplásmico al medio externo. Por otro lado, se ha estudiado la composición y estructura de los lipopolisacáridos (LPS) como receptores de superficie de la membrana externa para el reconocimiento específico de factores externos, habiéndose encontrado que la fracción lipídica es común para las enterobacterias (Ray *et al.*, 1986). En la fracción de carbohidratos de los LPS se ha hallado algún componente poco usual dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, así como pequeñas diferencias entre cepas patógenas y no patógenas y avirulentas de *E. amylovora* (Ray *et al.*, 1986). La presencia de una cápsula polisacáridica y su papel en la patogenicidad de *E. amylovora* se conocen desde hace tiempo (Billing, 1960; Bennet y Billing, 1978) y se tratará más adelante con más detalle. La cápsula puede estar rodeando estrechamente a la célula o estar más libre en el medio, constituyendo el material mucoso. La mayoría de los cultivos de esta bacteria exhiben una mezcla de células capsuladas y no capsuladas (Bennet y Billing, 1978) y en los exudados de las plantas, las bacterias están embebidas en un polisacárido idéntico al producido en placa (Vanneste, 1995).

1.2.2.5. Propiedades serológicas

La serología se ha usado ampliamente en la caracterización del patógeno del fuego bacteriano para el diagnóstico y la mejora de la descripción de la especie. Las técnicas de preparación del antígeno pueden variar (células bacterianas vivas, calentadas, etc.), así como las de visualización de la reacción antígeno-anticuerpo (aglutinación, inmunodifusión, etc.), pero los diversos estudios indican que *E. amylovora* es una especie serológicamente homogénea (Paulin, 2000).

Un estudio muy completo de las propiedades serológicas del género *Erwinia*, fue el de Slade y Tiffin (1984), en el que se demostró la existencia de varios antígenos en *E. amylovora*: los LPS, que pueden ser rugosos o lisos (con o sin cadena lateral, respectivamente); el antígeno termoestable GAI, considerado como un polisacárido común a todos los representantes del grupo “*amylovora*”; el antígeno TV, presente únicamente en cepas patógenas de *E. amylovora* y que probablemente forma parte de los exopolisacáridos capsulares; y por último el antígeno GAJ, detectado en el material mucoso extracelular en cultivos puros. No obstante, no se encontró relación entre las características serológicas y la patogenicidad.

Por otra parte, la comparación de las características serológicas de cepas de *E. amylovora* mediante anticuerpos monoclonales, ha puesto de manifiesto la homogeneidad de esta especie (Gorris *et al.*, 1996a,b). En la búsqueda de M_{Ab} específicos para esta especie, se han obtenido varios anticuerpos en rata y ratón, algunos de los cuales han mostrado ser bastante específicos de *E. amylovora* (Hutschemackers *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1987; McLaughlin *et al.*, 1989; Gugerli y Gouk, 1994; Gorris *et al.*, 1996a,b).

1.2.2.6. Susceptibilidad a antibióticos

El estudio más completo de susceptibilidad a antibióticos en *E. amylovora* es el de Vantomme *et al.* (1986), en el que se encontró que la mayoría de las cepas examinadas fueron sensibles a: ampicilina, cefaloridina, cloranfenicol, kanamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoina y estreptomicina, siendo resistentes a bacitracina, sulfato de colistina, eritromicina, ácido fusídico, lincomicina, meticilina, penicilina G y polimixina B. No obstante, se observó cierta variabilidad en algunas cepas frente a la gentamicina, la neomicina, la novobiocina y el sulfafurazol.

La estreptomicina es un aminoglicósido que actúa uniéndose al ribosoma bacteriano e impidiendo la síntesis de proteínas. La introducción en los años 50 de este antibiótico para el control del fuego bacteriano en Estados Unidos dio lugar a la aparición de cepas resistentes en California en 1971 (Miller y Schroth, 1972) y posteriormente en otras zonas del oeste del país y actualmente la resistencia a estreptomicina es común en las poblaciones bacterianas naturales expuestas a este antibiótico, en los países donde su uso está permitido. Este fenómeno puede ocurrir como resultado de mutaciones cromosómicas que alteren la afinidad de los ribosomas por la estreptomicina, o bien por la adquisición de plásmidos que codifican para la síntesis de enzimas capaces de inactivar al antibiótico (Jones y Schnabel, 2000).

1.2.2.7. Sensibilidad a bacteriófagos

La existencia de bacteriófagos con especificidad variable se ha descrito en la mayoría de las bacterias fitopatógenas, y se aíslan tanto de los hábitats naturales como de las cepas de las bacterias a las que infectan (Billing y Garrett, 1980; Civerolo, 1990). La susceptibilidad de varias bacterias a un mismo virus indica la presencia de, al

menos, algún receptor común en la superficie de la envoltura celular. Por el contrario, las diferencias en susceptibilidad a un mismo fago entre cepas bacterianas de la misma especie pueden indicar pequeñas diferencias entre ellas que, en ocasiones, son significativas. Entre cepas patógenas y no patógenas de *E. amylovora*, Billing (1960) observó que la susceptibilidad a un fago dependía de la presencia de la cápsula que envuelve a las células. Más tarde se mostró que eran posiblemente los LPS los responsables de la especificidad hacia determinados fagos (Billing, 1985).

Posteriormente, se abordaron diversos trabajos sobre la susceptibilidad a fagos de *E. amylovora*, revelándose un perfil similar al de *Pantoea agglomerans* (antes *Erwinia herbicola*), por lo que esta última especie se ha propuesto como reservorio de fagos para el control biológico de *E. amylovora* (Chatterjee y Gibbins, 1971). La caracterización de cepas bacterianas mediante fagos se ha propuesto como una herramienta complementaria para el diagnóstico de *E. amylovora* (Vanneste y Paulin, 1990), aunque no se han encontrado bacteriófagos específicos para todas las cepas examinadas. También se obtuvieron mutantes de *E. amylovora* afectados en la patogenicidad y/o virulencia mediante un derivado del fago Mu (Vanneste *et al.*, 1990). Otras investigaciones más recientes se basan en la caracterización de la diversidad de fagos aislados de plantas con fuego bacteriano y del suelo circundante, para su uso potencial como agentes de control biológico o en estudios epidemiológicos (Schnabel y Jones, 2001; Gill *et al.*, 2003).

1.2.3. Características genéticas. Plásmidos

Los primeros estudios genéticos sobre *E. amylovora* se enfocaron hacia la conjugación de distintos plásmidos entre cepas de esta bacteria y la posible transferencia

de marcadores cromosómicos. Mediante la comparación de la frecuencia de distintos marcadores, se elaboró un mapa cromosómico para la cepa Ea 178 (Chatterjee y Starr, 1980). Más tarde, se estimó el tamaño del genoma de este patógeno en unas 4.5 Mb mediante macrorrestricción de su ADN genómico con *Xba*I, seguida de electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Zhang y Geider, 1997). Actualmente, la secuenciación del genoma completo de *E. amylovora* se está llevando a cabo en el marco de un proyecto coordinado por la Universidad de Cornell (USA) (Beer *et al.*, 2004).

Hasta la fecha se ha descrito la presencia de varios plásmidos en *E. amylovora*, de tamaños que oscilan entre 60 kb y menos de 3 kb, cuyas funciones en la mayoría de los casos todavía están por determinar. Aunque no todos ellos se encuentran necesariamente en todas las cepas del patógeno, el plásmido pEA29 de *E. amylovora* parece estar presente en todas las cepas investigadas hasta el momento, mostrando ser excepcionalmente estable (Vanneste, 1995). Las cepas de *E. amylovora* curadas de este plásmido no transmisible de 29 kb parecen seguir siendo patógenas, aunque con menor virulencia, por lo que se asumió que el pEA29 desempeña un papel en la virulencia de esta bacteria. No obstante, no se le han atribuido otras funciones, excepto la biosíntesis de tiamina (Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*, 1989). Su ubicuidad en *E. amylovora* condujo al diseño de iniciadores específicos de un fragmento del pEA29 para la detección del patógeno por PCR amplificando un fragmento *Pst*I de su secuencia (Bereswill *et al.*, 1992).

Se han encontrado variaciones en la longitud del producto de amplificación de la pEA29-PCR, así como en los tamaños de los fragmentos de restricción de los amplicones, habiéndose relacionado con el origen geográfico de las cepas (Lecomte *et al.*, 1997). Se han observado otras variaciones en relación con el área de procedencia y

posiblemente con la planta infectada (cepas de *Rubus*) (Momol *et al.*, 1997). Los análisis más detallados del fragmento amplificado han demostrado que el polimorfismo se debe a una serie de repeticiones de secuencia corta (8 pb) (Kim y Geider, 1999).

Posteriormente, la secuenciación completa del plásmido pEA29 puso de manifiesto la presencia de los genes biosintéticos de tiamina *thiO*, *thiG* y *thiF* (McGhee y Jones, 2000). Otros análisis de restricción posteriores han revelado cierta diversidad genética en la secuencia del pEA29 (McGhee *et al.*, 2002a). El estudio de su secuencia también proporcionó información acerca de la organización genética de los plásmidos de otras bacterias fitopatógenas relacionadas, como *E. pyrifoliae*, un nuevo patógeno de peral asiático que es muy similar a *E. amylovora* pero distinto en ciertas características genéticas (Kim *et al.*, 1999; McGhee *et al.*, 2002b).

Existen otros plásmidos en *E. amylovora* asociados a la resistencia a estreptomicina y los estudios sobre el modo de transferencia de los genes responsables de este fenómeno se llevaron a cabo principalmente en los años 90 con cepas de Michigan (McManus y Jones, 1994a; Chiou y Jones, 1995). Los resultados revelaron que existe un par de genes transmisibles (*strA-strB*) en el transposón Tn5393, que confieren resistencia a este antibiótico. Inicialmente se localizaron en el plásmido pEA34 (Chiou y Jones, 1993) y, más tarde, también se encontraron en algunos casos en el pEA29 (McManus y Jones, 1994a). Dado que este elemento genético móvil se encuentra en otras bacterias Gram-negativas, especialmente en *Pantoea agglomerans* (antes *Erwinia herbicola*) (Chiou y Jones, 1993), los genes *strA-strB* se detectaron posteriormente en cepas de *E. amylovora* de California pero, a diferencia de las de Michigan, no estaban asociados al pEA34 ni al pEA29, sino a un plásmido de 8.7 kb del tipo RSF1010 (Palmer *et al.*, 1997). Este tipo de plásmidos portadores de resistencia a

antibióticos (también llamados plásmidos R) se habían asociado desde hace años a varias bacterias de importancia clínica, pero no a fitopatógenas. Aunque no son conjugativos, se pueden transferir a otras bacterias en presencia de otros plásmidos que codifiquen funciones de movilización.

Otro plásmido presente en algunas cepas de *E. amylovora* es el pCPP60, un plásmido críptico de unas 56 kb, detectado y caracterizado por Steinberger *et al.* (1990). Éste aparece en un 25% de las cepas independientemente de su origen u hospedador, aunque no parece estar implicado en la patogenicidad. También se han identificado dos plásmidos pequeños de 2.8 y 1.7 kb (McGhee *et al.*, 2002b). Recientemente, se han descrito nuevos plásmidos en esta bacteria, de aproximadamente 30 kb, 60 kb (Sundin *et al.*, 2004) y 70 kb (Llop *et al.*, 2004), pero su función todavía no se conoce.

1.2.4. Factores implicados en el poder patógeno

Tal como otras especies necrogénicas, *E. amylovora* posee los genes de patogenicidad *hrp* que intervienen en el desarrollo de la reacción de hipersensibilidad (HR) en plantas no hospedadoras y/o en la patogénesis en plantas susceptibles al fuego bacteriano (Kim y Beer, 2000). Además, los polisacáridos extracelulares (EPS) forman una cápsula en torno a la célula bacteriana y desempeñan un papel crucial en la patogenicidad, protegiendo a la bacteria de las reacciones de defensa del hospedador (Geider, 2000). Por último, *E. amylovora* produce sideróforos del tipo hidroxamato pertenecientes a la clase de las desferrioxaminas (DFOs), principalmente DFO E. Estos sideróforos están implicados en la virulencia de la bacteria y además se les ha propuesto un papel en la protección de ésta bajo condiciones oxidantes (Expert *et al.*, 2000). Aparte de los factores mencionados que intervienen en el desarrollo de los

síntomas de la enfermedad, debe haber otros necesarios para la colonización de los tejidos. Aún se desconoce cómo *E. amylovora* puede sobrevivir *in planta* y la forma en que es sensible al entorno en el hospedador para activar los procesos de virulencia (Eastgate, 2000). No obstante, en la búsqueda de dichos factores, se ha llevado a cabo una investigación muy reciente sobre la posible existencia en *E. amylovora* de un sistema de *quorum sensing*, capaz de coordinar la expresión de los genes de virulencia y que, hasta la fecha, no se ha descrito en este patógeno (Molina *et al.*, 2004).

1.2.4.1. Genes *hrp*

Los genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) se agrupan en una región cromosómica de 40 kb que parece ser una isla de patogenicidad (Kim y Beer, 2000). Estos genes codifican para tres tipos diferentes de proteínas según su función: reguladoras, secretoras y secretadas. Las proteínas reguladoras, entre las que cabe destacar el factor de transcripción HrpL, controlan la expresión de los otros genes *hrp*, en respuesta a factores ambientales (Wei y Beer, 1995; Wei *et al.*, 2000). Las proteínas secretoras son componentes estructurales de un sistema de secreción tipo III, con estructura en forma de *pilus*, que libera proteínas fuera de la célula bacteriana. En *E. amylovora* se han caracterizado varios genes que codifican para proteínas secretoras de este sistema, entre ellos *hrcV*, *hrcC*, *hrcJ* y *hrcT* (Alfano y Collmer, 1997). Las proteínas secretadas se liberan al exterior de la célula bacteriana mediante el aparato de secreción tipo III (Figura 8) y hasta ahora se han identificado cuatro tipos. La harpina (HrpN) es el principal efector de la HR y además está implicada en la patogenicidad (Wei *et al.*, 1992), mientras que las demás son potencialmente efectoras, como DspA (Venisse *et al.*, 2003), HrpW (Kim y Beer, 1998) y otras, que contribuyen de alguna

manera a la proliferación de *E. amylovora* en la planta, aunque sus funciones biológicas no se conocen del todo bien (Kim y Beer, 2000).

La harpina (HrpN), que es la más estudiada, es una proteína presente de forma natural en diversas especies de bacterias fitopatógenas, aunque fue aislada por primera vez en *E. amylovora*. Curiosamente, presenta similitudes con algunas proteínas de la pared celular vegetal y con queratinas (Wei *et al.*, 1992). Su acción no parece ser enzimática o tóxica (Kim y Beer, 1998), es rica en glicina, termoestable y cuando desencadena la HR provoca un intercambio de K^+/H^+ , la producción de especies de oxígeno reactivas (Venisse *et al.*, 2003), la disrupción de la función mitocondrial y la inducción de la muerte programada (Eastgate, 2000). Además, puede producir resistencia sistémica adquirida en las plantas y aumentar su crecimiento (Wei *et al.*, 1998), propiedades por las cuales se desarrolló el producto comercial Messenger (EDEN Bioscience, USA) para su uso en agricultura, basado en dicha harpina.

Otro grupo de genes asociado a los *hrp* son los *dsp* (*disease specific*), situados en una región contigua a la anterior. Se requieren para el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, pero no para la HR, y están co-regulados por HrpL (Bogdanove *et al.*, 2000). En suma, los genes *hrp* y asociados, codifican para proteínas que regulan positivamente a otros genes de este tipo que, bien se ensamblan en un aparato de secreción, o bien son secretadas a los espacios intercelulares de la planta o al interior de las células vegetales. Las proteínas secretadas probablemente afecten al metabolismo del hospedador, ya sea atacando a ciertos componentes de las células vegetales o interrumpiendo rutas de señalización. También es posible que algunas de estas proteínas sean desencadenantes de las defensas de la planta, aunque todos estos mecanismos aún están por dilucidar (Kim y Beer, 2000).

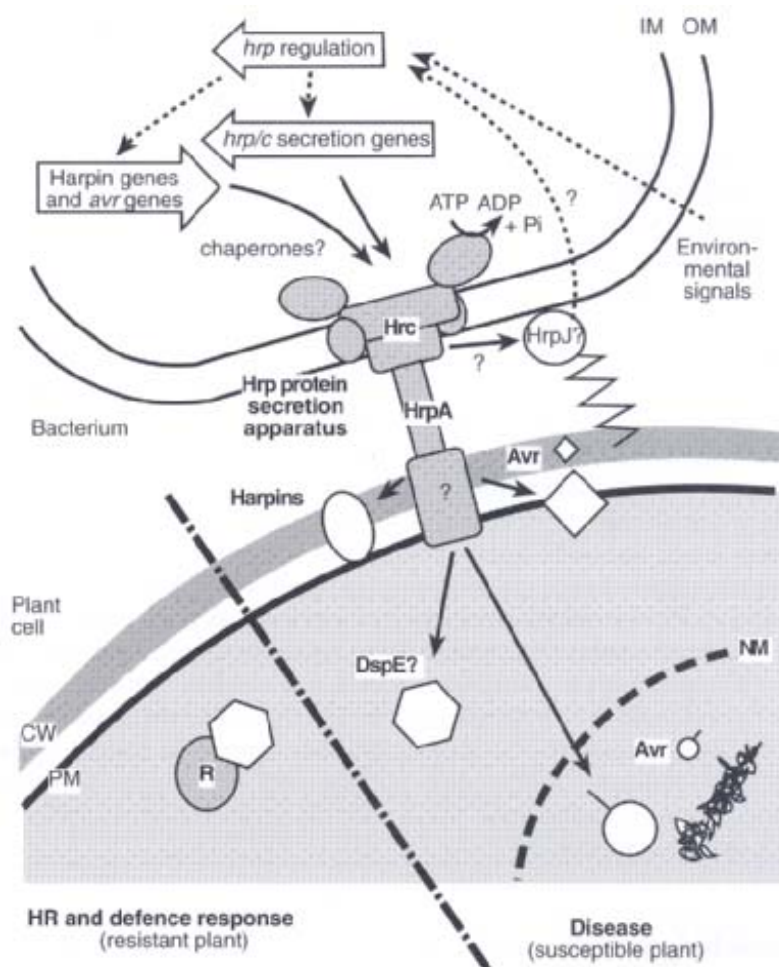


Figura 8. Modelo hipotético del aparato secretor de proteínas Hrp de *E. amylovora* y posibles destinos de las proteínas transportadas. IM: membrana interna, OM: membrana externa, CW: pared celular vegetal, PM: membrana plasmática vegetal, NM: membrana nuclear, R: factor de resistencia de la planta (tomado de Kim y Beer, 2000).

1.2.4.2. Exopolisacáridos: amilovorano y levano

El exudado producido por *E. amylovora* en las plantas afectadas es uno de los síntomas más característicos de la enfermedad. Está formado por exopolisacáridos (EPS) y células bacterianas, y permite el establecimiento y la dispersión del fuego bacteriano (Bennet y Billing, 1978; Ayers *et al.*, 1979). No se ha determinado un papel concreto para los EPS, pero se han sugerido varias funciones, como: a) enmascarar

ciertos componentes de la superficie celular, de modo que, al ser poco inmunogénicos, permiten al patógeno eludir el reconocimiento y las defensas de la planta; b) retener agua y nutrientes; c) promover la invasión del tejido como resultado de la presión debida al aumento de volumen de los EPS hidratados y d) macerar y colapsar los tejidos (Vanneste, 1995).

Cuando *E. amylovora* penetra en el tejido vegetal, invade el xilema (Vanneste y Eden-Green, 2000) y se mueve a través de los vasos de la planta (Bogs *et al.*, 1998) para formar agregados bacterianos, provocando fugas en los vasos y la extrusión de las bacterias al parénquima, lo que finalmente fuerza la salida del exudado a la superficie exterior de la planta. El exudado de *E. amylovora* contiene principalmente el EPS amilovorano y las cepas incapaces de sintetizarlo no son patógenas, no se multiplican en la planta y no se mueven a través de los vasos (Geider, 2000).

El amilovorano es un EPS de alto peso molecular, característico de *E. amylovora*. El sorbitol es una buena fuente de carbono para su biosíntesis del amilovorano (Bennet y Billing, 1978) que, a causa de su compleja estructura, requiere gran número de genes, localizados en la región *ams* (Bugert y Geider, 1995). Este azúcar es uno de los utilizados principalmente por las rosáceas para el transporte y almacenamiento de carbohidratos y los genes de su metabolismo se organizan en el operón *srl* de *E. amylovora* (Aldridge *et al.*, 1997).

La cantidad de amilovorano sintetizada en un medio de cultivo sólido puede variar según las cepas, estando afectada por factores ambientales tales como la temperatura, el pH del medio, su concentración salina y la fuente de carbono. En medio mínimo con sorbitol, *E. amylovora* produce más EPS que en medios nutritivos debido a la presencia de este azúcar y, si se trata de galactosa, el efecto es aún mayor (Geider,

2000). De la misma manera, la presencia de iones cobre en el medio también aumenta la síntesis de amilovorano e induce la formación de colonias amarillas mucosas características (Bereswill *et al.*, 1998).

Otro EPS que puede estar presente en el exudado es el levano, y las cepas deficientes en éste, sólo están afectadas en su grado de virulencia, a diferencia de las que no sintetizan amilovorano (Geier y Geider, 1993). El levano es un homopolímero formado por residuos de un sólo azúcar, fructosa, sintetizado por *E. amylovora* en medios con alto contenido en sacarosa. Muchas bacterias asociadas a plantas segregan un enzima, la levansucrasa, que hidroliza la sacarosa, liberando glucosa y polimerizando fructosa para formar levano (Gross *et al.*, 1992).

Dado que todas las plantas producen grandes cantidades de sacarosa con funciones de almacenamiento y transporte, la mayoría de las bacterias asociadas a plantas son capaces de metabolizarla; en el caso de *E. amylovora* se encargan de ello los genes del operón *scr* (Bogs y Geider, 2000). La levansucrasa es uno de los pocos enzimas que segrega esta bacteria y está codificada por el gen *lsc*, cuya caracterización e influencia en la virulencia fueron estudiadas por Geier y Geider (1993). Esta investigación fue ampliada posteriormente por Bereswill *et al.* (1997) gracias al aislamiento en Holanda de una serie de cepas de *E. amylovora* deficientes de forma natural en la producción de levano, que demostró que la regulación de su síntesis parece estar afectada por la temperatura.

1.2.4.3. Sideróforos: desferrioxaminas

El hierro es para las bacterias un elemento esencial a bajas concentraciones y tóxico a elevadas concentraciones, por lo cual éstas han desarrollado sistemas muy

regulados para la adquisición de este metal. *E. amylovora*, tal como muchos patógenos del hombre y animales, produce sideróforos pertenecientes a la clase de las desferrioxaminas (DFOs), siendo la DFO E la producida de forma mayoritaria por esta bacteria (Feistner *et al.*, 1993; Kachadourian *et al.*, 1996). Estos compuestos no sólo funcionan como sistemas de adquisición de hierro de alta afinidad en medios con limitación de este metal, sino que también están implicados en la patogenicidad de *E. amylovora*.

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular que, debido a su estructura, presentan una elevada afinidad por el Fe (III), que es la forma predominante de este metal en ambientes aeróbicos y microaeróbicos. El ión férrico forma enlaces estables con ligandos que contienen oxígeno, de modo que las DFOs son agentes quelantes y transportadores del hierro, que son necesarios para solubilizar este metal y proporcionárselo a la célula (Expert *et al.*, 2000). El hierro en los tejidos vegetales constituye un factor limitante para la colonización epífita de los tejidos florales, de ahí la importancia de las DFOs como transportadores de hierro (Dellagi *et al.*, 1998).

Por otro lado, durante las fases iniciales de la infección, la mayoría de las reacciones de defensa de la planta implican la producción de especies oxigenadas muy reactivas con actividad antimicrobiana, como el anión radical superóxido o el peróxido de hidrógeno. Las DFOs interfieren con estas moléculas responsables del estrés oxidativo generadas por la planta (Venisse *et al.*, 2003), formando complejos con el hierro e interrumpiendo la reacción en cadena de los radicales para evitar los daños oxidativos en la bacteria, de modo que actúan simultáneamente como factor de virulencia y agente protector de las células bacterianas frente a los efectos tóxicos de dichas especies químicas (Expert *et al.*, 2000).

Por otro lado, en función de las concentraciones respectivas de hierro y del anión radical superóxido, ambos pueden reaccionar activando los sistemas de defensa de la planta, propiedad que podría ser explotada para el control del fuego bacteriano mediante el desarrollo de plantas resistentes. Otras aproximaciones en este sentido apuntan a métodos de control químico mediante el diseño y síntesis de compuestos inhibidores de la síntesis de DFOs o la conjugación de antibióticos a sideróforos para facilitar su transporte activo al interior de las células microbianas (Expert *et al.*, 2000).

1.2.4.4. Exoenzimas y toxinas

A diferencia de muchas otras bacterias fitopatógenas, *E. amylovora* aparentemente no segrega enzimas pectinolíticos o metabolitos fitotóxicos (Seemüller y Beer, 1976). Con el fin de comprender mejor la patogenicidad de *E. amylovora*, se han estudiado específicamente diversos enzimas, conociéndose la implicación de algunos de ellos en la interacción planta-patógeno. La actividad β -glucosidasa es interesante porque produce hidroquinona, un compuesto tóxico para las bacterias (Hildebrand y Schroth, 1963). Existen trabajos que han intentado dilucidar la relación entre la actividad de este enzima y la patogenicidad de *E. amylovora* (Kerppola *et al.*, 1987) o el posible papel de la hidroquinona como mecanismo de defensa de la planta (Berg y Gibbins, 1983), aunque no se obtuvieron conclusiones claras al respecto.

Las bacterias necrogénicas producen enzimas capaces de hidrolizar los polisacáridos de la pared celular vegetal, aunque en cantidades menores que las del grupo "*carotovora*". *E. amylovora* es necrógena, pero no parece producir cantidades apreciables de dichos enzimas: no se han detectado actividades pectolíticas, celulolíticas o xilolíticas durante el desarrollo del fuego bacteriano. Sin embargo,

produce dos proteasas neutras, cuyo papel durante la infección aún no se conoce (Seemüller y Beer, 1976, 1977), aunque una de ellas fue posteriormente identificada como una metaloproteasa y caracterizada desde el punto de vista molecular por Zhang *et al.* (1999). En la búsqueda de moléculas tóxicas producidas por *E. amylovora*, potencialmente responsables de la patogenicidad, se han aislado dos metabolitos secundarios. Uno de ellos es la 6-tioguanina (Feistner y Staub, 1986), que finalmente no mostró efectos tóxicos en células de peral en cultivo. El otro es la 2,5-dihidrofénilalanina (DHP) (Feistner, 1988), considerada inicialmente como una necrotoxina, para la cual se propuso un papel importante en la patogenicidad, aunque la inconsistencia en la producción de esta molécula no apoya dicha función. En los últimos años, no ha habido avances significativos en el estudio de la posible producción de toxinas por *E. amylovora*.

1.2.5. Caracterización fenotípica

Desde hace años, numerosos estudios fenotípicos han venido mostrando la dificultad de distinguir entre cepas de *E. amylovora* de diferentes orígenes geográficos, distintos hospedadores o años de aislamiento (Vanneste, 1995; Momol y Aldwinckle, 2000). No obstante, alguno de los métodos mencionados a continuación son capaces de discriminar los tres grandes grupos de *E. amylovora* que parecen exhibir especialización hacia el hospedador: los aislados de *Maloideae*, los de *Rubus* spp. y los de peral japonés de Hokkaido.

1.2.5.1. Caracterización bioquímica y fisiológica

El estudio de las características bioquímicas y fisiológicas entre los miembros de la especie *E. amylovora* ya aparecía en varios estudios taxonómicos del género *Erwinia* (aunque utilizando únicamente cepas aisladas de hospedadores de la subfamilia *Maloideae*) en los que no se revelaron diferencias significativas entre ellos (Dye, 1968). Dos investigaciones posteriores con sendas colecciones de cepas de *E. amylovora*, examinadas mediante métodos clásicos de identificación, tampoco permitieron detectar diversidad entre ellas (Billing *et al.*, 1961; Paulin y Samson, 1973). Más tarde, Vantomme *et al.* (1982) ensayaron 103 aislados de esta bacteria y encontraron un grupo muy homogéneo en cuanto a las propiedades bioquímicas evaluadas con el sistema comercial miniaturizado API 20E, así como en las características electroforéticas de sus proteínas solubles. El sistema API 50CH también se ha aplicado al patógeno del fuego bacteriano, aunque no para el estudio de su diversidad intraespecífica, sino para el análisis numérico de características fenotípicas de distintas especies del género *Erwinia*, entre ellas *E. amylovora* (Mergaert *et al.*, 1984; Verdonck *et al.*, 1987). En ambos estudios, los análisis de agrupamiento situaron esta especie dentro de un mismo grupo, a excepción de una cepa de la *forma specialis* aislada de *Rubus* (Mergaert *et al.*, 1984).

Otros intentos de caracterización basados en estudios bioquímicos incluyen la determinación de los perfiles de aminopeptidasa, habiéndose encontrado diferencias cuantitativas, pero no cualitativas, entre cepas virulentas y avirulentas, sin ser posible finalmente proponer un perfil típico para estas últimas (McIntyre *et al.*, 1975). Basándose nuevamente en la utilización de carbohidratos, Kim *et al.* (1996) se sirvieron del sistema automatizado BIOLOG (Biolog Inc., USA) para establecer distintos perfiles entre las cepas ensayadas. La mayoría de las cepas de *Maloideae* se agruparon juntas,

mientras que las de *Rubus* spp. y las de “Hokkaido” se agruparon aparte de éstas, formando otros dos grupos cada una de ellas, respectivamente.

En el estudio de otras características, como la susceptibilidad a antibióticos (Vantomme *et al.*, 1986) se obtuvo una respuesta variable para cuatro de los veinte antibióticos ensayados. En el trabajo sobre la síntesis de dihidrofenilalanina (DHP), abordado por Schwartz *et al.* (1991), se demostró que sólo tres de las doce cepas ensayadas fueron capaces de producir este metabolito.

1.2.5.2. Caracterización serológica

Los primeros datos sobre las características serológicas de *E. amylovora* se obtuvieron con anticuerpos policlonales. Inicialmente, hubo una tentativa de establecer serotipos basados en los antígenos de superficie utilizando anticuerpos policlonales (Samson, 1972), pero no hubo investigaciones posteriores al respecto. Tras el descubrimiento de los M_{Ab}, se publicaron más estudios. Su uso proporciona información sobre la posible heterogeneidad de *E. amylovora* como grupo y en relación a otras erwinias, ya que permite la identificación de un único determinante antigénico en la superficie celular de forma precisa. Sin embargo, suele ser necesaria una mezcla de varios M_{Ab} para el reconocimiento de todos los representantes de la especie (Gugerli y Gouk, 1994; Gorris *et al.*, 1996a,b), lo que indica que algunos epítomos no se encuentran en todas las cepas y plantea la posibilidad de encontrar variabilidad antigénica. En las pruebas realizadas por Kim *et al.* (1996) el grupo “Hokkaido” mostró características serológicas distintas del resto de las cepas del grupo *Maloideae*, mientras que en otros trabajos como los de Manulis *et al.* (1998) o Vantomme *et al.* (1982, 1986) no se distinguieron grupos aplicando ensayos serológicos a las respectivas colecciones de

cepas de *E. amylovora* analizadas, que incluían cepas de *Maloideae*, y en algún caso, también de *Rubus* (Vantomme, 1986).

1.2.5.3. Perfil de ácidos grasos y otros métodos de caracterización

La determinación del perfil de los metil-ésteres de los ácidos grasos totales de la célula bacteriana, se ha propuesto como un criterio adecuado para estudios taxonómicos, debido a la diversidad de su estructura y su estabilidad (Sasser, 1990). Se lleva a cabo mediante cromatografía de gases y el perfil obtenido se compara con patrones de especies conocidas almacenadas en la base de datos. En función de su estructura química, los ácidos grasos de las bacterias del grupo “*amylovora*” se dividieron en siete clases (van der Zwet y Wells, 1993; Wells *et al.*, 1994) y su clasificación se basa en el contenido y proporción de los ácidos grasos en cada una de ellas.

El uso de bacteriófagos específicos constituye una herramienta adicional para la confirmación de la identidad de esta especie, aunque con limitaciones, ya que, hasta ahora, los fagos aislados no parecen ser completamente específicos de *E. amylovora* (Sobiczewski *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 2003).

1.2.6. Caracterización genotípica

Las cepas de *E. amylovora* aisladas de hospedadores de la subfamilia *Maloideae* han mostrado tradicionalmente una elevada homogeneidad que se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios bioquímicos, serológicos y moleculares (Vanneste, 1995; Momol y Aldwinckle, 2000). No obstante, el reciente desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha proporcionado ya varios trabajos sobre la organización

genómica de *E. amylovora*, que revelan dentro del grupo *Maloideae* ciertas diferencias entre cepas que se detallarán posteriormente.

1.2.6.1. PCR basada en secuencias del pEA29

La amplificación por PCR de un fragmento de alrededor de 1 kb del plásmido de 29 kb de *E. amylovora* (pEA29-PCR) no sólo permite su identificación, como ya se ha indicado, sino que también se ha usado para distinguir cepas de este patógeno (Bereswill *et al.*, 1992; McManus y Jones, 1995a). Todas las cepas de *Maloideae* (exceptuando las de “Hokkaido”) y la mayoría de las de *Rubus* produjeron el fragmento del tamaño esperado de 1 kb con los iniciadores de Bereswill *et al.* (1992) (Kim *et al.*, 1996). Una cepa de *Rubus* y todas las de “Hokkaido” mostraron bandas ligeramente mayores, de 1.1-1.2 kb (Kim *et al.*, 1996). En un estudio en el que se utilizó la pEA29-PCR para confirmar la identidad de los aislados de *E. amylovora*, se detectaron productos de más de 1 kb para algunas cepas de *Rubus* y todas las de “Hokkaido” (Momol *et al.*, 1997). Los resultados del trabajo de Lecomte *et al.* (1997) son consistentes con los ya mencionados, ya que para algunas cepas se obtuvieron tamaños mayores del esperado. Tras digerir los productos de PCR con los enzimas de restricción *MspI* y *Sau3A*, se observaron tres patrones de bandas distintos, uno de los cuales pareció asociarse a un área geográfica con brotes recientes de fuego bacteriano en Europa Central, concretamente en Austria y el Sur de Alemania (Lecomte *et al.* 1997).

1.2.6.2. PCR-ribotipado

La técnica de PCR-ribotipado constituye otra de las aproximaciones para investigar la diversidad intraespecífica. Consiste en la amplificación de la región

espaciadora ITS (*internal transcribed spacer*), situada entre los genes ribosómicos 16S y 23S. Éstos se encuentran en varias copias en el genoma procariótico, y la región que los separa está menos conservada que los genes que la flanquean. Este método se ha aplicado a *E. amylovora* en varias ocasiones (McManus y Jones, 1995b; Jeng *et al.*, 1999; McGhee *et al.*, 2002b). Al evaluar el polimorfismo en el tamaño de la región ITS de un gran número de cepas de *E. amylovora* aisladas de *Maloideae* y *Rubus* de Norteamérica y Nueva Zelanda, se encontraron cuatro ribotipos. Los tres primeros correspondían a cepas de *E. amylovora* aisladas de especies de la subfamilia *Maloideae* en el este de Norteamérica, el oeste de los Estados Unidos y Nueva Zelanda. El cuarto ribotipo agrupó a los aislados de *Rubus* (McManus y Jones, 1995b). En los estudios de Jeng *et al.* (1999) y McGhee *et al.* (2002b) se utilizaron los iniciadores de McManus y Jones (1995b), obteniendo resultados consistentes con la clasificación anterior.

1.2.6.3. PCR de elementos repetitivos (rep-PCR)

Generalmente las bacterias contienen en su genoma varias copias de una serie de secuencias repetitivas tales como REP (*repetitive extragenic palindromic*), ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) y BOX (secuencias conservadas de ADN repetitivo del elemento BOX de *Streptococcus pneumoniae*) (Versalovic *et al.*, 1991). Las unidades repetidas están separadas por regiones de ADN no repetitivo, de modo que los iniciadores para amplificar estas zonas por PCR se diseñan desde cada una de las mitades del elemento repetitivo y se dirigen hacia el exterior. La aplicación de esta técnica a *E. amylovora* ha permitido observar diferencias significativas en los perfiles de rep-PCR obtenidos, sobre todo entre las cepas de *Maloideae* y las de *Rubus* (McManus y Jones, 1995b).

1.2.6.4. Repeticiones de secuencia corta (SSR)

En general, se denomina MSP-PCR (*microsatellite-primed PCR*) a la PCR basada en secuencias repetidas en tandem en el genoma, llamadas repeticiones de secuencia corta (SSR, *short sequence repeats*), que inicialmente se denominaron, según su número de nucleótidos, microsatélites (de 2 a 10) o minisatélites (de 15 a 30). Se encuentran tanto en el genoma eucariótico como en el procariótico y son muy variables en el número de repeticiones. Además, cuando se diseñan iniciadores específicos para estas regiones, éstos originan un patrón de varias bandas, que refleja el polimorfismo de estas repeticiones y su distancia entre ellas (Martín *et al.*, 1998; Sabat *et al.*, 2003).

En el producto de PCR obtenido a partir del plásmido de 29 kb de *E. amylovora* se ha observado una ligera variación de tamaño entre cepas (Bereswill *et al.*, 1992; McManus y Jones, 1995a; Kim *et al.*, 1996; Lecomte *et al.*, 1997; Momol *et al.*, 1997), debida a la presencia de una serie de SSR. Esta estructura repetitiva consta de 8 nucleótidos (GAATTACA) y aparece de 3 a 15 veces en el fragmento amplificado en la pEA29-PCR (Schnabel y Jones, 1998; Kim y Geider, 1999). Dicha variación en el número de repeticiones ha sido propuesta para la diferenciación de cepas de *E. amylovora* (Kim y Geider, 1999) y como marcador genético útil para trazabilidad y estudios epidemiológicos (Ruppitsch *et al.*, 2004).

No obstante, las SSRs han sido descritas como entidades inestables que experimentan cambios frecuentes de longitud a causa de procesos de recombinación, así como variaciones en el número de repeticiones (Schnabel y Jones, 1998; Jock *et al.*, 2003). Por este motivo, el análisis de las SSRs ha proporcionado resultados controvertidos sobre su estabilidad en *E. amylovora*, dando lugar a que algunos autores descarten la utilidad de esta técnica para tipificar cepas de esta bacteria (Schnabel y

Jones, 1998). Otros autores recomiendan las SSRs como marcadores epidemiológicos bajo ciertas condiciones (número de repeticiones muy bajo o muy alto), cuando existe información adicional sobre el origen del material vegetal del que se hayan aislado las cepas estudiadas (Ruppitsch *et al.*, 2004).

1.2.6.5. Amplificación aleatoria de los fragmentos polimórficos de ADN (RAPD)

La técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) se basa en el uso de iniciadores de PCR universales, cuya secuencia es independiente del genoma del organismo que es objeto de estudio. El análisis mediante iniciadores al azar (*arbitrarily primed PCR*) (AP)-PCR se sirve de iniciadores universales para secuenciación. En ambos casos, los iniciadores se usan solos o en parejas, en condiciones de baja astringencia para unirse en varios sitios al ADN diana, ya sea de modo total o parcialmente complementario y, como consecuencia, se genera un patrón de amplificación característico (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Momol *et al.* (1997) utilizaron RAPD para identificar una colección de cepas de *E. amylovora* de EEUU, Europa y Japón, así como para determinar las relaciones entre ellas y con su origen geográfico y hospedador, utilizando 24 iniciadores al azar. Las cepas se clasificaron en tres grupos: *Maloideae*, *Rubus* y “Hokkaido”, y dentro de los dos últimos se pudieron distinguir otros dos, respectivamente. Esta clasificación fue consistente con las resultantes de las siguientes técnicas: BIOLOG, (Kim *et al.*, 1996), pEA29-PCR (Kim *et al.*, 1996; Lecomte *et al.*, 1997; Momol *et al.*, 1997), ARDREA (Momol *et al.*, 1999) y RFLP de los genes *hrp* (Laby y Beer, 1992; Kim *et al.*, 1996). Al analizar una amplia colección de cepas de Israel mediante RAPD (Manulis *et al.*,

1998), los patrones obtenidos también revelaron una población homogénea. Más tarde, Brennan *et al.* (2002) aplicaron esta técnica a un grupo de aislados irlandeses y encontraron homogeneidad en el 68% de las cepas y variabilidad en el resto, aunque ésta última no pudo ser correlacionada con el origen, el hospedador ni el año de aislamiento.

1.2.6.6. Análisis de restricción de amplificadores de ADN ribosómico (ARDREA)

El método ARDREA (*amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis*) consiste en un análisis de restricción de los productos de amplificación del ADN ribosómico situado en el espaciador intergénico 16S-23S. Aplicando este método a *E. amylovora* (Momol *et al.*, 1999), se puso de manifiesto una clasificación en grupos según el hospedador, de acuerdo con la de RAPD (Momol *et al.*, 1997), con la diferencia de que las cepas de “Hokkaido” no formaron un grupo mediante ARDREA.

1.2.6.7. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Otra forma de abordar el estudio de la variabilidad de una porción de un determinado genoma pasa por analizar el polimorfismo en la longitud de los fragmentos resultantes de una restricción con endonucleasas (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP). El grupo de genes *hrp* de la cepa Ea 321 de *E. amylovora* se utilizó como sonda para detectar posibles variaciones de secuencia en esta región del genoma de *E. amylovora* (Laby y Beer, 1992). Todas las cepas de la familia *Maloideae* utilizadas en este estudio presentaron un patrón de hibridación idéntico al de la cepa Ea 321, mientras que las aisladas de *Rubus* mostraron dos patrones distintos al anterior. En

otro estudio en el que se llevó a cabo un análisis de restricción de los genes *hrp*, se observaron cinco patrones: uno para *Maloideae*, dos para *Rubus* y dos para el grupo “Hokkaido” (Kim *et al.*, 1996).

1.2.6.8. Análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

El análisis mediante AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) es otra de las técnicas basadas en la PCR para estudios taxonómicos, cuyo fundamento reside en la unión de unos adaptadores (segmentos de ADN de secuencia conocida) a los extremos de los fragmentos resultantes de la restricción del ADN genómico. Seguidamente se procede a la amplificación con iniciadores específicos para los adaptadores anteriormente incorporados, de modo que se cubre ampliamente el genoma a estudiar. Para manejar los complejos patrones generados, en una segunda reacción de PCR se añaden de uno a tres nucleótidos en el extremo 3' de los iniciadores, consiguiendo así una amplificación más selectiva (Vos *et al.*, 1995; Savelkoul *et al.*, 1999). Esta técnica se aplicó a una amplia colección de cepas de *E. amylovora* de Austria y Hungría, pero no se hallaron diferencias en los patrones obtenidos (Keck *et al.*, 2002). Más recientemente, también se ha analizado una colección más reducida de cepas de este patógeno de diversos países, entre ellos España, obteniéndose perfiles distintos para casi todas ellas, aunque tampoco ha sido posible establecer relaciones con el hospedador ni con el año o el país de aislamiento (Rico *et al.*, 2004).

1.2.6.9. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

El ADN genómico digerido con endonucleasas de restricción de corte poco frecuente genera fragmentos de gran tamaño que no pueden separarse mediante electroforesis convencional, pero sí mediante electroforesis en campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), basada en la utilización de campos eléctricos sucesivamente alternantes (Schwartz y Cantor, 1984). Las moléculas de ADN tan grandes tienen tendencia a fraccionarse durante los procesos preparativos normales, por lo cual se han desarrollado métodos de extracción de ADN cromosómico de células intactas embebidas en bloques de agarosa de baja temperatura de fusión, seguida de lisis *in situ* (Matushek *et al.*, 1996). Tras la consiguiente digestión y separación electroforética, los patrones de bandas resultantes pueden ser útiles en el estudio de la diversidad intraespecífica (Méndez-Álvarez *et al.*, 1995).

La aplicación de esta técnica a una colección de aislados de *E. amylovora* de distintos países con el enzima *Xba*I, puso de manifiesto diferencias significativas entre cepas procedentes de distintas zonas (Zhang y Geider, 1997). Las cepas norteamericanas e inglesas exhibieron los patrones de PFGE más divergentes, mientras que las de Egipto, Grecia y Turquía mostraron estar estrechamente relacionadas (Zhang y Geider, 1997). Dos años más tarde, se utilizó esta técnica para seguir la dispersión del fuego bacteriano en el este del Mediterráneo y los Balcanes (Bazzi *et al.*, 1999). Los resultados de este estudio, junto con los previos de Zhang y Geider (1997), sugieren que la diseminación de la enfermedad en los países mediterráneos tuvo su origen en el delta del Nilo. Recientemente, se ha confirmado la divergencia de los patrones de PFGE exhibidos por las cepas de Norteamérica (Jock y Geider, 2004). En el caso de Europa y

los países Mediterráneos, los resultados conjuntos de los trabajos de Zhang y Geider (1997) y Bazzi *et al.* (1999) apoyan la existencia de varias olas de la enfermedad:

- de Inglaterra a Europa Central y el este (Pt1) y el oeste (Pt4) de Francia
- del oeste de Francia al norte de España (Pt4)
- del norte de Francia al norte de Italia (Pt3)
- de Egipto al este del Mediterráneo y los Balcanes (Pt2)

En el trabajo de Bazzi *et al.* (1999) se propone además un esquema que se tomará como referente en el presente trabajo y que permite agrupar las cepas de *E. amylovora* en cinco patrones de PFGE: Pt1, correspondiente a Europa central, que incluye el este de Francia, y un área al sur de Inglaterra; Pt2, típico de los Balcanes y del este del Mediterráneo, incluyendo Turquía y Egipto; Pt3, presente en el norte de Italia, norte de Francia, Bélgica y Holanda; Pt4, característico del oeste de Francia y un área al sur de Inglaterra y Pt5, hallado en unas pocas cepas de Bulgaria e Israel (Zhang *et al.*, 1998).

1.3. Objetivos y justificación

El fuego bacteriano en España, pese a la efectividad de la erradicación realizada en la mayoría de los casos, constituye aún una amenaza para nuestros cultivos. Hasta la fecha de inicio de este trabajo, se disponía de escasa información sobre las características y la posible variabilidad de los aislados españoles de *E. amylovora*. Su estudio puede proporcionar datos útiles para el seguimiento de la diseminación espacial y temporal del fuego bacteriano y, consecuentemente, para el desarrollo y aplicación de métodos de erradicación o de control de la enfermedad. Por tanto, el objetivo general de la presente tesis doctoral es la caracterización de una amplia colección de aislados españoles de *E. amylovora* y su comparación con cepas de referencia internacional. Dicho objetivo se concreta en los siguientes puntos:

1. Revisión bibliográfica sobre *E. amylovora* centrada en los aspectos fenotípicos y genotípicos dirigidos al estudio de la variabilidad intraespecífica.
2. Confirmación de la identificación presuntiva de la colección de aislados españoles de *E. amylovora* y determinación de su poder patógeno en frutos inmaduros de distintos hospedadores.
3. Caracterización fenotípica de los aislados mediante distintas pruebas de cultivo, bioquímicas y fisiológicas.
4. Caracterización genotípica de los aislados mediante distintas técnicas moleculares.

En primer lugar, la revisión bibliográfica nos ha permitido conocer el estado actual del conocimiento sobre la diversidad intraspecífica de *E. amylovora* y así seleccionar las técnicas que se han aplicado en el presente estudio.

El segundo objetivo forma parte del segundo capítulo de esta tesis y nos ha proporcionado los datos preliminares necesarios para constituir una colección de aislados de diferentes años de aislamiento, hospedadores y áreas geográficas, que ha servido de base a esta investigación.

El tercer objetivo, que se desarrolla también en el segundo capítulo, se aborda con la caracterización fenotípica de los aislados españoles de *E. amylovora*. Para ello, se ha cultivado el patógeno en distintos medios generales y selectivos, se han utilizado sistemas comerciales miniaturizados y/o automatizados, como las galerías API (bioMérieux) y el sistema BIOLOG (Biolog, Inc.) y, por último, se ha estudiado la susceptibilidad *in vitro* frente a distintos antibióticos de uso agronómico, entre otros.

La caracterización genotípica, último de los objetivos propuestos, ha dado lugar al tercer y cuarto capítulos de esta memoria de investigación y se ha realizado mediante la aplicación de distintas técnicas, tales como electroforesis en campo pulsante (PFGE), PCR-ribotipado, análisis de microsatélites (MSP-PCR), análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y amplificación de ADN al azar (RAPD).

Asimismo, se ha evaluado la presencia del plásmido pEA29 en las cepas españolas, y se ha llevado a cabo una caracterización fenotípica y genotípica, en distintos aspectos, de aquellas cepas que carecen de él, cuyos resultados se reflejan en el quinto capítulo de esta tesis.

CAPÍTULO 2

***Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics**

**Victoria Donat, Elena G. Biosca, Arantza Rico, Javier Peñalver, Marisa Borruel,
Dionisio Berra, Txaran Basterretxea, Jesús Murillo and María M. López**

Annals of Applied Biology, *in press* (2004)

2. *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics

2.1. Summary

One hundred and thirty strains of *Erwinia amylovora* recovered from Spanish foci of fire blight from 1995 to 2000 were characterised and compared to reference strains from different sources and origins. Their rapid identification was performed by double antibody sandwich indirect (DASI) ELISA, using specific monoclonal antibodies against *E. amylovora*, and molecular confirmation by PCR using primers specific to the native plasmid pEA29. The Spanish strains of *E. amylovora* grew on different general and selective media producing typical colonies, except one of them that was deficient in levan production, whereas none of them grew on minimal agar medium with copper sulfate and low content of asparagine. All of them were susceptible to tetracycline, streptomycin, kasugamycin and oxolinic acid. Biochemical characterization of selected strains by API 20E system revealed a great homogeneity, with 80% of the Spanish strains showing one of the two majority API 20E profiles described for *E. amylovora* and the remaining strains showing minor differences. Pathogenicity on pear fruits and hypersensitivity reaction was confirmed, but a delayed reaction was observed for two Spanish strains. This is the first characterization of a large collection of Spanish strains of *E. amylovora*.

2.2. Introduction

Fire blight, caused by *Erwinia amylovora* Burr. (Winslow *et al.*, 1920) is an important limiting factor in apple and pear trees production and in other fruit trees and ornamental plants worldwide. The disease is currently present in 46 countries, including most part of North and Central America, the Pacific rim (mainly New Zealand) and most countries of Middle East, the Balkans and the Mediterranean area (van der Zwet, 1993, 1996, 2002, personal communication, 2004; van der Zwet & Bonn, 1999). Fire blight was reported for the first time in Europe in south England in 1957. Since then, the pathogen has spread to the majority of pear and apple production areas in an increasing number of European countries (van der Zwet, 2002) and is considered as a quarantine bacterium in the European Union (EU) (Anon., 2000). *E. amylovora* was identified in 1966 in the Netherlands and Poland, a couple of years later in Denmark, and in the early seventies in Germany, Belgium and France. In the eighties, the disease was described in Luxembourg, Ireland, Norway, Sweeden, Czech Republic and Switzerland, as well as in Cyprus, Israel, Turkey and Greece. In the nineties, fire blight was reported in Austria, Moldavia, Italy, Bulgaria, Romania, Hungary, Albania and former Yugoslavia (van der Zwet, 1993, 1996; van der Zwet & Bonn, 1999). More recently, in the present decade, *E. amylovora* has been detected in Ukraine and Slovakia (van der Zwet, 2002, personal communication, 2004).

Since the detection of *E. amylovora* in southern France in 1978 (Paulin & Lachaud, 1978), Spain was actively working to prevent the introduction of fire blight and was considered a protected country in relation to fire blight according to the EU legislation since 1993. A monitoring network for annual inspection of hosts, similar to the Italian network (Mazzuchi, 1994), was developed all over the country, with laboratory analysis

of suspected samples. In 1995, *E. amylovora* was identified for the first time in Spain in Guipúzcoa (País Vasco), close to the Atlantic French border. An intensive survey in that area allowed the detection of some other small outbreaks and most of the infections were observed on cider apple and dessert apple and, to a lesser extent, on *Pyrus*, *Pyracantha*, *Crataegus*, *Cotoneaster* and *Sorbus*. In a region nearby, Navarra, the first fire blight outbreak was identified in 1996 and in the following years, other foci were found in the northern area of this region where *Malus*, *Pyrus*, *Mespilus* and *Cydonia* were affected, being *Pyracantha* the most common host (López *et al.*, 1999a). When strains of *E. amylovora* from these two regions (País Vasco and Navarra) were analysed by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), all them fitted into Pt4 pattern, previously reported in the West of France and the South of the United Kingdom (Jock *et al.*, 2002). In 1996, *E. amylovora* was isolated in a nursery of Segovia (Castilla-León) on *Crataegus monogyna* plants imported from Belgium the year before and on *Pyracantha*, *Pyrus* and *Sorbus* plants growing nearby and, in 1998, on different Rosaceous hosts in another nursery located in Guadalajara (Castilla-La Mancha), that had also imported *C. monogyna*. No relationship with the previous Spanish outbreaks was found. The strains from both nurseries showed PFGE pattern Pt3, already described in Northeastern Italy, Northern France, Belgium and the Netherlands (Jock *et al.*, 2002). A few foci of *E. amylovora* were identified in 1998 in several pear orchards in Lérida (Cataluña) in a region with an important fruit production. Several small outbreaks of the disease were found in 1998, 1999 and 2000 in Aragón and in 2000 in La Rioja with no apparent connection with those previously detected (Fig. 1). Ornamental plants and pear trees were affected in Huesca and Zaragoza (Aragón) and only pear in La Rioja (López *et al.*, 2002a). Eradication measures were immediately taken in all the affected plots

following the EU legislation (Anon., 2000), and all the Spanish areas are still considered a protected zone, according to the EU rules.

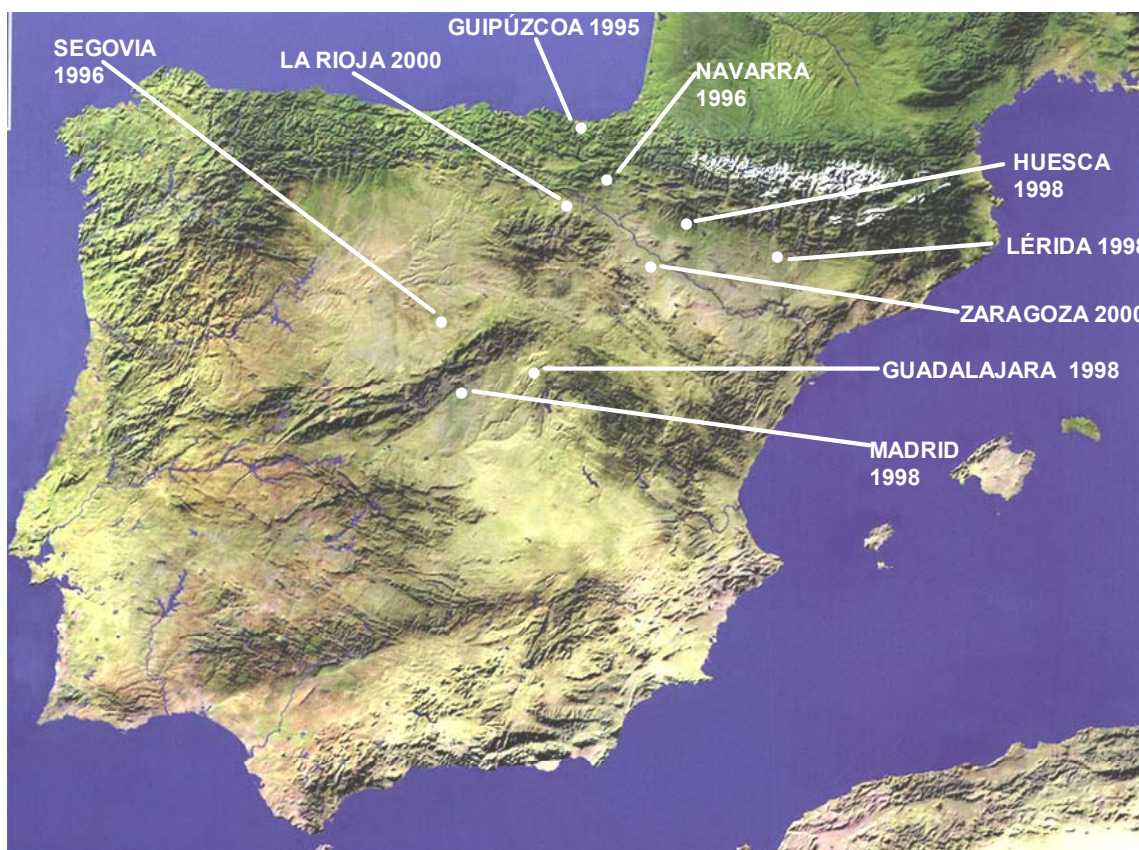


Fig. 1. Localization of foci of *E. amylovora* in Spain from 1995 to 2000 indicating the first year of detection. The provinces and regions of the different foci are indicated in Table 1.

Several studies have described the characterization of *E. amylovora* strains from some European countries, either phenotypically (Billing *et al.*, 1961; Paulin & Samson, 1973; Vantomme *et al.*, 1982, 1986; Mergaert *et al.*, 1984) or genotypically (Momol *et al.*, 1997; Zhang & Geider, 1997; Jock *et al.*, 2002; Keck *et al.*, 2002), but only two reports have described the recent occurrence of the fire blight pathogen in Spain (López *et al.*, 1999a, 2002a). The present study describes, for the first time, the characterization of a

large collection of *E. amylovora* Spanish strains, including those from the first foci in 1995 as well as other from new outbreaks from 1998 to 2000.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Bacterial strains and growth conditions

We have characterised 130 *E. amylovora* strains, recovered from affected hosts from seven plant species and eight Spanish regions, and compared them to 16 reference strains of this species from ten countries (Table 1). White *E. amylovora*-like colonies on King's B medium (King *et al.*, 1954) and white domed colonies on Sucrose Nutrient Agar (SNA) medium (Billing *et al.*, 1961) were presumptively identified to the species level by their negative Gram reaction, negative oxidase test, oxidative/fermentative metabolism (O/F) by the Hugh-Leifson's test, absence of fluorescence in King's B medium and negative nitrate reduction test, as described by Schroth & Hildebrand (1988) and Jones & Geider (2001). Bacterial strains were routinely grown in King's B medium and incubated at 26°C for 48 h unless otherwise indicated. All strains were maintained at –80°C on 30% (v/v) glycerol.

Table 1. Source, origin and year of isolation of Spanish and reference strains of *Erwinia amylovora*.

Origin ^a	Host	Years of isolation	No. of strains ^a
Spanish strains			
Aragón	<i>Cotoneaster</i> sp.	1998	1
(Huesca, Zaragoza)	<i>Pyracantha</i> sp.	1998	1
	<i>Pyrus</i> sp.	1998 and 2000	3 (1)
	<i>Sorbus</i> sp.	1998	1
Castilla-La Mancha (Guadalajara)	<i>Cotoneaster</i> sp.	1998	1
	<i>Cydonia</i> sp.	1998	1
	<i>Malus</i> sp.	1998	1
	<i>Pyrus</i> sp.	1998	3
Castilla-León (Segovia)	<i>Crataegus</i> sp.	1996	3
	<i>Cotoneaster</i> sp.	1996	1
Cataluña (Lérida)	<i>Malus</i> sp.	1997	2
	<i>Pyrus</i> sp.	1998	3 (1)
La Rioja	<i>Pyrus</i> sp.	2000	1
Madrid	<i>Pyracantha</i> sp.	1998	1
Navarra	<i>Cotoneaster</i> sp.	1998	4
	<i>Crataegus</i> sp.	1998	2
	<i>Cydonia</i> sp.	1998	1
	<i>Malus</i> sp.	1995, 1996, 1997 and 1998	10
	<i>Pyracantha</i> sp.	1997 and 1998	49
	<i>Pyrus</i> sp.	1997 and 1998	3
	<i>Sorbus</i> sp.	1998	1
	País Vasco (Guipúzcoa)	<i>Cotoneaster</i> sp.	1996 and 1998
	<i>Malus</i> sp.	1995 and 1998	16 (1)
	<i>Pyracantha</i> sp.	1997 and 1998	3
	<i>Pyrus</i> sp.	1997 and 1998	15
Total no.:			130 (3)

Table 1. (Continued)

Origin ^a	Host	Years of isolation	No. of strains ^a
Reference strains ^b			
Bulgary	<i>Pyrus</i> sp.	Ea FG2	1
Canada	<i>Pyrus</i> sp.	NCPPB 311	1 (1)
France	<i>Cotoneaster</i> sp.	PV 1887, PV1778, PV 1775	3
	<i>Crataegus</i> sp.	CFBP 1430	1
Germany	<i>Malus</i> sp.	Ea 115	1 (1)
Italy	<i>Malus</i> sp.	OMP-BO 1185	1
New Zealand	<i>Pyrus</i> sp.	NCPPB 2080	1
The Netherlands	<i>Malus</i> sp.	NCPPB 3159	1
Turkey	<i>Eriobotrya</i> sp.	NCPPB 3548	1
United Kingdom	<i>Pyrus</i> sp.	NCPPB 683, Ea 3042	2
USA	<i>Crataegus</i> sp.	NCPPB 1819	1 (1)
	<i>Malus</i> sp.	Ea 273	1
	<i>Pyrus</i> sp.	NCPPB 2791	1 (1)
Total no.:			16 (4)

^a Number of strains by Spanish region (province) and by host, with the number of strains showing atypical results between brackets.

^b Ea 115, Ea 273 and Ea FG2: strains kindly supplied by J.P. Paulin, Centre INRA d'Angers, France; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, UK; PV, Protection des Végétaux, Angers, France; CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; OMP-BO, Osservatorio delle Malattie delle Piante, Bologna, Italy.

2.3.2. DASI-ELISA

The kit for DASI-ELISA detection of *E. amylovora* from PlantPrint Diagnostics (Faura, Valencia, Spain) (Gorris *et al.*, 1996a,b) was used without the enrichment step to confirm the identification of the Spanish strains (compared to the reference strains) following the recommendations provided on the kit. Plates were coated with 200 μ l per well of a working dilution (1:100) of rabbit anti-*E. amylovora* polyclonal antiserum in carbonate buffer pH 9.6 and incubated 4 h at 37°C. After washing three times with phosphate buffered saline (PBS) 10 mM, pH 7.2, plus 0.5% $g\ l^{-1}$ Tween 20, 200 μ l of each bacterial suspension ($OD_{600\ nm}$ ranging between 1.4 and 1.6), previously treated at 100°C for 10 min, were added in two wells, and the plates were incubated overnight at 4°C and washed again. Then, 200 μ l of a 1:1000 dilution of specific monoclonal antibodies for *E. amylovora* (Gorris *et al.*, 1996a,b) were added with PBS plus 5 $g\ l^{-1}$ bovine serum albumin, and the plates coated for 2 h at 37°C. After washing, a 1:1000 dilution in PBS of goat anti-mouse immunoglobulins conjugated with alkaline phosphatase was added. The plates were incubated 2 h at 37°C and washed once more. Afterwards, 200 μ l of p-nitrophenylphosphate (1 $mg\ ml^{-1}$) in substrate buffer were added and, after incubating 60 min at room temperature, plates were read at 405 nm in a Titertek Multiscan Plus MKII (Flow). The reaction was considered positive when the optical density was twice or higher than that of the negative control ($OD_{405\ nm} > 0.2$). The type strain of *E. amylovora* NCPPB 683 and the strain C58 of *Agrobacterium tumefaciens* were used as positive and negative control, respectively, and 40% of the strains were tested twice.

2.3.3. PCR analysis

All 130 strains were tested by PCR using primers AJ75 and AJ76 that amplify a 844-bp fragment of the 29-kb plasmid pEA29 of *E. amylovora* (McManus & Jones, 1995a). Briefly, 5 µl of the bacterial suspensions of *E. amylovora*, treated at 100°C for 10 min, and 50 pmol of the respective primers were added to the reaction tube. The PCR reaction mixture was made (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 4% formamide, 150 µM each dNTP and 2 units of *Taq* DNA polymerase, final volume 50 µl) and the amplification was performed as described before (McManus & Jones, 1995a) using a 9600 Gene Amp PCR System (Perkin Elmer). The positive and negative controls were those used for ELISA test. The amplification was considered positive when the expected band was obtained after staining the amplicons with ethidium bromide in 1% agarose gel. At least, 30% of the strains were tested twice.

2.3.4. Growth and colonial morphology on SNA, CCT, MS, MM1Cu and MM2Cu media

All strains were assayed for growth on CCT solid medium (Ishimaru & Klos, 1984), Miller Schroth Agar (MS) (Miller & Schroth, 1972) and on minimal agar media MM1 and MM2 containing copper sulfate and asparagine in different concentrations (MM1Cu and MM2Cu) (Bereswill *et al.*, 1998) at 26°C after 48 h. Sucrose nutrient agar (SNA) (Billing *et al.*, 1961) was used as a control for growth and levan production. The characteristics of the colonies grown on these media were recorded after 48 h and 72 h, and all the strains were tested at least twice. The positive and negative controls were those used for ELISA test.

2.3.5. Antibiotic susceptibility

All strains were tested for antibiotic susceptibility by streaking onto Luria-Bertani agar plates (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with the following filter-sterilised antibiotics: tetracycline ($12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$), streptomycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), kasugamycin ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) and oxolinic acid ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). Results were recorded after 48 h of incubation at 26°C and all the strains were tested twice, using as a control the streptomycin-resistant *E. amylovora* strain NCPPB 2791.

2.3.6. Biochemical characterization

A selection of 48 Spanish and 13 reference strains of *E. amylovora* from different sources and origins was further biochemically characterised by using API 20E (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). It is an identification system which uses standardized and miniaturized biochemical tests in a strip with 20 microtubes containing dehydrated substrates. After inoculation with a bacterial suspension and incubation, an API 20E profile that identifies the bacterium can be calculated from the results of readings. The galleries were used according to the manufacturer's instructions, except that incubations were made at 26°C and readings were performed after 24 and 48 h. To assess the reproducibility of the tests, 30% of the strains were tested twice and the positive and negative controls were those used for ELISA test.

2.3.7. Hypersensitivity and pathogenicity tests

The selected strains were also tested for hypersensitive reaction (HR) on tobacco leaves as previously described (Klement, 1982) using 10^7 , 10^8 and 10^9 cfu ml^{-1} bacterial suspensions. The type strain of *E. amylovora* NCPPB 683 was used as positive control and PBS as the negative one. Plants were maintained at room temperature and readings were done at 24, 48 and 72 h. Assays for pathogenicity were carried out in immature

pear fruits (Williams variety, 3 to 3.5 cm diameter) using two pears per bacterial strain and the same controls as above. Prior to inoculation, all fruits were washed once with a solution of 50% sodium hypochlorite (v/v) and twice with sterile water for 5 min. They were inoculated by making a transverse cut with a disinfected scalpel and pipetting inside the wound 10 µl of bacterial suspensions of 10^5 , 10^7 and 10^9 cfu ml⁻¹ in sterile PBS, and were incubated in humidity chambers at 25°C for a week. Symptoms development was followed and recorded daily for one week. All the inoculations were repeated at least twice.

2.4. Results

2.4.1. Characteristics of the 130 Spanish strains

All the Spanish and reference strains of *E. amylovora* reacted positively in DASIELISA using the mixture of monoclonal antibodies from the Spanish kit for detection and identification of *E. amylovora*. The positive serological reaction ranged between 0.8 and 5.4 OD_{405 nm}, with 100% of reproducibility when 40% of the strains were tested twice. As well, the 844-bp fragment of the pEA29 plasmid was amplified by PCR from all *E. amylovora* strains assayed using the primers AJ75 and AJ76, showing 100% reproducibility for the strains retested, at least 30%.

All the Spanish strains of *E. amylovora* were able to grow on SNA, CCT, MS, and MM2Cu media, regardless of the isolation origin. Growth of strains after 48 h gave rise *E. amylovora*-like colonies that were white domed on SNA medium and light violet domed on CCT, red fluid on MS medium and pale yellow on MM2Cu. They showed a varying degree of mucoidy in this medium, with 24% of the Spanish strains showing less fluid colonies. However, one of the 130 Spanish strains of *E. amylovora* was levan-

deficient and produced atypical not domed colonies on SNA and CCT media (Table 2). All the 16 reference strains of *E. amylovora* from different countries and origins grew well on SNA, CCT, MS and MM2Cu media as expected, with only two of them producing levan-deficient colonies on SNA and CCT media (Table 2) and only two strains being less fluid on MM2Cu. None of the Spanish and reference strains of *E. amylovora* gave rise colonies on MM1Cu, whereas the strain of *Agrobacterium tumefaciens* grew on this medium.

Growth of strains on LB plates supplemented with different antibiotics have shown that all the Spanish and reference strains were sensitive to tetracycline, oxolinic acid, kasugamycin and streptomycin, except for the reference strain NCPPB 2791 isolated in USA from *Pyrus* sp., that was able to grow on streptomycin at such concentration, as expected (Table 2).

Table 2. *Erwinia amylovora* strains showing atypical results.

Spanish strains ^a							
	Origin	Host	Growth on media ^b		Str ^c (50 µg ml ⁻¹)	HR ^d	Pear test ^e
			SNA	CCT			
IVIA 1509-B	País Vasco	<i>Malus</i> sp.	+ ^{LD}	+ ^{LD}	S	+	+
IVIA 1739-1	Cataluña	<i>Malus</i> sp.	+	+	S	+ ^D	+
IVIA 1951-8	Aragón	<i>Pyrus</i> sp.	+	+	S	+ ^D	+
Reference strains ^a							
Ea 115	Germany	<i>Malus</i> sp.	+ ^{LD}	+ ^{LD}	S	+	+
NCPPB 311	Canada	<i>Pyrus</i> sp.	+	+	S	+ ^D	-
NCPPB 1819	USA	<i>Crataegus</i> sp.	+ ^{LD}	+ ^{LD}	S	+	+
NCPPB 2791	USA	<i>Pyrus</i> sp.	+	+	R	+	+

^a IVIA, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias; Ea 115, strain kindly supplied by J.P. Paulin, Centre INRA d'Angers, France; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, UK

^b +: levan positive colonies, +^{LD}: levan-deficient colonies.

^c S: sensitive, R: resistant to streptomycin at the concentration assayed.

^d Hypersensitive reaction on tobacco leaves, +: positive reaction within 24 h, +^D: positive reaction delayed up to 72 h.

^e Green pear test, +: production of typical symptoms, -: no symptoms.

2.4.2. Biochemical characterization and pathogenicity of selected strains

A selection of 61 representative strains of *E. amylovora*, including 48 Spanish and 13 reference strains was characterised by using the API 20E system. After 48 h of incubation at 26°C, all Spanish and reference strains were positive for acetoin production and acid production from glucose and sucrose, being negative for arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, H₂S production, urease, tryptophan deaminase, indole production, and acid production from rhamnose and amygdalin (Table 3). Some variability was found in β-galactosidase activity and gelatin hydrolysis, being positive for 31 and 4 of the 61 strains, respectively, and in acid production from mannitol, sorbitol and arabinose, with 53 strains being positive for these three carbon sources. Only two of them were able to produce acid from inositol or melibiose (Table 3). *E. amylovora* strains displayed quite homogeneous API 20E results, with 48% of them showing the profile 1005522 and 31.5% the profile 0005522. This second majority pattern was due to the negative result in the β-galactosidase activity. Five other minority API 20E profiles were observed (Table 3). When 30% of the strains were assayed twice, the reproducibility of the API 20E tests ranged between 80% and 100%.

HR on tobacco leaves was observed 24 h after infiltration in all cases, except for three strains which consistently showed reactions delayed to 72 h. This was confirmed performing three infiltrations per strain in different plants and repeated in two independent experiments. These strains were NCPPB 311, from *Pyrus* from Canada and two Spanish strains (IVIA 1739-1 and IVIA 1951-8), from *Malus* and *Pyrus*, respectively (Table 2). Elicitation of HR was similar either for 10⁸ or 10⁹ cfu ml⁻¹ *E. amylovora* suspensions, whereas 10⁷ cfu ml⁻¹ inoculum did not produce any reaction.

Assays for pathogenicity on immature pear fruits and for virulence on pear seedlings gave positive results with all *E. amylovora* strains assayed, except for the reference strain NCPPB 311, which did not produce symptoms after a week on pear fruits (Table 2), as reported by other authors (Billing *et al.*, 1961), nor in pear seedlings after 5 days. However, three out of eight inoculated seedlings showed symptoms after 10 days. All the other strains developed the typical symptoms with abundant bacterial exudates and necrosis of the succulent tissues. The rate of development of symptoms showed no differences among the three bacterial concentrations assayed (10^5 , 10^7 and 10^9 cfu ml⁻¹).

Table 3. Biochemical characteristics of selected *Erwinia amylovora* strains by using the API 20E system.

No. of strains	Reactions ^a																			API 20E codes	% of strains	
	β -galactosidase	Arginine dihydrolase	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Citrate utilization	H ₂ S production	Urease	Tryptophan deaminase	Indole production	Voges Proskauer	Gelatin hydrolysis	Glucose	Mannitol	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Melibiose	Amygdalin			Arabinose
29	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	1005522	48
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	0005522	31.5
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	0005020	11.5
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	0007522	3
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	1007522	3
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	0005420	1.5
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	0005562	1.5
Total no.:		61																			100	

^a Readings according to the manufacturer's instructions after 48 h incubation at 26°C.

2.5. Discussion

This paper reports the first characterization of a collection of strains of *E. amylovora* isolated from 1995 to 2000 in the first and the subsequent foci found in Spain. Their analysis by DASI-ELISA and pEA29-PCR further confirmed their identification. This demonstrates the validity and utility of the two specific monoclonal antibodies of *E. amylovora* previously obtained (Gorris *et al.*, 1996a,b) and the specificity of primers AJ75 and AJ76 (McManus & Jones, 1995a) for the identification of this pathogen.

Several selective and differential media, including CCT, MS and MM2Cu, developed for the isolation and differentiation of *E. amylovora* from suspected plant material (Miller & Schroth, 1972; Ishimaru & Klos, 1984; Bereswill *et al.*, 1998) were evaluated with 130 Spanish strains. All of them and the 16 reference strains grew on CCT, MS and MM2Cu media, as well as on SNA used for control, the majority of them producing typical colonies after 48 h of incubation at 26°C. However, atypical not domed colonies on SNA and CCT media were observed for one of the 130 Spanish and for two of the 16 reference strains. The existence of levan-deficient isolates of *E. amylovora* was previously reported in the Netherlands by Bereswill *et al.* (1997). These authors studied the levan synthesis in several Dutch strains that did not synthesise levan at 28°C (in spite of carrying an intact levansucrase gene) but the synthesis was partially restored at 18°C, indicating a temperature-dependent regulation (Bereswill *et al.*, 1997). In our study, the Spanish strain IVIA 1509-B was levan positive at the time of isolation and was recovered as levan negative (after several transfers and criopreservation at -80°C) after incubation at both 26°C and 18°C (data not shown). Bereswill *et al.* (1997) also found an unstable reversion to this phenotype, which could be due to small changes in regulatory proteins. It has been proposed that levan production occurs only in presence

of sucrose, the substrate for levansucrase. Furtherly, the expression of this gene in *E. amylovora* might be unfavourable for the bacterium in a plant environment with a low level of this sugar, such as young leaves or the xylem of apple plants (Geier & Geider, 1993; Bogs & Geider, 2000), but favourable in the nectaries of flowers of the family *Rosaceae*.

All the Spanish and reference strains of *E. amylovora* grew well on MM2Cu medium. In addition, most of them produced typical mucoid colonies due to the presence of copper ions on this medium, that induce exopolysaccharide synthesis, which is variable among strains (Bereswill *et al.*, 1998). In fact, 24% of the Spanish strains and 12% of the reference ones showed less fluid intense yellow colonies on MM2Cu (data not shown). It has been reported that the yellow color formation could be caused by the copper ions, that may form a complex with surface components of the cells (Bereswill *et al.*, 1998). Thus, more fluid colonies exhibit pale yellow color, whereas less fluid ones give intense color, probably because the yellow pigmentation is faded by the exopolysaccharides secreted (Bereswill *et al.*, 1998). None of the Spanish and reference strains of *E. amylovora* studied grew on MM1Cu medium, due to the presence of copper ions together with a low content of asparagine. Thus, the differential growth of the Spanish strains on MM2Cu and MM1Cu is an additional criterion to confirm their identification as *E. amylovora*, as previously proposed by Bereswill *et al.* (1998).

Regarding antibiotic susceptibility, none of the Spanish strains assayed showed resistance to streptomycin, tetracycline, kasugamycin and oxolinic acid *in vitro*. These antibiotics were selected because they have been applied for fire blight control (Saygili & Üstün, 1996; Psallidas & Tsiantos, 2000; Shtienberg *et al.*, 2001). These results were expected since the use of these antibiotics is forbidden in the EU, with some exceptions

as kasugamycin, which is registered for pear treatments in Spain. In this case, the concentration applied in the field is much higher (50-500 p.p.m.) and usually in combination with copper treatments, that could prevent the appearance of resistances (Psallidas & Tsiantos, 2000). Only one North American strain, NCPPB 2791, confirmed its resistance to streptomycin. Such antibiotic resistance has been described in countries using this compound for fire blight control (Loper *et al.*, 1991; McManus & Jones, 1994a; Jones *et al.*, 1996; Jones & Schnabel, 1998; Vanneste & Voyle, 1998).

The biochemical characterization of a selection of 48 Spanish strains of *E. amylovora* and 13 reference strains by using the API 20E system has shown quite homogeneous profiles. In previous studies with *E. amylovora* using the same galleries (Mergaert *et al.*, 1984; Vantomme *et al.*, 1986) several profiles were described, being the most frequent 0005522, also one of the two mainly found in our work. In the present study we have observed five other profiles with lower frequencies, being two of them also recorded by such authors. These biochemical differences among strains of *E. amylovora* and their API 20E patterns were also previously described (Paulin & Samson, 1973; Verdonck *et al.*, 1987). Moreover, reproducibility of acid formation from mannitol, sorbitol and arabinose in API 20E system was low in our study, as well as in those of other authors, indeed using conventional methods (Paulin & Samson, 1973). These results suggest that such tests should not be considered for the identification of this bacterium. In spite of this, the homogeneity of the API 20E profiles of *E. amylovora* demonstrates the utility of this system together with a few conventional tests (Jones & Geider, 2001) for its presumptive identification.

Consequently, we consider that DASI-ELISA with specific monoclonal antibodies (Gorris *et al.*, 1996a,b), PCR with specific primers (McManus & Jones, 1995a), API

20E, together with the use of several selective and differential media, (CCT (Ishimaru & Klos, 1984), MS (Miller & Schroth, 1972) and MM2Cu (Bereswill *et al.*, 1998)), are useful for phenotypic and molecular identification of the fire blight pathogen. Macrorestriction with *Xba*I and subsequent PFGE has been used in other studies for characterization of *E. amylovora* strains of different origins (Zhang & Geider, 1997). When applied to a selection of 29 Spanish strains of *E. amylovora*, 22 of them showed the pattern Pt4, whereas 7 of them exhibited the pattern Pt3 (Jock *et al.*, 2002).

Pear fruits inoculation assays demonstrated the pathogenicity of all Spanish strains and confirmed that of the reference ones, with the exception of NCPPB 311. This strain, originally described as pathogenic, was later reported not to produce ooze in small immature pear fruits or slices from a culture that was maintained freeze dried about two years (Billing *et al.*, 1961). On the other hand, it has been described that *E. amylovora* strains which slowly hydrolyse gelatin were also slow producers of ooze in pear fruits and presented a low degree of capsulation (Billing *et al.*, 1961). In our biochemical characterization of 61 strains, we only found four being positive for gelatin hydrolysis, and all four produced symptoms in pear fruits. The 57 remaining strains were negative for gelatin hydrolysis and all but one produced typical lesions. Thus, the hypothetical correlation proposed between gelatin hydrolysis and symptoms production seems unclear.

Other studies (Geier & Geider, 1993; Bogs & Geider, 2000) have proposed that levansucrase mutants of *E. amylovora* can be affected in their pathogenicity, because they produced typical symptoms on immature pears, but their development on pear seedlings was delayed a few days (Geier & Geider, 1993) or was not appreciable on apple seedlings (Bogs & Geider, 2000). Thus, we inoculated the levan-deficient strains

(one Spanish strain and two reference strains) on pear seedlings with 10^5 , 10^7 and 10^9 cfu ml⁻¹ suspensions and found that they produced typical necrosis after 5 days, indicating that they did not show a delay in development of symptoms, either with any of the inocula used. In addition, when 10^8 and 10^9 cfu ml⁻¹ suspensions of these strains were infiltrated on tobacco leaves, HR was observed after 24 h, as usual for typical *E. amylovora* strains. Further, they grew on M9 minimal medium (Maniatis *et al.*, 1982) with 1% of sucrose, showing that they are not affected in sucrose metabolism (data not shown).

The majority of the studied *E. amylovora* strains developed a HR within 24 h and were pathogenic on pear fruits and seedlings, but the Spanish strains IVIA 1951-8 and IVIA 1739-1 induced a delayed HR on tobacco and produced typical symptoms in the green pear test, as well as on pear seedlings. To discard that possible differences in growth rates could be involved in the delayed HR observed, a growth curve in liquid King's medium B (King *et al.*, 1954) was done with these three strains. Their growth rates were comparable to that of the reference strain CFBP 1430 and they also grew on M9 glucose minimal medium (Maniatis *et al.*, 1982) as the controls (data not shown). This indicates that an auxotrophy was not the explanation for their inability to produce HR within 24 h, neither for the lack of symptoms in pear fruits in the case of strain NCPPB 311. Analysis of different *E. amylovora* pathogenicity mutants in other works had shown distinct phenotypes depending on the affected region: complete loss of HR-eliciting activity and pathogenicity (Wei *et al.*, 1992; Kim & Beer, 1998), partial reduction of both activities (Barny, 1995) or no influence on HR elicitation or pathogenicity (Kim & Beer, 1998).

This study describes the first characterization of Spanish strains of *E. amylovora*, with 100% of the strains giving positive reactions both by DASI-ELISA and pEA29-PCR, and the majority of them producing typical colonies on SNA, CCT, MS and MM2Cu media and being able to produce HR and symptoms in pear fruits, although some atypical reactions were also observed. Overall results show a high phenotypic homogeneity among the Spanish strains analysed and no differences related to the host or geographical origin were observed. The detection of fire blight in Spain few years after the opening of the borders among the EU countries, as well as the geographic distribution of fire blight in Spain, strongly suggest that the infection source was the introduction of plant material from other countries. At least in certain cases, the molecular analysis of Spanish *E. amylovora* strains supported this hypothesis (Jock *et al.*, 2002; López *et al.*, 2002a). Intensive surveys in other Spanish regions have not found new outbreaks of the disease and several years after its first discovery, fire blight is not yet widespread in Spain (López *et al.*, 2002a).

2.6. Acknowledgements

V. Donat thanks the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias for a predoctoral grant, and E. G. Biosca thanks the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain for a contract within the Ramón y Cajal programme. This work was supported by CICYT projects AGF98-0402-C03-02 and AGL2001-2349-C03-02. We thank J.P. Paulin (Centre INRA d'Angers, Beaucouzé, Cedex, France), K. Geider (Max-Planck-Institut für Zellbiologie, Rosenhof, Ladenburg, Germany), C. Bazzi (Università di Bologna, Bologna, Italy) and E. Montesinos (Instituto de Tecnología Agroalimentaria-CeRTA, Universitat de Girona, Girona, Spain) for providing some of the *E. amylovora* strains. We are also grateful to M. Cambra (Centro de Protección Vegetal, Zaragoza, Spain) for providing green pears for the pathogenicity assays, as well as to other Spanish colleagues that provided some *E. amylovora* strains.

CAPÍTULO 3

Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis

Susanne Jock, Victoria Donat, Maria M. López, Carlo Bazzi and Klaus Geider

Environmental Microbiology, 4:106-114 (2002)

3. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis

3.1. Summary

Fire blight has been detected recently in several areas of northern Spain and north-eastern Italy. To follow spread of the disease within Europe, more than 120 *Erwinia amylovora* strains isolated from 1957-2000 in England, France, Germany, The Netherlands, Belgium, Poland, Italy and Spain were assayed using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of genomic DNA after *Xba*I digestion. Pattern types Pt1 and Pt4 were found for strains from England. Pt1 was also found in central Europe and eastern France, Pt4 in western France. Pt2 appeared first in Egypt, from where strains with this pattern disseminated northwards as far as into the Balkans. Pt3 was typical for northern France and Belgium. Strains from Spain displayed the pattern types Pt3 and Pt4. In Italy, Pt2 was found in the south-eastern areas, Pt3 in the north-eastern areas, and Pt1 was found very recently in orchards adjacent to the Austrian border, together with Pt3. Despite barely controlled trade with fire blight host plants and associated plant products within Europe, the PFGE patterns of the *E. amylovora* isolates were ordered indicating sequential spread. On the other hand, the appearance of Pt3 in northern Italy and central Spain can be explained by the import of contaminated plants by nurseries.

3.2. Introduction

Fire blight, caused by the Gram-negative bacterium *Erwinia amylovora*, is a destructive disease of apple and pear fruit trees and many other rosaceous plants in most European countries including the Mediterranean area (van der Zwet, 1996; Bonn & van der Zwet, 2000). Infections may kill flower clusters, fruitlets, leaves and shoots; cankers on branches and trunks, often accompanied by ooze running along the bark, and may cause partial destruction or complete plant death. The disease was endemic for North America and is still largely confined to the Northern hemisphere, except for its occurrence in New Zealand since 1919 and transiently in Australia in 1997 (Jock *et al.*, 2000). In Europe, fire blight was first detected in 1956 in England and, for the Mediterranean region, in 1962 in Egypt (Bonn & van der Zwet, 2000), from where the pathogen spread into surrounding countries. The time-span for genomic divergence is therefore relatively short for the pathogen, which can be quickly transmitted by many vectors such as insects, birds, wind and contaminated or latently infected plant material (McManus & Jones, 1994b; van der Zwet & Beer, 1995). There are still many countries in which the disease has not been reported (Bonn & van der Zwet, 2000). Besides trade restrictions implied, a major concern arises from possible uncontrolled transmissions, and the spread of the disease into new regions could be elucidated by tracing markers associated with strains of an area.

Recently, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) revealed several restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in *E. amylovora* strains from different geographical origins (Zhang & Geider, 1997; Zhang *et al.*, 1998). The application of this molecular typing method can give useful information on the dissemination of populations of the pathogen. Recent outbreaks of fire blight in Spain and in Italy, especially in the district

of Bolzano (South Tyrol), renewed the question about a possible connection of *E. amylovora* in these areas to strains from other parts of Europe. In a previous study (Zhang *et al.*, 1998), the pattern of strains from south-eastern and north-eastern Italy could be correlated to patterns of strains from the east Mediterranean region and northern France/Belgium respectively. As fire blight has been found in many regions of France since 1970, a progression into Spain has been expected. The disease has occurred in several Spanish regions since 1995 (López *et al.*, 1999a). Its origin could be diverse, and the strains were therefore analysed by PFGE, in addition to recently isolated strains from north-eastern and northern Italy. Preliminary reports of part of the data were included in Proceedings contributions (Bazzi *et al.*, 1999, 2000; Jock *et al.*, 2001).

3.3. Results

3.3.1. General classification of *E. amylovora* strains from Europe

Erwinia amylovora strains were differentiated by PFGE after digestion of genomic DNA with rare cutting restriction enzymes. Earlier (Zhang & Geider, 1997; Zhang *et al.*, 1998) and new RFLPs obtained with *Xba*I-digested DNAs were used to group strains from different geographic regions into pattern types Pt1, Pt2, Pt3, Pt4, Pt5 and now, in addition, Pt6 (Table 1). This classification has been refined by the description of subgroups within the standard pattern of a region, when only a single strain with a change in one DNA fragment was found. The six patterns differ for an *Xba*I digest in the position of one band or two bands in the case of Pt5 (Fig. 1). Pt1, typical for central Europe, was also found before for *E. amylovora* strains from New Zealand and Australia (Jock *et al.*, 2000) and for a strain from Canada (Zhang & Geider, 1997). In

the case of Pt3, a low molecular weight band at 50 kb is common, but is missing in the widely used strain CFBP1430 from France. As strain CFBP1367 (Ea321) produced the fragment, this strain has now been defined as a standard for Pt3. Although low molecular weight DNA fragments were not considered to be reliable markers in PFGE separations in older assays (Zhang & Geider, 1997), the lack of the 50 kb fragment for CFBP1430 could indicate a variant of Pt3. In an *SpeI* digest, the DNA fragments were identical for all groups, except for Pt3, in which a dominating fragment of 800 kb was generated (data not shown).

Table 1. A scheme for classification of *E. amylovora* strains from Europe and the Mediterranean region by PFGE analysis of *XbaI* digests shown in Fig. 1.

Major pattern type	Early strain with pattern	Origin	Year of isolation	Pattern also found in strains from:
Pt1	S59/5	England ^a	~1958	Central Europe, New Zealand
Pt2	Ea4/82	Egypt	1982	East Mediterranean regions
Pt3	CFBP1367	France ^{a, b}	1972	Northern France, Belgium
Pt4	Ea775	England ^a	~1959	Western France
Minor type ^c				
Pt5	115.22	Bulgaria ^a	1989	Israel ^a
Pt6	01SFR-BO	Italy ^a	1991	(Novel)

a. Other pattern types have been found in the same country. Further details may be found in the work of Zhang & Geider (1997) and Zhang *et al.* (1998). Previous designations were: CE, for Pt1; MT, for Pt2; FR, for Pt3.

b. The previously proposed strain CFBP1430 lacks a DNA fragment of 50 kb (see Fig. 1, lane 3).

c. Single strains with a unique pattern type are not included in the Pt-list.

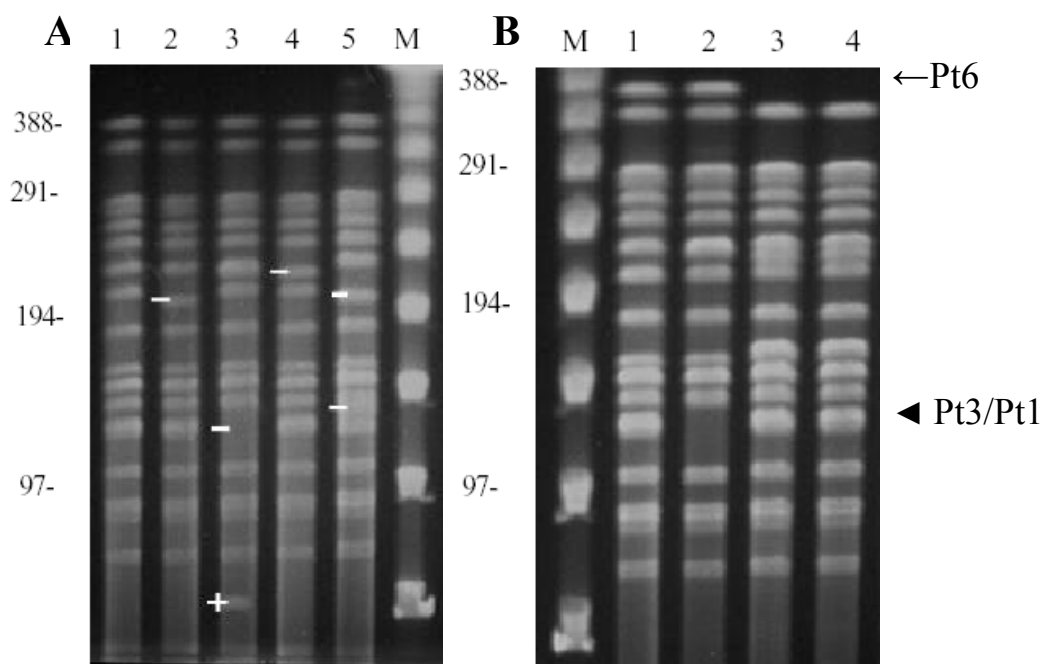


Fig. 1. PFGE analysis of *E. amylovora* strains with the *Xba*I patterns Pt1 to Pt5. A. Lane 1, S59/5 (Pt1); 2, Ea4/82 (Pt2); 3, CFBP1367 (Pt3); 4, Ea775 (Pt4); 5, 115.22 (Pt5); M, marker of lambda multimers with sizes indicated at the left rim. An additional fragment for CFBP1367 and most Pt3 strains compared with CFBP1430, a standard strain in France, is indicated by '+'. A characteristic band shift in comparison with Pt1 is indicated by '-'. B. Lane 1, Ea1179 (Germany, Pt1); 2, CFBP1430 (France, Pt3A); 3, 01SFR-BO (Italy, Pt6); 4, 03SFR-BO (Italy, Pt6); M, marker of lambda multimers. A band missing for Pt6 is indicated by the arrow '←Pt6'; the arrow '◀ Pt3/Pt1' points to a band distinguishing pattern type Pt3 from Pt1.

3.3.2. PFGE pattern types of *E. amylovora* strains isolated in England, France, Germany and Poland

A slightly heterogeneous PFGE pattern for strains from England was used to support the assumption that several strains could have been introduced during the time of the first fire blight outbreaks in England (Zhang & Geider, 1997). The type strain of *E. amylovora* S59/5 isolated in England (ATCC15580, NCPPB683, CFBP1232) displayed pattern Pt1. Strain Ea775 was set as standard for Pt4 (Fig. 1). Additional patterns (Zhang & Geider, 1997) were not recovered again. The major two patterns were also found for other strains in southern England (Fig. 2). Pt1 was recovered for most strains in central Europe as well as in strains from eastern France. Four strains from Europe, which were isolated in Poland, confirmed the distribution of Pt1 as a constant pattern observed in eastern France, through to Germany and the bordering countries. An additional set of *E. amylovora* strains isolated in 1996 in southern Germany (Ea242 to Ea299) confirmed the dominant occurrence of Pt1 in central Europe (Table 2).

The other major pattern of English strains, Pt4, was recovered from strains isolated in western France (Table 2). From one infected plant (*Cotoneaster* sp.) of south-western Germany, several isolates were analysed (example: Ea-FR3/98). Although the population was expected to be homogeneous, the isolates differed from each other in mucoidy of colonies on MM2Cu agar described by Bereswill and colleagues (Bereswill *et al.*, 1998). All isolates showed the same PFGE pattern, which was slightly different from Pt1 and the other standard pattern types. This is an example of a variant for Pt1 within a large number of investigated strains isolated in central Europe. Variants have also been found in the pattern type Pt4 for strains from the area of Angers (France),

different from the common pattern in western France (Table 2). In the northern part of France, Pt3 was the dominant pattern type.

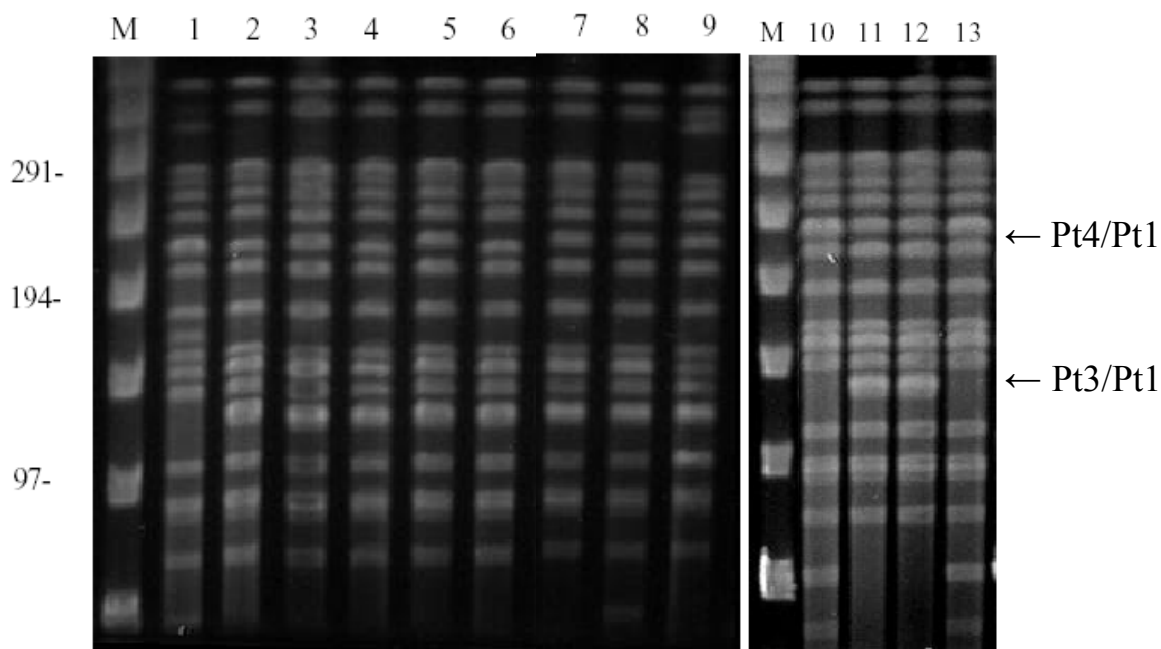


Fig. 2. PFGE analysis of strains from France (F), England (UK) and Italy (I) after *Xba*I digests. Lane 1, CFBP1990 (F, Pt3B); 2, CFBP1991 (F, Pt4); 3, CFBP2301 (F, Pt1); 4, CFBP2310 (F, Pt4); 5, P1570 (UK, Pt1); 6, P1573 (UK, Pt4); 7, 983042 (UK, Pt1); 8, Ea-UK1a/98 (UK, Pt1); 9, Ea-FR3/98 (Germany, Pt1 A); M, marker of lambda multimers; 10, SFR-BO776R/99 (I, Pt3); 11, BZ33 (I, Pt1); 12, BZ20 (I, Pt1); 13, BZ37 (I, Pt3). The arrows (←) indicate a region of bands for assignment of pattern types.

Table 2. Description of the *E. amylovora* strains used for PFGE analysis.

Strain	Description of isolation (plant, place, year, provider; alternative designation)	PFGE type
Belgium		
DGBBC350	<i>Malus tsonoski</i> , tree nursery, Oosterzele, 7/1998, T. Deckers	Pt3A
DGBBC351	<i>Pyrus communis</i> ‘Beech Hill’, tree nursery, Oosterzele, 7/1998, T. Deckers	Pt3
LMG1880	<i>P. communis</i> , 1979	Pt3
LMG1884	<i>Cotoneaster salicifolius</i> , 1980	Pt3C
LMG1893	<i>P. communis</i> , 1980	Pt3
LMG1964	<i>Sorbus aria</i> , 1981	Pt1
OVG038	<i>Malus domestica</i> , M. Maes	Pt3
OVG040	<i>P. communis</i> , M. Maes	Pt1
England		
983042	<i>M. domestica</i> , Sussex, 1998, H. Stanford	Pt1
983043	<i>M. domestica</i> , Sussex, 1998, H. Stanford	Pt1
Ea595 ^a	<i>P. communis</i> , England, 1958, NCPPB595	Pt1
Ea775 ^a	<i>Crataegus</i> sp., England, ~1959, NCPPB775	Pt4
Ea-UK1a/98	Isolated from hawthorn (<i>Crataegus</i> sp.) wood obtained from E. Billing, Kent, 1998	Pt1
Ea-UK1b/98	Hawthorn (<i>Crataegus</i> sp.), Kent, 1998	Pt1
Ea-UK2/98	Hawthorn, Kent, 1998	Pt1
Ea-UK3a/98	Hawthorn, Kent, 1998	Pt1
Ea-UK3b/98	Hawthorn, Kent, 1998	Pt1
Ea-UK4/98	Hawthorn, Kent, 1998	Pt1
P1570	<i>Cotoneaster</i> sp., Somerset, 1995, A. Aspin	Pt1
P1571	<i>Cotoneaster</i> sp., Worcester, 1995, A. Aspin	Pt1s
P1573	<i>Cotoneaster</i> sp., Dorset, 1995, A. Aspin	Pt4
S59/5 ^a	Type strain, <i>P. communis</i> , England, obtained as CFBP 1232 from French collection; ATCC15580, NCPPB683	Pt1

Table 2. (Continued)

Strain	Description of isolation (plant, place, year, provider; alternative designation)	PFGE type
France		
6-45	<i>Cydonia oblonga</i> , France, Lyon, 1992; LNPV92-1574	Pt4
7-15	<i>P. communis</i> , Angers 1991; LNPV91-1145	Pt4B
9-7	<i>P. communis</i> , Toulouse, 1994; LNPV94-1416	Pt4
9-43	<i>Cotoneaster horizontalis</i> , Strasbourg, 1994; LNPV94-1870	Pt1
9-75	<i>Cotoneaster watereri</i> , Rennes, 1994; LNPV94-2143	Pt4
11-49	<i>Cotoneaster</i> sp., Colmar, 1994; LNPV94-3644	Pt1
CFBP1367 ^a	<i>Crataegus</i> sp., Lille, 1972, J.P. Paulin	Pt3
CFBP1430 ^a	<i>Crataegus</i> sp., Lille, 1972, J.P. Paulin	Pt3A
CFBP1990	<i>M. domestica</i> 'Idared', Lille, L. Gardan	Pt3B
CFBP1991	<i>M. domestica</i> , Bordeaux, L. Gardan	Pt4
CFBP2301	<i>Pyracantha</i> sp., Annecy, L. Gardan	Pt1
CFBP2310	<i>C. horizontalis</i> , Bordeaux, L. Gardan	Pt4
CFBP2321	<i>Cotoneaster salicifolius</i> , Strasbourg, L. Gardan	Pt1
CFBP2322	<i>Pyracantha atalantioides</i> 'Gibbsii', Limoges, L. Gardan	Pt4
CFBP2324	<i>Crataegus</i> sp., Bordeaux, L. Gardan	Pt4
CFBP2543	<i>M. domestica</i> 'Lancep', Angers, 1992, C. Manceau	Pt4
CFBP3472	<i>M. domestica</i> , 'M26', Angers, 1992, C. Manceau	Pt4C
Germany		
Ea1/79 ^a	<i>Cotoneaster</i> sp., northern Germany, 1979, W. Zeller	Pt1
Ea237	Apple (<i>M. domestica</i>), Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea242	Pear (<i>P. communis</i>), Ostfildern, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea248	Pear, Neustetten, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea250	Apple, Sachsen-Anhalt, K. Richter	Pt1
Ea263	Apple, Ludwigsburg, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea268	Apple, Murrhardt, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea269	<i>Cotoneaster</i> sp., Murrhardt, 1996, Baden-Württemberg, E. Moltmann	Pt1
Ea282	Pear, Backnang, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea284	Pear, Reutlingen, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1

Table 2. (Continued)

Strain	Description of isolation (plant, place, year, provider; alternative designation)	PFGE type
Germany (cont.)		
Ea286	Pear, Bayern, K. Richter	Pt1
Ea291	Pear, Mössingen, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea298	Quince (<i>C. oblonga</i>), Calw, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea299	Pear, Calw, Baden-Württemberg, 1996, E. Moltmann	Pt1
Ea300i1	Apple, Ravensburg, Baden-Württemberg, 2000, E. Moltmann	Pt1
Ea300i2	Apple, Ravensburg, Baden-Württemberg, 2000, E. Moltmann	Pt1
Ea300i3	Apple, Ravensburg, Baden-Württemberg, 2000, E. Moltmann	Pt1
Ea300u1	Apple, Ravensburg, Baden-Württemberg, 2000, E. Moltmann	Pt1
Ea300u2	Apple, Ravensburg, Baden-Württemberg, 2000, E. Moltmann	Pt1
Ea300u3	Apple, Ravensburg, Baden-Württemberg, 2000, E. Moltmann	Pt1
Ea-FR3/98	Wood from <i>Cotoneaster</i> sp. (S. Bereswill), Freiburg, 1998	Pt1A
Italy		
01SFR-BO	<i>Sorbus</i> sp., district of Ravenna, 1991	Pt6
03SFR-BO	<i>Crataegus</i> sp., district of Ravenna, 1991	Pt6
05SFR-BO	<i>Pyracantha</i> sp., district of Bologna, 1994	Pt3
14SFR-BO	<i>Crataegus</i> sp., district of Bologna, 1996	Pt3
26SFR-BO	<i>Cotoneaster</i> sp., district of Ferrara, 1997	Pt3
30SFR-BO	<i>Cotoneaster</i> sp., district of Bologna, 1997	Pt3
39SFR-BO	Quince (<i>C. oblonga</i>), district of Bologna, 1998	Pt3
42SFR-BO	Apple (<i>M. Domestica</i>), district of Ferrara, 1997	Pt3
BZ20	<i>M. domestica</i> , district of Bolzano, 1999	Pt1
BZ33	<i>P. communis</i> , district of Bolzano, 1999	Pt1
BZ37	<i>Sorbus</i> sp., district of Bolzano, 1999	Pt3
Ea404VR	<i>P. communis</i> , district of Rovigo, 1998	Pt3
OMP-BO1129/97	<i>P. communis</i> , district of Mantova, 1997	Pt3
OMP-BO115097	<i>P. communis</i> , district of Regio Emilia, 1997	Pt3
OMP-BO1194/97	<i>P. communis</i> , district of Ferrara, 1997	Pt3
OMP-BO1610/97	<i>P. communis</i> , district of Ravenna, 1997	Pt3

Table 2. (Continued)

Strain	Description of isolation (plant, place, year, provider; alternative designation)	PFGE type
Italy (cont.)		
OMP-BO1792/97	<i>P. communis</i> , district of Modena, 1997	Pt3
OMP-BO787	<i>Crataegus</i> sp., district of Ravenna, 1/, 1992	Pt6
SFR-BO685/99	<i>Crataegus</i> sp., district of Piacenza, 1999	Pt3
SFR-BO776/99	<i>Crataegus</i> sp., district of Piacenza, 1999	Pt3
SFR-BO776R/99	<i>Crataegus</i> sp., district of Piacenza, 1999	Pt3
SFR-BO948/99	<i>Crataegus</i> sp., district of Ravenna, 1999	Pt3
SFR-BO984/99	<i>Crataegus</i> sp., district of Forli, 1999	Pt3
The Netherlands		
PD207	<i>Cotoneaster</i> sp., 1979	Pt1B
PD350	<i>P. communis</i> , 1981	Pt1
PD439	<i>C. salicifolius</i> 'Floccosus', 1982	Pt1s
PD576	<i>Crataegus</i> sp., 1985	Pt3s
PD3217	<i>Salix</i> sp., 1998, J. Janse	Pt3
Spain		
IVIA 1509-B	<i>M. domestica</i> , Guipuzcoa, 1995	Pt4
IVIA 1525-1	<i>Cotoneaster</i> sp., Guipuzcoa, 1996	Pt4
IVIA 1525-6	<i>Cotoneaster</i> sp., Guipuzcoa, 1996	Pt4
IVIA 1603	<i>Cotoneaster</i> sp., Segovia, 1996	Pt3
IVIA 1614-2	<i>Pyracantha</i> sp., Segovia, 1996	Pt3
IVIA 1626-6	<i>M. domestica</i> , Navarra, 1996	Pt4
IVIA 1731-1	<i>P. communis</i> , Guipuzcoa, 1997	Pt4
IVIA 1767-3	<i>M. domestica</i> , Navarra, 1998	Pt4
IVIA 1892-1	<i>P. communis</i> , Guadalajara, 1998	Pt3
IVIA 1898-11	<i>M. domestica</i> , Guadalajara, 1998	Pt3
IVIA 1898-18	<i>M. domestica</i> , Guadalajara, 1998	Pt3
IVIA 1898-4	<i>Cotoneaster</i> sp., Guadalajara, 1998	Pt3
IVIA 1899-21	<i>C. oblonga</i> , Guadalajara, 1998	Pt3

Table 2. (Continued)

Strain	Description of isolation (plant, place, year, provider; alternative designation)	PFGE type
Spain (cont.)		
IVIA 1909-3	<i>P. communis</i> , Lleida, 1998	Pt4
IVIA 1951-5	<i>Cotoneaster</i> sp., Huesca, 1998	Pt4
IVIA 1961-16	<i>P. communis</i> , Guipuzcoa, 1998	Pt4
IVIA 1961-5	<i>P. communis</i> , Guipuzcoa, 1998	Pt4
IVIA 1966-11	<i>Pyracantha</i> sp., Huesca, 1998	Pt4
UPN500	<i>P. communis</i> , Guipuzcoa, 1998	Pt4
UPN511	<i>M. domestica</i> , Guipuzcoa, 1998	Pt4
UPN525	<i>Pyracantha</i> sp., Navarra, 1997	Pt4
UPN526	<i>P. communis</i> , Navarra, 1997	Pt4
UPN527	<i>M. domestica</i> , Navarra, 1997	Pt4
UPN528	<i>M. domestica</i> , Navarra, 1997	Pt4
UPN530	<i>P. communis</i> , Navarra, 1997	Pt4
UPN537	<i>M. domestica</i> , Guipuzcoa, 1998	Pt4
UPN538	<i>Cotoneaster</i> sp., Guipuzcoa, 1998	Pt4
UPN540	<i>P. communis</i> , Navarra, 1998	Pt4
UPN545	<i>M. domestica</i> , Navarra, 1998	Pt4
Poland		
EaP394	<i>Crataegus</i> sp., Gdansk, P. Sobiczewski	Pt1
EaP630	<i>M. domestica</i> , Rogow, P. Sobiczewski	Pt1
EaP632	<i>P. communis</i> , Skierniewice, P. Sobiczewski	Pt1
EaP659	<i>M. domestica</i> , Torun, P. Sobiczewski	Pt1
Others		
115.22 ^a	<i>C. oblonga</i> , Bulgaria, 1989, S. Bobev	Pt5
Ea4/82 ^a	<i>P. communis</i> , Egypt, 1982, W. Zeller	Pt2
Ea153	USA, L. Pusey	Pt1

a. Strain analysed in previously described assays (Zhang & Geider, 1997; Zhang *et al.*, 1998).

3.3.3. Strains from Belgium and The Netherlands

Isolates of Pt3 were typical for the region north of Paris to Lille (northern France) at the Belgian border (Zhang *et al.*, 1998). Therefore, strains from Belgium were expected to carry the same pattern. Indeed, most of the Belgian strains belonged to Pt3 (Fig. 3, Table 2), although variants and Pt1 occurred. Strain PD3217 from The Netherlands, isolated from a necrotic *Salix* sp., which is not a host plant for fire blight, also showed pattern Pt3, typical for strains from northern France, Belgium and north-eastern Italy. Other strains from The Netherlands were ordered into Pt1 (Zhang & Geider, 1997), indicating a connection of Pt1 among strains from England, The Netherlands and central Europe.

3.3.4. Strains from Italy

Eighteen strains from north-eastern Italy were previously classified as Pt3 (Zhang *et al.*, 1998). This was confirmed for additional strains, from the north-eastern Italy and northern Italy (South Tyrol) (Fig. 2, lanes 10-13). Interestingly, three strains from the district of Ravenna, isolated in 1991 and 1992, had a unique pattern different from others in Italy and were classified as Pt6 (Fig. 1, panel B, lanes 3 and 4) and two strains from the Ravenna area, isolated in 1997 and 1999, had pattern Pt3. The origin of the novel pattern Pt6 is unknown, but it represents a fourth one in Italy, in addition to Pt3 in the north-east (Po River Valley). Pt1 was found once in the south-west (region of Caserta, Naples) (Zhang *et al.*, 1998), and recently in the district of Bolzano (Fig. 2, lanes 11 and 12). Pt2 in the south of Italy (Puglia region and Sicily) had been most probably introduced from the east of the Mediterranean region, where the pattern occurs from Egypt through Greece to Hungary (Zhang *et al.*, 1998). The simultaneous

detection of both Pt3 and Pt1 (Fig. 2) is the first report of invasion of two pattern types into a narrow area recently affected by fire blight.

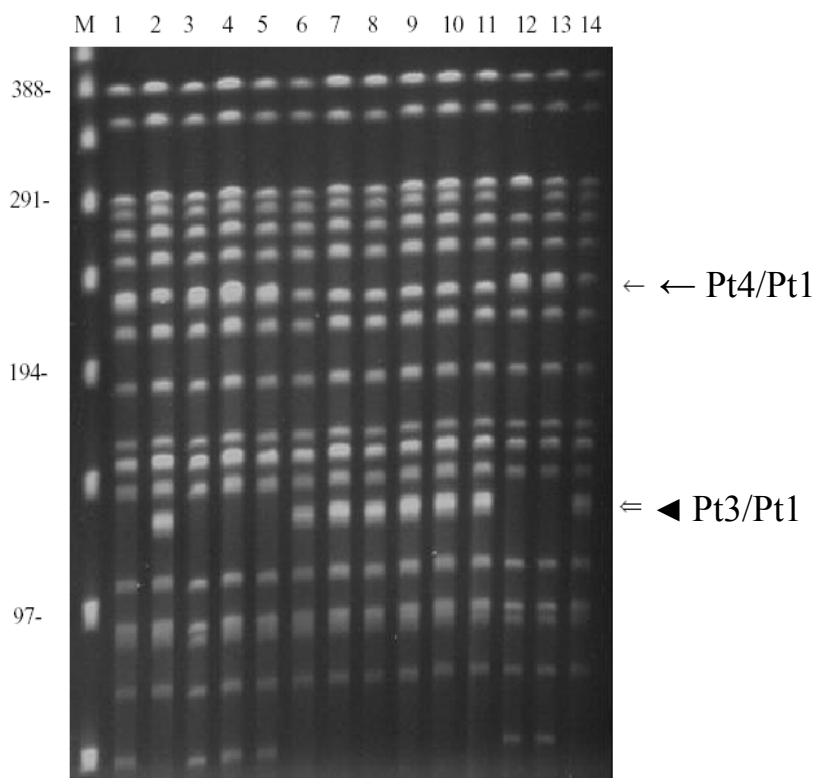


Fig. 3. *Xba*I patterns of *E. amylovora* strains from Spain (Sp) and Belgium (B) in PFGE assays using a long gel. Lane 1, CFBP1367 (France, Pt3); 2, Ea1/79 (Germany, Pt1); 3, 1892-1 (Sp, Pt3); 4, 1898-11 (Sp, Pt3); 5, 1899-21 (Sp, Pt3); 6, 1951-5 (Sp, Pt4); 7, 1966-11 (Sp, Pt4); 8, 1909-3 (Sp, Pt4); 9, 1961-5 (Sp, Pt4); 10, 1961-16 (Sp, Pt4); 11, 1767-3 (Sp, Pt4); 12, DGBBC350 (B, Pt3A); 13, DGBBC351 (B, Pt3); 14, S59/5 (*E. amylovora* type strain, Pt1), ←, position of band to distinguish Pt1 and Pt4; ◄, missing band in case of Pt3; M, DNA marker of multimeric λ genomes (sizes in kb at the left rim).

3.3.5. PFGE patterns of strains from Spain

All 21 strains from the areas of Guipuzcoa, Navarra, Lleida and Huesca showed the pattern Pt4 (Fig. 3). As the typical bands of Pt4 are close to Pt1, just visible by the slightly smaller distance of bands between the positions of the lambda multimers at 194/242 MDa (Fig. 1), we also analysed these strains in a long PFGE gel, in which they were unambiguously identified as Pt4 (Fig. 3). On the other hand, seven strains from two nurseries in Segovia and Guadalajara were found to belong to Pt3. This pattern type is identical with *E. amylovora* strains from northern France and Belgium.

3.3.6. Strains with small differences to pattern types Pt1 through to Pt4

Among 120 *E. amylovora* strains investigated in this study, 11 of them did not fit into the PFGE pattern of other strains found in the same region. These deviations, named Pt1 A, Pt1 B, Pt1 s, Pt3A, Pt3B, Pt3B, Pt3C, Pt3s, Pt4A, Pt4B, or Pt4C, affected one band at a lower or higher position than the corresponding band of the main pattern. In case of a Pt-s pattern, one or two 'low molecular weight' bands at 50 kb or less were found. A relation to plasmids cannot be excluded. These RFLPs were observed in countries with persistence of fire blight for a long time, such as Belgium, The Netherlands, France and also England and Germany. A change of a PFGE pattern is a rare event, which has not been observed under lab conditions. A selective advantage for strains with a changed pattern type seems to be unlikely, because its distribution should be found frequently. Single patterns might be a picture of natural changes in the genomes of a bacterial population, which could be more frequent in an area with long persistence of fire blight than in countries with recent outbreaks of the disease such as northern Italy or Spain. There, only *E. amylovora* strains with a typical PFGE pattern were isolated in the

affected regions. The time after the introduction of the disease was apparently too short for the establishment of new patterns.

3.4. Discussion

Many *E. amylovora* strains from Europe appear to be clonally related with few variations in their PFGE profiles, due to minor spontaneous mutations in their genome. The patterns are remarkably stable in large areas for strain isolations and did not change in the laboratory after 16 transfers on plates. The RFLPs were observed using *Xba*I digests, and affected mostly a single DNA fragment among a large number of common fragments (Zhang & Geider, 1997; Zhang *et al.*, 1998).

The first European country with reports of fire blight was Great Britain. The disease was confined to England and has not been observed in Scotland. It is possible that the strains could have provided a source for fire blight in other parts of Europe.

Differentiation of *E. amylovora* strains assayed by PFGE analysis of *Xba*I digests (Fig. 4) can explain several waves of the disease distribution into central Europe, eastern France (Pt1 pattern) and western France (Pt4 pattern); from western France to northern Spain (Pt4 pattern); from Belgium/northern France to north-eastern Italy (Pt3 pattern) and northern Spain; but also from Egypt to the eastern Mediterranean region and the Balkans (Pt2 pattern). The detection of Pt2 strains in southern Italy could be explained with the assumption that the disease was introduced from eastern areas of the Mediterranean basin. The Pt3 pattern shown by the strains isolated in the Po River Valley (north-eastern Italy) and central Spain, may support the hypothesis that the pathogen was introduced through imported, latently infected plant material. The results, obtained from analysis of many European strains, showed: (i) sharing of the pattern Pt3,

prevalent not only among strains isolated in the Po River Valley and in central Spain, but also for a majority of strains from Belgium and northern France; and (ii) the existence of the transient pattern type Pt6 for strains isolated in 1991 and 1992. After import of plant material from The Netherlands to a nursery in the district of Ravenna in summer 1991 (however, an official document with the real origin does not exist), infected plants were detected during inspections carried out by the Regional Phytosanitary Service and were promptly destroyed (Bazzi, 1992; Curto, 1992). Two later isolates with Pt3 could indicate an independent reintroduction of fire blight. Up-to-date, genomic analysis of several strains from The Netherlands and of many strains from other European countries did not show the Pt6 pattern. This stimulated further investigations on other *E. amylovora* strains of different origin isolated in the last 10 years. The differentiation of *E. amylovora* strains by PFGE typing provides a possibility to formulate hypotheses as to how fire blight spread into Italy and also into Spain. As Pt1 is the dominating pattern in central Europe, typical for eastern France to Poland and northern Germany to Switzerland and Austria, the border between Austria and Italy with a massive traffic on the roads across the Alps is a bottleneck for spread of fire blight into a new region. The concomitant occurrence of Pt1 and Pt3 in South Tyrol could thus indicate a spread of *E. amylovora* from Austria and from the Po River Valley by means of biotic (insects, birds) and/or abiotic vectors (aerosols). New cases of fire blight observed in some areas near Bolzano (South Tyrol) on *Pyrus* sp. during the year 2000 require further epidemiological studies. The pattern Pt3, which was prevalent in the bacterial populations in north-eastern Italy and in two nurseries of central Spain, could support the hypothesis of an introduction of the pathogen by means of latently infected (asymptomatic) propagation materials. Natural latent infections and/or

endophytic presence of *E. amylovora* have been demonstrated by several authors under different ecologies (Keil & van der Zwet, 1972; Calzolari *et al.*, 1982; McManus & Jones, 1994b; van der Zwet & Beer, 1995; Hickey & van der Zwet, 1999). In Spain, Pt3 was identified in all of the analysed necrotic fire blight host plants from two nurseries in Segovia and Guadalajara. They were located at distances of more than 400 km from other fire blight outbreaks, and all the strains isolated in 1996 and 1998 from different fire blight host plants were of Pt3. Trade with plants could have been responsible as the origin of these strains, because the nurseries had imported hawthorn (*Crataegus* sp.) from Belgium in previous years. In both nurseries, the first symptoms were observed on hawthorn. No other fire blight affected plants have been identified since the eradication of *E. amylovora* hosts in this area. Pt3 has not been identified from another Spanish outbreak until now, and the existence of Pt4 in other parts of Spain could point to independent introductions of fire blight. The appearance of Pt4 can be connected to strains persisting in plants across the border in southern France, from where the pathogen was possibly introduced by sequential dissemination.

We assume that in some Spanish and Italian areas with dry seasons or when the conditions are not favourable for fire blight, the period of latency of *E. amylovora* could be longer than expected, and it can take one or more years to develop symptoms. Nevertheless, the complexity of the international movements of plant materials in commerce is well known and, at light of these results, the answer needs prudence and further confirmation. The occurrence of Pt3 strains in northern Italy and central Spain can be explained by introduction with infected plants. However, all other European and Mediterranean patterns are restricted to defined regions. Despite barely controlled trade with plants and plant products across most European countries, the establishment of a

new major pattern within an existing fire blight area was not detected except in the Bolzano district. Pt1 in this area dominated by Pt3 may have been introduced from Austria, where only Pt1 has been found. The general way of pathogen dissemination is apparently the sequential spread from diseased sites into areas without fire blight.

The patterns of strains of Northern America are diverse (Zhang & Geider, 1997), although peculiar pattern types were recovered, when samples were taken from pear orchards in 1997 and 2000 (S. Jock & K. Geider, unpublished). All raspberry strains are endemic in North America and have been only isolated there. A reason for their heterogeneity in the PFGE patterns could be the unusual host, which required many genomic changes for adaptation of the pathogen. On the other hand, their presumably long persistence in North America could have allowed accumulation of many changes in the genome. They may therefore display a similar divergence as fruit tree strains from Eastern Canada, already observed for strains from the US (Zhang & Geider, 1997) and the PFGE pattern types of the Asian pear pathogens isolated in Korea (Kim *et al.*, 2001a) and Japan (Kim *et al.*, 2001b). The *Xba*I patterns from North American *E. amylovora* strains were often different from those of *E. amylovora* strains isolated in Europe and in the Mediterranean region. Consequently, the high conservation of pattern of the latter strains, together with strains from New Zealand, could result in the speculation that fire blight was not repeatedly disseminated from North America, otherwise highly divergent pattern types should also occur in the other fire blight countries. A few strains with the same pattern type could have escaped from North America first to New Zealand and later to countries of the Northern hemisphere.

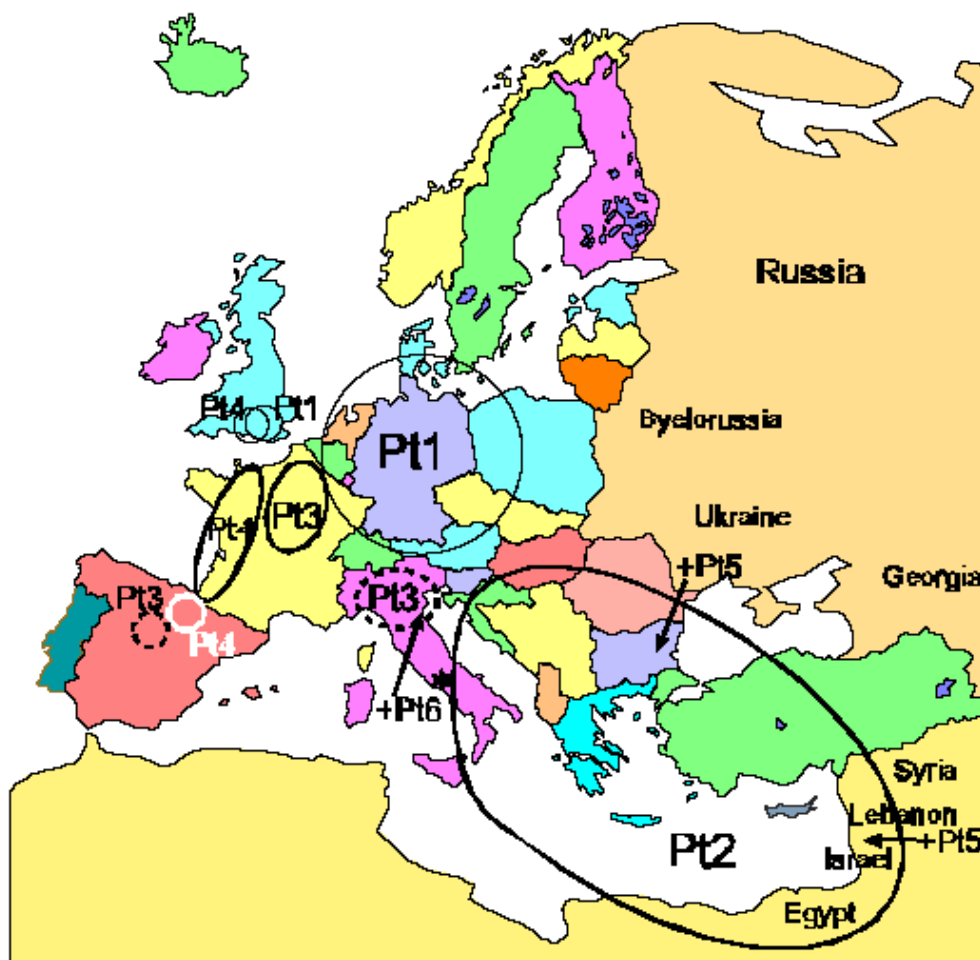


Fig. 4. Distribution of PFGE pattern types of *E. amylovora* strains isolated in Europe and the Mediterranean region. The revised map is based on the *Xba*I patterns of genomic DNA and includes also data from previous PFGE assays especially for strains from the eastern Mediterranean region (Zhang & Geider, 1997; Zhang *et al.*, 1998). *, single site of isolation of *E. amylovora* with central European pattern Pt1; Ellipse with white dashed line (northern Italy, central Spain), Pt3 without occurrence of this pattern in adjacent region; O, detection of Pt5 or Pt6 in an area with another PFGE type; the black dashed lines (- -) indicate the progressive spread of fire blight based on the pattern type and the time of first detection in the Mediterranean region and in Europe. The symbol • (England and Egypt) indicates the supposed start of further spread of fire blight into neighbouring countries, and the arrowheads indicate the direction or present end-point of sequential distribution.

3.5. Experimental procedures

3.5.1. Bacterial strains and PFGE analysis

Erwinia amylovora strains were isolated from diseased plants, derived from the sources listed in Table 2. Cultures were grown at 28°C in 10 ml of Luria-Bertani (LB) broth, to an optical density of 0.6 (A_{600}). Aliquots of 4 ml were centrifuged and washed three times with SEP buffer (0.3 M sucrose, 25mM EDTA, 25mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8.0). For lysis, the cells were embedded in 1% agarose and filled into plastic moulds. The blocks were incubated three days at 50°C in lysis buffer (0.5 mg ml⁻¹ of proteinase K, 1% lauryl-sarcosine, 0.25 mM EDTA pH 9.5, 10 mM glycine, 1 mM CaCl_2) and washed three times with PE buffer (10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ [pH 8.0], 1 mM EDTA). For the digest with restriction enzymes *Xba*I or *Spe*I, one quarter of the block (2 x 5 x 10 mm) was equilibrated in enzyme digestion buffer. The digestion was carried out overnight in 100 µl with 30 U enzyme, and the blocks were washed in PE. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed with the CHEF-DRIII apparatus (Bio-Rad) in a 1% agarose gel (Ultra Pure DNA Grade Agarose, Bio-Rad) with running buffer (3.5mM HEPES, 3.5mM sodium acetate, 0.35 mM EDTA [pH 8.3]) for 22h at 14°C and a linear ramping of 5 V cm⁻¹ for 1 to 25s. In case of long gels, the ramping time was 5 to 25 s for 18 h, and 1 to 25s for 19h.

3.6. Acknowledgements

We thank D. Stead and A. Aspin, York, UK; C. Calzolari and L. Lindner, Italy; M. Maes and T. Deckers, Belgium; D. Berra and M. A. Cambra, Spain; E. Moltmann and K. Richter, Germany; J. Murillo, Pamplona, Spain; and P. Sobiczewski, Skierniewice, Poland, as well as colleagues at INRA, Angers, France, for providing us with strains from their countries and E. Billing, Kent, UK, for sending infected plant material.

CAPÍTULO 4

Polyphasic analyses of Spanish strains of *Erwinia amylovora* from eight regions

Victoria Donat, Elena G. Biosca, Javier Peñalver and María M. López

Journal of Applied Microbiology, submitted

4. Polyphasic analyses of Spanish strains of *Erwinia amylovora* from eight regions

4.1. Summary

Aims: We have examined the intraspecies diversity of a collection of 63 Spanish strains of *Erwinia amylovora*, isolated from 1995 to 2001, in order to determine whether or not the strains could be grouped based on phenotypic or genotypic criteria and therefore investigate the sources of inoculum for fire blight dissemination in Spain.

Methods and Results: Several biochemical and molecular techniques, such as miniaturized API 20E, API 50CH, ATB G-5 and API-ZYM tests, BIOLOG metabolic fingerprinting, MSP-PCR, AFLP, RAPD analyses, PCR ribotyping and macrorestriction of genomic DNA followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were used. Results not only agree with the well known homogeneity of *E. amylovora*, but also have revealed MSP-PCR, AFLP, RAPD analyses and PFGE as the most suitable methods to discriminate among Spanish strains of this pathogen from different areas.

Conclusions: The obtained results support the hypothesis that some fire blight outbreaks have been due to the introduction in Spain of infected plant material or bacterial inoculum from other European countries coming from, at least, three different infection sources.

Significance and Impact of the Study: In spite of the minor differences found, PFGE, together with MSP-PCR, AFLP and RAPD analyses are, up to now, the only techniques that let us make hypothesis about the origin of the sources of infection and the relation among different outbreaks of fire blight in Spain.

4.2. Introduction

Fire blight is a plant disease caused by the bacterium *Erwinia amylovora* that produces serious losses in apple and pear orchards all over the world. This pathogen, formerly described in North America, has an increasing economic impact due to its spreading around Europe and the Mediterranean countries (van der Zwet, 2002). It is considered a quarantine bacterium in the European Union (EU) (Anonymous, 2000) and in most South American countries, among others. The disease was first identified in Spain in 1995 in Guipúzcoa (País Vasco), close to the French border (López *et al.*, 1999a). New outbreaks were detected in 1996 and 1997 in Guipuzcoa and Navarra (Northern Spain) (López *et al.*, 1999a). In 1996 and 1998, fire blight was found in two nurseries located in Segovia (Castilla-León, central Spain) and Guadalajara (Castilla-La Mancha, central Spain) and eradicated. No relation with the previous outbreaks was found and the plants infected came from a Belgian importation (López *et al.*, 1999a). In the following years, several small foci of the disease were also identified in Cataluña, Aragón and La Rioja. The affected hosts were pears, apples, loquats, quinces and the ornamental plants susceptible to fire blight (López *et al.*, 2002a). Eradication measures have been taken consisting of intensive surveys, analysis and destruction of diseased trees and, in most cases, the whole plot, following EU legislation. They have been effective since fire blight is not yet widespread in Spain, that is still considered a protected fire blight country in the European Union (López *et al.*, 2002a).

Despite the limited host range of *E. amylovora*, with no recognized pathovars (Momol & Aldwinckle, 2000), some host specialization led to the establishment of three major groups of strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis: '*Maloideae*' strains not pathogenic to *Rubus* (including most of *E. amylovora*

strains), '*Rubus*' strains only pathogenic to *Rubus*, and 'Hokkaido' strains pathogenic to pear and of limited pathogenicity towards apple (Momol *et al.*, 1997). Several phenotypic and molecular studies of the fire blight pathogen are consistent with this classification, as classical biochemical and antibiotic susceptibility tests (Billing *et al.*, 1961, Vantomme *et al.*, 1982, 1986), RFLP of the *hrp* gene (Laby & Beer, 1992), fatty acid analyses (van der Zwet & Wells, 1993), pEA29-PCR (Kim *et al.*, 1995), rep-PCR (McManus & Jones, 1995b), BIOLOG metabolic fingerprinting (Kim *et al.*, 1996), RAPD analysis (Momol *et al.*, 1997), ARDREA (Kim *et al.*, 1999; Momol *et al.*, 1999) or CAPS analysis (Kim *et al.*, 1999).

In spite of the high phenotypic and genotypic homogeneity of *E. amylovora*, several molecular fingerprinting techniques have proved to be useful to determine intraspecific diversity within strains from different geographical origins and/or hosts. Microsatellite-primed-PCR (MSP-PCR) revealed to be a suitable technique for strain differentiation of *E. amylovora*, with primers based on short sequence repeats (SSR) of the pEA29 plasmid (Schnabel & Jones, 1998; Kim & Geider, 1999; Ruppitsch *et al.*, 2004). When RAPD analyses were used to study diversity of the fire blight pathogen, homogeneous populations were found for *Maloideae* strains (Momol *et al.*, 1997; Manulis *et al.*, 1998) but, in a more recent study, some variability was observed (Brennan *et al.*, 2002). PCR-ribotyping was mainly applied to strains from North America and New Zealand (McManus & Jones, 1995b; Jeng *et al.*, 1999; McGhee *et al.*, 2002b) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of genomic DNA after *Xba*I restriction (Zhang & Geider, 1997; Jock *et al.*, 2002) was used to follow fire blight spread through Europe. By using PCR-ribotyping, three ribopatterns were found among tree fruit *E. amylovora* strains from different areas, which also were distinct from the

Rubus strains ribotype (McManus & Jones, 1995b; McGhee *et al.*, 2002b). PFGE had also revealed six restriction pattern length polymorphisms in *E. amylovora* strains from different areas (Zhang & Geider, 1997; Jock *et al.*, 2002). More recently, amplified fragment length polymorphism (AFLP) has been reported as the most discriminative technique for *E. amylovora* after analysing 22 strains from Europe (including seven Spanish strains), North America and New Zealand (Rico *et al.*, 2004). However, these authors did not find any relation between the intraspecific diversity observed among isolates and their host, place or year of isolation.

Even though the introduction of fire blight in Spain has been limited to localized foci, and the rapid eradication has been effective until now in preventing general spread, this disease is still a threat for our country. The characterization of strain diversity in *E. amylovora* is required for tracking long- or short-distance pathogen dispersal and for identifying possible sources of infection (Momol & Aldwinckle, 2000). Thus, information about intraspecific diversity of Spanish strains of *E. amylovora* will provide a better understanding of the introduction and dissemination of this pathogen, which may be useful for the control and eradication of the disease. However, very little is known about the diversity of Spanish strains of *E. amylovora*, with only two published studies based on a limited number of strains (Jock *et al.*, 2002; Rico *et al.*, 2004). In an attempt to assess the temporal and spatial intraspecific variability of strains of this bacterium, we have phenotypically and genetically analysed a collection of representative strains of several Spanish outbreaks of fire blight from 1995 to 2001, as well as reference strains of this species from Europe and North America.

4.3. Materials and methods

4.3.1. Bacterial strains and growth conditions

A collection of 63 *E. amylovora* strains from seven plant species and eight Spanish regions, isolated from 1995 to 2001, as well as 15 reference strains of this species from nine different countries were used (Table 1). Bacterial strains were routinely grown in King's B medium (King *et al.*, 1954) and incubated at 26°C for 48 h unless otherwise indicated. All strains were maintained at –80°C on 30% (v/v) glycerol.

4.3.2. Identification by DASi-ELISA, PCR and pathogenicity tests

All Spanish and reference strains were assayed in duplicate by DASi-ELISA and pEA29-PCR. A kit for DASi-ELISA from PlantPrint Diagnostics (Faura, Valencia, Spain) (Gorris *et al.*, 1996a,b) was used following the recommendations provided. The type strain of *E. amylovora* NCPPB 683 and the strain C58 of *Agrobacterium tumefaciens* were used as positive and negative control, respectively, and 20% of the strains were tested twice.

PCR was carried out using primers AJ75 and AJ76 that amplify a 844-bp fragment of the pEA29 plasmid of this bacterium according to McManus & Jones (1995a). A selection of strains were further identified following the nested-PCR procedure using a single closed tube developed in our laboratory (Llop *et al.*, 2000). Positive and negative controls were the same used for ELISA tests, and a 30% of the strains were tested, at least, twice.

All the strains were tested for pathogenicity in immature pear fruits (var. Williams, 3.5 cm diameter average) and immature apricot fruits (var. Tadeo, 4.5 cm diameter average) using two pieces of each fruit per bacterial strain. A selection of strains was also tested for pathogenicity in immature loquat fruits (var. Argelino, 2.5 cm

diameter average), using five fruits per bacterial strain. All fruits were washed once with a solution of 50% sodium hypochlorite (v/v) and twice with sterile water for 5 min. and then inoculated by making a transverse cut with a disinfected scalpel and adding 10 μ l of bacterial suspension (10^9 cfu ml⁻¹, OD_{600 nm}~1.0) in sterile phosphate buffered saline (PBS) 10 mM, pH 7.2. Pears, apricots and loquats inoculated with the type strain of *E. amylovora* or with PBS were used as positive and negative controls, respectively. Fruits were incubated in humidity chamber at 25°C for a week and symptoms development was followed and recorded daily. All inoculations were done twice.

4.3.3. API 20E, API 50CH, ATB G-5 and API-ZYM

API 20E tests (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) were applied to all *E. amylovora* strains according to the manufacturer's instructions, but the incubation temperature was 26°C and the results were registered after 48 h. For the API 50CH tests (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) the manufacturer's recommendations were also followed except for the basal medium that was replaced by a modification of the Ayers medium (Ayers *et al.*, 1919), as described by Biosca *et al.* (2003). The galleries were incubated at 26°C and acid production was noted after 72 h and aesculin hydrolysis after 5-6 days. Aesculin hydrolysis was also tested for 15 strains in liquid medium of Cassagne (1966) and results were evaluated at 3, 6, 9, 15 and 21 days.

In vitro susceptibility for 19 antibiotics was investigated with the commercial ATB G-5 test for Gram-negative rods (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) as described by the manufacturer. The results for the highest concentrations assayed were recorded after 24 h of incubation at 26°C and confirmed after 48 h. The assays were repeated at least with 25% of the strains.

The general enzymatic activities of 15 selected Spanish and reference strains of *E. amylovora* were studied by using the API ZYM system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) according to the manufacturer's instructions, but incubations were made at 26°C and readings were performed after 4 h.

4.3.4. BIOLOG metabolic fingerprinting

Six *E. amylovora* strains from different sources and origins were further analysed by using the BIOLOG-Microlog System, version 4.0 (Biolog, Inc.) to look for metabolic differences among *E. amylovora* strains. According to the manufacturer, they were grown on plates of BIOLOG Universal Growth medium (BUG) during 24 h at 26°C and bacterial suspensions prepared in Inoculating Fluid GN/GP were adjusted to a transmittance of 63% at 600 nm. Then, the GN2 microplates were inoculated using the type strain of *E. amylovora*, NCPPB 683, as a positive control. After 24 h of incubation at 26°C, readings were done using the BIOLOG reader and the profiles processed by the software Microlog 3. The strains were assayed three times.

4.3.5. MSP-PCR, AFLP and RAPD analyses

A DNA extraction was performed to 30 selected strains of *E. amylovora* from the collection used in this study. MSP-PCR technique was applied using primer M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT). AFLP was performed using *EcoRI/MseI* enzymes, and E00/M01-g pair of primers (Eco00, 5' GACTGCGTACCAATTC, Mse01-g, 5' GATGAGTCCTGAGTAAG). The RAPD technique, using two different primers (1281, 5' AACGCGCAAC, 1290, 5' GTGGATGCGA) was tested in seven selected *E. amylovora* strains. These analyses were carried out by Biopremier, Ltd. (Universidade da Lisboa, Portugal) and cluster analyses was performed following UPGMA method with Dice coefficient.

4.3.6. PCR-ribotyping

Whole cell-PCR of spacer region between the 16SrRNA and 23SrRNA genes of all *E. amylovora* strains was performed with primers and conditions previously described by McManus & Jones (1995b), using 10^8 cfu ml⁻¹ *E. amylovora* suspensions heated at 100°C for 10 min. Strain Ea 266 and sterile distilled water were used as positive and negative control, respectively. A 30% of the strains were tested twice.

4.3.7. Macrorestriction of genomic DNA and PFGE

The 78 Spanish and reference strains of *E. amylovora* were analysed according to the procedure described by Zhang & Geider (1997). Concisely, after extraction and macrorestriction of genomic DNA of *E. amylovora* with *Xba*I, the fragments obtained were separated by PFGE with a CHEF-DR III apparatus (Bio-Rad). The weight molecular marker was λ -ladder (PFGE marker I, Bio-Rad). All studied strains were assayed twice, from two different DNA extractions.

4.4. Results

4.4.1. Identification by DASI-ELISA, PCR and pathogenicity tests

The 78 Spanish and reference strains studied were identified as *E. amylovora* by DASI-ELISA and yielded a high positive serological reaction, ranging between 0.8 and 5.4 OD_{405 nm} and with 100% reproducibility. The 844-bp was amplified using the primers AJ75 and AJ76 (McManus & Jones, 1995a) with all *E. amylovora* strains investigated, showing 100% reproducibility. Positive results were also obtained for a selection of strains assayed with the nested-PCR procedure (Llop *et al.*, 2000).

Assays for pathogenicity on immature pears, apricots and loquats gave positive results with all *E. amylovora* Spanish and reference strains tested except for strain

NCPPB 311, which did not produce symptoms after a week in any fruit, and NCPPB 595, which only was capable to produce weak necrosis without ooze in immature apricots.

4.4.2. API 20E, API 50CH, ATB G-5 and API-ZYM

Reactions were considered positive when 80-100% of the strains gave a positive result, variable when 21-79% of the strains developed the reaction, and negative when 20% of the strains, or less, were positive for the test considered (either for API 20E or API 50CH system).

API 20E tests. After 48 h of incubation at 26°C, all strains of *E. amylovora* were positive for acetoin production and acid production from glucose and sucrose, being negative for arginine dihydrolase, lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase activities, citrate utilization, H₂S production, urease, tryptophan deaminase, indole production, gelatin hydrolysis and acid production from inositol, rhamnose, melibiose and amygdalin. Some variability was found in β -galactosidase (being positive for 41 % of the strains) and in acid production from mannitol, sorbitol and arabinose (with 70% of the strains being positive for these three carbon sources). When 30% of the strains were tested twice, the reproducibility ranged between 80 and 100%.

API 50CH tests. Carbohydrate metabolism of Spanish strains of *E. amylovora* showed utilisation of L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, N-acetylglucosamine, sucrose and trehalose. For some strains, aesculin hydrolysis was delayed to 5-6 days, but results from API50CH were no longer recorded after this period. Thus, to assess if the aesculin hydrolysis was slower for *E. amylovora*, this reaction was assayed by a conventional method for a selection of 15 strains, obtaining positive results for 80% of the strains tested during the experimentation time (21 days). Seven of the strains

assayed showed aesculin hydrolysis after 6 days, four of them within 12-15 days, and for one strain the development of this reaction was delayed up to 21 days. In API 50CH, variable results were observed among strains in D-xylose, D-galactose, D-mannitol, sorbitol, melibiose and β - gentiobiose, and all the other tests were negative. The same results were obtained for all reference strains except for the strain NCPPB 595, from *Pyrus* from the United Kingdom, which did not grow in the Ayers basal medium, even after being supplemented with 2 ppm nicotinic acid. The highest reproducible tests were sucrose, trehalose, D-glucose, D-fructose and N-acetyl-glucosamine, showing reproducibilities of 100% for the first two and 96% for the other three, whereas β -gentiobiose was only 64%, and both mannitol and sorbitol 68%. For other tests (L-arabinose, galactose, ribose, melibiose, D-xylose and D-mannose) it ranged between 72% and 88%.

ATB G-5. All *E. amylovora* strains studied were sensitive to piperacillin, piperacillin/tazobactam, ticarcillin, cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, aztreonam, imipenem, ceftazidime, cotrimoxazol, tobramycin, amikacin, gentamicin, netilmicin, pefloxacin and ciprofloxacin at the concentrations assayed. All Spanish and reference strains were sensitive to amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid at the highest concentrations present in the ATB G-5 strips, except one strain from Segovia that exhibited resistance against amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid. All of them, except two reference strains, were resistant to cephalotin at the concentration assayed (Table 1). The reproducibility varied between 84% and 100%.

API-ZYM. The results of the enzyme profile analysis of a selection of 11 Spanish and 4 reference strains using API ZYM galleries have shown similar hydrolytic patterns, with six of the 19 activities evaluated being present in all tested strains: alkaline phosphatase,

estearase, estearase lipase, leucin-arylamidase, acid phosphatase and naphtol-A-S-BI-phospho-hydrolase. A weak α -glucosidase activity was detected in five of the Spanish strains and one of reference strains. No activity was observed for valine-arylamidase, cysteine-arylamidase, alkaline phosphatase, tripsinase, α -chemotripsinase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase or α -fucosidase.

4.4.3. BIOLOG metabolic fingerprinting

The six strains of *E. amylovora* selected were identified as members of this species, with 100% probability in all cases. The examined strains utilized in all cases the following carbon sources: N-acetyl-D-glucosamine, D-fructose, D-galactose, α -D-glucose, D-mannitol, β -methyl-D-glucoside, D-psicose, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, mono-methylsuccinate, gluconic, succinic, bromosuccinic and L-glutamic acids, glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate. Variable results were observed in the first experiment for inosine, uridine, gentiobiose, lactic acid, inositol, aspartic acid, glycerol and methylpyruvate. The remaining carbon sources were not utilised. To confirm the variability indicated, the assays were repeated twice more in different experiments. Unfortunately, such variability was not reproducible, although all the strains were accurately identified as *E. amylovora*.

4.4.4. MSP-PCR, AFLP and RAPD analyses

In MSP-PCR and AFLP, 29 out of 30 strains clustered in a very homogeneous group (identical fingerprints) by means of UPGMA method, using Dice coefficient, except for the strain IVIA 1525-1, whose fingerprint proved to be slightly different (Figure 1). The RAPD technique confirmed the high similarity among the profiles obtained with both

primers used. Moreover, primer 1281 originated the same results as those obtained by the other two methods, letting us distinguish strain 1525-1 (Figure 1).

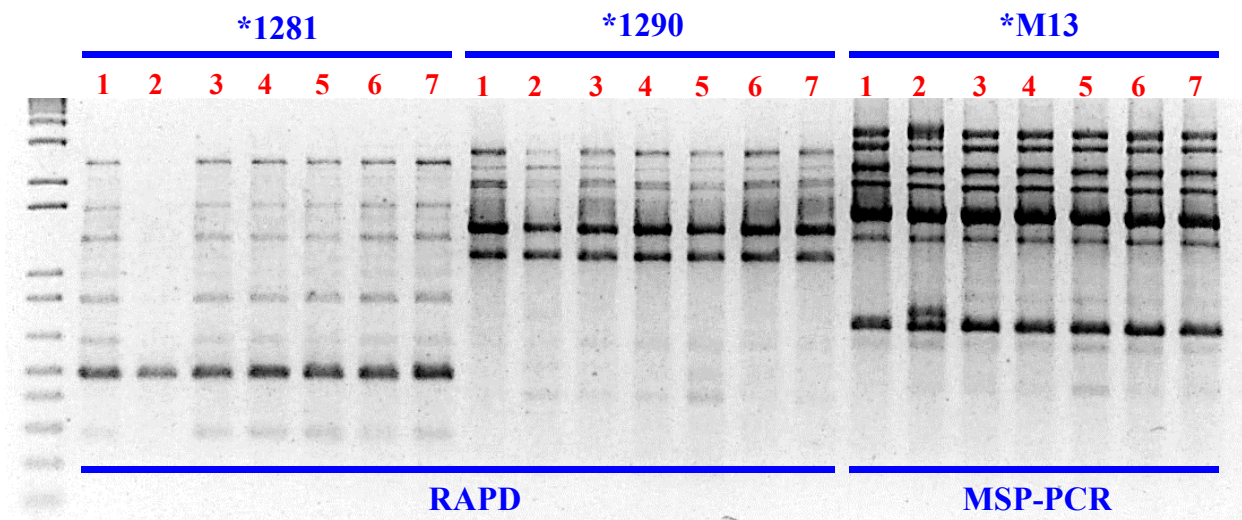


Figure 1. DNA banding pattern based on RAPD and MSP-PCR fingerprints obtained with different primers. *Primers used: 1281, 1290, M13, 1: IVIA 1509B, 2: IVIA 1525-1, 3: UPN 537, 4: UPN 546, 5: EPS100, 6: IVIA 2303-1, 7: NCPPB 3159.

4.4.5. PCR-ribotyping. The amplification with the primers based on the spacer regions between the 16S and 23S ribosomal genes produced several bands, being the major products sized between 700 and 1100 bp. In this range, all strains of *E. amylovora* showed five bands corresponding to a unique profile that fitted into PCR-ribotype 1 (Figure 2), previously described by McManus & Jones (1995b), which was confirmed when repeated.

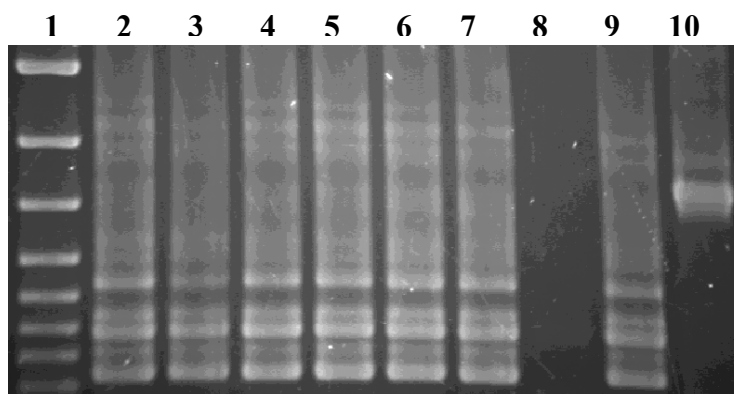


Figure 2. Banding pattern of PCR-ribotyping of spacer region between the 16SrRNA and 23SrRNA genes of *E. amylovora* obtained with primers previously described (McManus & Jones, 1995b). Lane 1: Molecular weight marker Generuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas), the upper and lower bands are sized 3000 and 700 bp, respectively. Lanes 2 to 7: Spanish strains IVIA 1731-1 from Guipuzcoa (País Vasco), IVIA 1767-3 from Navarra, IVIA 1739-1 from Lleida (Cataluña), IVIA 1777-1 from Álava (País Vasco), IVIA 1892-1 from Guadalajara (Castilla-La Mancha) and IVIA 1951-8 from Huesca (Aragón). Lanes 8 to 10: Controls with sterile distilled water, reference strain Ea266 from Canada and strain C58 of *Agrobacterium tumefaciens*, respectively.

4.4.6. PFGE analyses

The genomic DNA of the 63 Spanish strains after *Xba*I digestion and PFGE analysis has shown only two distinct patterns: Pt3 and Pt4 (Table 1, Figure 3). They can be distinguished by a single band of 130 kb, which is present in pattern Pt4 and absent in pattern Pt3 (Figure 3). Among Spanish strains, Pt4 has been found in 83% of the Spanish strains studied from País Vasco, Navarra, Cataluña, Aragón and La Rioja, irrespective of their host or year of isolation (Table 1). Pt3 has been detected only in 17% of the Spanish strains studied that were isolated in Segovia (Castilla-León), Guadalajara (Castilla-La Mancha) and Madrid, although in different hosts or years (Table 1). A relation was found between strains showing Pt3 profile and their

geographical origin (Table 1), since all of them were isolated from imported plant material from Belgium. The patterns obtained were reproducible in all cases.

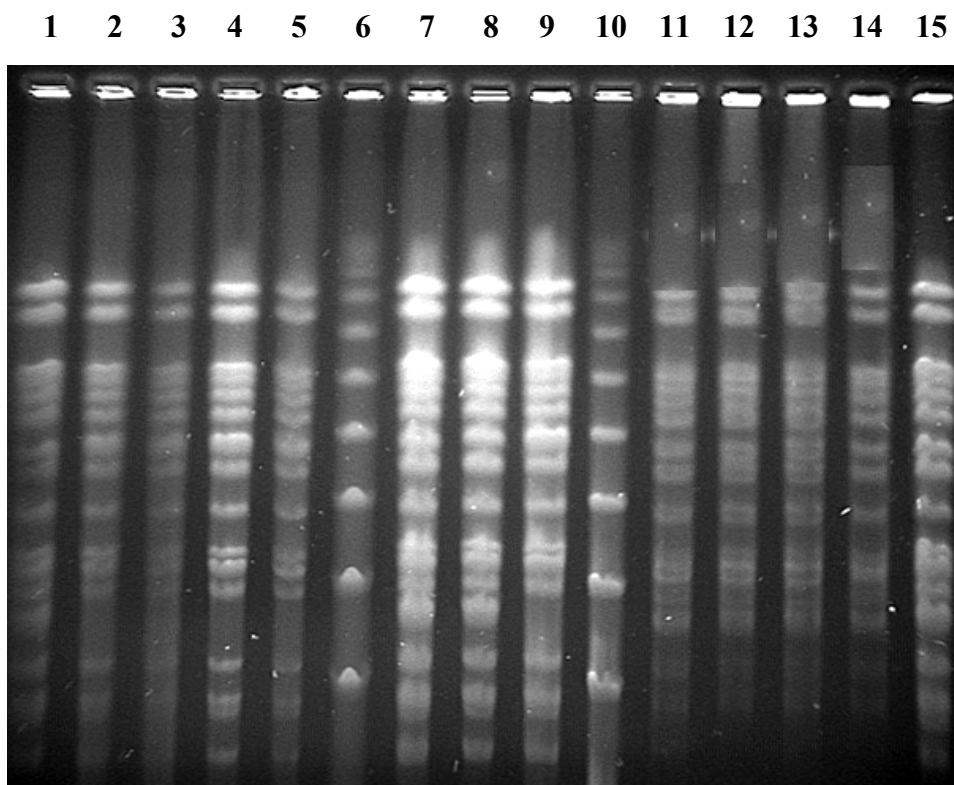


Figure 3. Macrorestriction patterns of genomic DNA of *E. amylovora* obtained by digestion with *Xba*I followed by pulsed-field gel electrophoresis. Spanish strains showing Pt4, lanes 1 and 11 to 15: IVIA 1626 from Navarra, IVIA 1924-4, IVIA 1951-8, IVIA 1951-6, IVIA 1951-2 from Huesca (Aragón) and IVIA 1739-1 from Lleida (Cataluña). Spanish strains showing Pt3, lanes 2 to 5: IVIA 1898-4, IVIA 1898-18, IVIA 1892-1 and IVIA 1899-19 from Guadalajara (Castilla-La Mancha). Reference strains, lanes 7 to 9: IVIA 1509-B from Guipuzcoa (Pais Vasco), Pt4, used as Spanish reference strain, NCPPB 595 from United Kingdom, Pt1, CFBP 1430 from France, Pt3A. Lanes 6 and 10: molecular weight marker (λ -ladder PFGE marker I, Bio-Rad), concatemers range from 97 (2-mer) to 456.5 (9-mer) bp. For *E. amylovora* lanes, 130 kb band is absent in Pt3 and absent in Pt4, migrating below 145.5 bp band (3-mer) of marker.

Table 1. Year of isolation, origin, host, antibiotic susceptibility profile and pulsed-field gel electrophoresis pattern of the *E. amylovora* strains studied.

Spanish strains*	Year	Origin†	Host	ATB G-5‡	PFGE§
IVIA 1509-B §	1995	Guipúzcoa	(PV) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1525-1 §	1996	Guipúzcoa	(PV) <i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1525-6 §	1996	Guipúzcoa	(PV) <i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1731-1 §	1997	Guipúzcoa	(PV) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 500 §	1998	Guipúzcoa	(PV) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 538 §	1998	Guipúzcoa	(PV) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1961-5 §	1998	Guipúzcoa	(PV) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1961-16 §	1998	Guipúzcoa	(PV) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 511 §	1998	Guipúzcoa	(PV) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 537 §	1998	Guipúzcoa	(PV) <i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2349-2	1999	Bizkaia	(PV) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2072-1	1999	Bizkaia	(PV) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1777-1	1997	Álava	(PV) <i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2112-1	1999	Álava	(PV) <i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2341	2000	Álava	(PV) <i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1626	1996	Navarra	(N) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 526 §	1997	Navarra	(N) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1626-6 §	1997	Navarra	(N) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 530 §	1997	Navarra	(N) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 527 §	1997	Navarra	(N) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 528 §	1997	Navarra	(N) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1767-3 §	1997	Navarra	(N) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 525 §	1997	Navarra	(N) <i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 529	1997	Navarra	(N) <i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 540 §	1998	Navarra	(N) <i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 545 §	1998	Navarra	(N) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 547	1998	Navarra	(N) <i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 564	1998	Navarra	(N) <i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt4
UPN 546	1998	Navarra	(N) <i>Cydonia sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2500	2001	Navarra	(N) <i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1554 (198-4-2)	1996	Segovia	(CL) <i>Crataegus sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1554 (198-11)	1996	Segovia	(CL) <i>Crataegus sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1578-3	1996	Segovia	(CL) <i>Crataegus sp.</i>	R R R	Pt3
IVIA 1603 §	1996	Segovia	(CL) <i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1985	1998	Madrid	(M) <i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1892-1 §	1998	Guadalajara (CM)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1899-19	1998	Guadalajara (CM)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1898-11 §	1998	Guadalajara (CM)	<i>Malus sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1898-18 §	1998	Guadalajara (CM)	<i>Malus sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1898-4 §	1998	Guadalajara (CM)	<i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 1899-21 §	1998	Guadalajara (CM)	<i>Cydonia sp.</i>	R S S	Pt3
IVIA 2397-5.4	2000	Guadalajara (CM)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt3

Table 1. (Continued)

Spanish strains *	Year	Origin†		Host	ATB G-5‡	PFGE§
IVIA 1739-1	1997	Lleida	(C)	<i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
EPS 100	1997	Lleida	(C)	<i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1909-3 §	1998	Lleida	(C)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2070-1	1999	Lleida	(C)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
EPS 101	1999	Lleida	(C)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
SPV 4576	1999	Lleida	(C)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1924-4	1998	Huesca	(A)	<i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1951-2	1998	Huesca	(A)	<i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1951-8	1998	Huesca	(A)	<i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1951-5 §	1998	Huesca	(A)	<i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 1951-6	1998	Huesca	(A)	<i>Sorbus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2134-1	1999	Huesca	(A)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2092	1999	Huesca	(A)	<i>Pyracantha sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2278-1	2000	Zaragoza	(A)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2303-3	2000	Zaragoza	(A)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2303-6	2000	Zaragoza	(A)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2303-1	2000	Zaragoza	(A)	<i>Malus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2501	2001	Zaragoza	(A)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2311-6	2000	La Rioja	(R)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2311-19	2000	La Rioja	(R)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
IVIA 2311-8	2000	La Rioja	(R)	<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt4
Reference strains*						
CFBP 1430 §		France		<i>Crataegus sp.</i>	R S S	Pt3A
PV 1887		France		<i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt4
PV 1778		France		<i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt3
PV 1775		France		<i>Cotoneaster sp.</i>	R S S	Pt4
NCPPB 595 §		U.Kingdom		<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt1
NCPPB 683 §		U.Kingdom		<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt1
Ea 3042 §		U.Kingdom		<i>Pyrus sp.</i>	R S S	Pt1
Ea 115		Germany		<i>Malus sp.</i>	S S S	nd
NCPPB 3159		The Netherlands		<i>Malus sp.</i>	R S S	nd
OMP-BO 1185		Italy		<i>Malus sp.</i>	R S S	Pt3
Ea FG2		Bulgary		<i>Pyrus sp.</i>	R S S	nd
NCPPB 3548		Turkey		<i>Eriobotrya sp.</i>	R S S	nd
NCPPB 311		Canada		<i>Pyrus sp.</i>	S S S	nd
Ea 266 §		Canada		<i>Malus sp.</i>	R S S	Pt1
Ea 273 §		USA		<i>Malus sp.</i>	R S S	nd

* IVIA, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia, Spain; UPN, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Navarra, Spain; EPS, Universitat de Girona, Girona, Spain; SPV, Servei de Protecció dels Vegetals, Barcelona, Spain; CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; PV, Protection des Végétaux, Angers, France; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, U.K.; Ea 115 and Ea FG2: strains kindly supplied by J.-P. Paulin, Centre INRA d'Angers, France; Ea 266, Ea 273: strains kindly supplied by E. Montesinos, Universitat de Girona, Spain; OMP-BO, Osservatorio delle Malattie delle Piante, Bologna, Italy.

† Province and (region), PV: País Vasco, N: Navarra, CL: Castilla-León, M: Madrid; CM: Castilla-La Mancha, C: Cataluña, A: Aragón, R: La Rioja.

‡ S, R: Susceptibility or resistance, respectively, to the following antibiotics at the highest concentrations present in the ATB G-5 strip: 8 mg l⁻¹ cephalotin, 16 mg l⁻¹ amoxicillin and 16/8 mg l⁻¹ amoxicillin/clavulanic acid.

§ All strains were classified according to the scheme from Bazzi *et al.* (1999); nd: pattern not determined. Strains indicated were analysed in previous assays (Zhang & Geider, 1997; Jock *et al.*, 2002).

4.5. Discussion

DASI-ELISA, pEA29-PCR, nested-PCR in a single closed tube and pathogenicity tests confirmed the identity of the 63 Spanish strains as *E. amylovora*. Moreover, the 15 reference strains assayed also gave positive reactions. Thus, as previously reported (Donat *et al.*, in press), either of these techniques can be used for definitive identification of new isolates of the fire blight pathogen. The inoculation of immature apricot and loquat fruits demonstrated the usefulness of these fruits for pathogenicity assays, as previously reported in apricot (Bobev *et al.*, 1999).

The results obtained from the API 20E system have been quite homogeneous, being in agreement with our previous work on characterization of a large collection of Spanish strains of *E. amylovora* (Donat *et al.*, in press) and showing that API 20E system can be used for the identification of this bacterium.

We used the API 50CH system to study the carbohydrate metabolism of Spanish strains of *E. amylovora* and the tests with a positive or a negative result agree with those reported for this bacterium by Verdonck *et al.* (1987). Only slight differences for the variable tests, which are, in our study, D-xylose, D-galactose, D-mannitol, sorbitol, melibiose and β - gentiobiose were observed. They may be due to the basal media used, since we changed the standard one by a modification of the Ayers basal medium, which consists in a higher concentration of the bromothymol blue. This has been recently reported to give more reliable results when applied to *Brenneria* (*Erwinia*) *quercina* (Biosca *et al.*, 2003). We observed that strains of *E. amylovora* are able to hydrolyze aesculin, unlike previous reports (Paulin & Samson, 1973; Verdonck *et al.*, 1987), but in agreement with the more recent results of Rijckaert (1994), cited in Hauben *et al.* (1998). Nevertheless, this reaction was delayed from 5 to, at least, 21 days

and can not be detected within the experimentation time usual for API 50CH (in our case, 72 h). Similar API 50CH profiles were obtained for the reference strains. The reproducibility of API 50CH system was high and similar to that previously obtained for *E. amylovora* by Mergaert *et al.* (1984) and Verdonck *et al.* (1987).

The antibiotic susceptibility tests revealed one dominant profile for the Spanish and reference strains (Table 1), which corresponded to resistance to 8 mg l⁻¹ cephalotin and sensitivity to the remaining antibiotics tested at the highest concentrations assayed. These results are not surprising, since the antibiotics assayed are for clinical use. However, the resistance observed against amoxicillin and amoxicillin/clavulanic acid in one strain from Segovia may suggest natural horizontal transfer of plasmids conferring resistance to β -lactamic antibiotics from other plant associated bacteria. In fact, a recent study has reported the resistance to them in *Erwinia persicina*, a plant-associated and plant pathogenic species, closely related to *E. amylovora* (Vimont *et al.*, 2002). A transfer of resistance has been reported for streptomycin, the main antibiotic used in fire blight control: there is molecular evidence of the transfer of pEA34 from *Pantoea agglomerans* into *E. amylovora* (Chiou & Jones, 1993). Furtherly, the tandem of genes *strA-strB* for streptomycin resistance, first identified in the fire blight pathogen (Chiou & Jones, 1993), have been found in multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* (Pezzella *et al.*, 2004).

A selection of Spanish and reference strains analysed using the API-ZYM system has shown a moderate hydrolytic activity, being all able to produce phosphatases, estearases, proteases and phosphohydrolases. Due to the similarity of the enzymatic patterns observed, this system may be useful for presumptive identification of the fire blight pathogen.

No relation was found among the results of the API 20E, API 50CH, ATB G-5 and API ZYM and either host, geographical origin or year of isolation, which indicates the limited value of these galleries for strain discrimination within this species.

Our results agree with previous studies showing the usefulness of Biolog system for an accurate identification at species level of the fire blight pathogen (Kim *et al.*, 1996). According to Kim *et al.* (1996), *E. amylovora* strains were able to oxidize 17 carbon sources, although these authors reported additionally the utilization of L-arabinose, *meso*-inositol, D-gluconic acid, L-alanine, glycyl-L-glutamic acid and glycerol. Among these carbon sources, we have observed that *meso*-inositol and glycerol gave variable results in BIOLOG assays. Unfortunately, in our work, the initial differences observed among strains were not reproducible after several repetitions, exactly in the same conditions. Thus, although we have used a reduced number of strains, our results clearly show the limited value of BIOLOG for intraspecific discrimination of *E. amylovora*.

Regarding MSP-PCR, AFLP and RAPD analyses, all the strains, except IVIA 1525-1 from Guipuzcoa, appeared to belong to the same population, seeming to be clonally related. The different pattern exhibited by strain IVIA 1525-1 suggests two different introductions of fire blight in Guipuzcoa, in spite of showing the same PFGE pattern as the other strains of *E. amylovora* isolated in this region (Pt4) (Jock *et al.*, 2002). Strain IVIA 1525-1 was isolated from an old *Cotoneaster* plant from a public garden in the city of San Sebastián. Due to its location, we do not have any information about the dissemination of this strain in the surrounding areas. However, a recent study (Rico *et al.*, 2004) by using AFLP in a collection of 22 strains found that this technique could differentiate individual strains, but cluster analysis of the obtained profiles only

yields two major groups, with Spanish, European and American strains appearing in both of them, regardless of their PFGE pattern, host, year or region of isolation. These authors suggested either multiple introductions of *E. amylovora* both into Europe or Spain, or few introductions with multiple strains. Since they only tested a reduced number of strains (with only seven strains from Spain) the potential of AFLP for epidemiological studies of Spanish strains of this species remains to be confirmed with a larger number of isolates. Nevertheless, these seemingly contrasting results are both valid, as they deal with different regions of the *E. amylovora* genome. When RAPD analyses was applied to a collection of Irish isolates of *E. amylovora* (Brennan *et al.*, 2002), homogeneous profiles were found for 68% of the strains tested, whereas the remaining isolates exhibited a variability that could not be correlated to their origin, host or year of isolation.

Previous studies within '*Maloideae*' strains have detected some differences by PCR-ribotyping (McManus & Jones, 1995b) among tree-fruit strains from different geographical origins. They found four distinct PCR-ribotypes, types 1 to 3 belonged to strains isolated from fruit trees in Eastern North America, Western United States and New Zealand, and type 4 was characteristic of strains from *Rubus*. In our study, the PCR-ribotyping analyses of 78 Spanish and reference *E. amylovora* strains displayed only PCR-ribotype 1, regardless of the source, geographical origin, year of isolation or PFGE pattern. This is the dominant profile among New Zealand and Eastern North America strains (100% and 97%, respectively). Since no other reports are available about the use of this technique for analysing strains from other European countries, the usefulness of this method for typing *E. amylovora* strains is still unclear. However, it is not surprising to find this homogeneity among PCR-ribotypes of Spanish and European

E. amylovora strains compared to North American strains, taking account of the long time establishment of fire blight in North America, whereas the disease has just recently been detected in Spain. Such different evolution of fire blight in both continents is also supported by recent results of molecular differentiation of North American *E. amylovora* strains by means of PFGE, whose patterns showed to be quite divergent compared to that of the European strains (Jock & Geider, 2004).

In previous studies, two patterns were obtained by PFGE analysis after *Xba*I macrorestriction of genomic DNA of *E. amylovora* strains (Jock *et al.*, 2002). Results of the present work, including a greater number of Spanish strains, confirmed the differences in the RFLPs previously observed within Spanish strains, because only Pt3 and Pt4 patterns were also observed for the 63 strains analysed. The majority of Spanish strains of *E. amylovora* (83%) which were isolated from different hosts from País Vasco, Navarra, Cataluña, Aragón and La Rioja (Northeastern Spain) exhibited Pt4 pattern (Table 1, Figure 3), already described in the West of France and the South of the United Kingdom (Bazzi *et al.*, 1999; Jock *et al.*, 2002). Pt4 Spanish strains, recovered from Northeastern Spain, shared the same profile than those from the Southwestern France. This, together with the geographical proximity between both countries, supports the hypothesis that the pathogen was introduced by either natural dissemination and/or through plant material. Besides that, only strains from two nurseries located in Central Spain (isolated from Segovia, Guadalajara and Madrid), exhibited the Pt3 pattern (Table 1, Figure 3), previously described in Northeastern Italy, Northern France, Belgium and the Netherlands (Zhang *et al.*, 1998; Bazzi *et al.*, 1999; Jock *et al.*, 2002). Interestingly, the analyses of twelve new strains from Segovia and Guadalajara, that had imported *Crataegus* plants from the same Belgian nursery confirmed the previously obtained

results by Jock *et al.* (2002), since the strains coming from these nurseries are the only Spanish strains showing a Pt3 pattern that has not been identified in any other Spanish foci up to date. Thus, our results further confirm that at least some introductions of fire blight in Spain have been due to the import of latently infected plant material from other European countries (Jock *et al.*, 2002). Overall, the molecular analyses of Spanish and reference strains of *E. amylovora* by PFGE has confirmed previous studies showing the high genetic homogeneity within this species (Momol & Aldwinckle, 2000) as well as the value of this highly reproducible technique for both identification and epidemiological studies of the fire blight pathogen (Zhang & Geider, 1997; Jock *et al.*, 2002).

The polyphasic analyses of *E. amylovora* strains from eight Spanish regions have revealed a high homogeneity among them. In spite of this, their examination by means of PFGE analyses, together with MSP-PCR, AFLP and RAPD analyses, have been discriminative enough to confirm our hypothesis about the origin of some Spanish fire blight foci with, at least, three different introductions, corresponding to those of strains IVIA 1509-B from Guipuzcoa, IVIA 1525-1 from Guipuzcoa and IVIA 1578-3 from Segovia, as representative.

4.6. Acknowledgements

V. Donat thanks the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias for a predoctoral grant and E. G. Biosca thanks the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain for a contract within the Ramón y Cajal programme. This work was supported by CICYT projects AGF98-0402-C03-02 and AGL2001-2349-C03-02. We are grateful to M.D. García López, L. López and R. del Val for their collaboration in BIOLOG identification, as well as to P. Llop for advising with PCR assays. We thank J.-P. Paulin, K. Geider, C. Bazzi, J.L. Palomo and E. Montesinos for providing some of the *E. amylovora* strains. We also thank M.A. Cambra for strains and green pears, as well as the other Spanish colleagues that provided some *E. amylovora* strains.

CAPÍTULO 5

**A fully virulent *Erwinia amylovora* strain carrying no plasmid
pEA29 isolated in nature**

**Pablo Llop, Victoria Donat, Margarita Rodríguez, Jordi Cabrefiga, Lúdia Ruz,
José Luis Palomo, Emilio Montesinos and María M. López**

Applied and Environmental Microbiology (submitted)

5. A Fully Virulent *Erwinia amylovora* Strain Carrying No Plasmid pEA29 Isolated In Nature

5.1. Summary

An atypical strain of *Erwinia amylovora* was isolated near an outbreak of fire blight occurred at a nursery in Segovia (Spain) in 1996. It was obtained from a *Crataegus* with typical symptoms of the disease and was identified as *E. amylovora* by biochemical tests and Enrichment-ELISA, but not by PCR using primers from the pEA29 plasmid. Nevertheless, with primers designed from chromosomal regions, the isolate gave the expected amplification reaction. The study of the plasmid content harbored by this strain showed that it carries one plasmid of *c.* 70 kb. This plasmid has no homology with the 29 kb plasmid common to all pathogenic strains, neither with a large plasmid present in some *E. amylovora* strains. Growth of the strain in minimal medium without thiamine showed the same behavior as strains cured of the 29 kb plasmid: a lower growth compared to cultures in the same medium with thiamine. Nevertheless, virulence assays on pear, apple and *Pyracantha* plants and in immature pear fruits showed that it exhibited virulence levels similar to other strains containing the pEA29 plasmid. As far as we know, this is the first report of the isolation from naturally infected plant material of a pathogenic strain of *Erwinia amylovora*, which does not harbor the plasmid pEA29 and that it carries a new plasmid of *c.* 70 kb.

5.2. Introduction

Erwinia amylovora is the causal agent of fire blight, a disease that causes severe losses on rosaceous crops as pear and apple, and ornamental plants such as *Pyracantha*, *Crataegus*, *Sorbus*, and *Cotoneaster* (Zhang & Geider, 1997; Bonn & van der Zwet, 2000; Paulin, 2000). The spread of the disease has been important all over the world and in the last years in Europe (van der Zwet & Bonn, 1999) and great concern exists about the research on control systems, eradication measures and detection techniques to reduce the dissemination of the disease. Since the discovery of fire blight, many studies have been focused on the epidemiology and control of the disease (van der Zwet & Keil, 1979; Johnson & Stockwell, 2000; Thomson, 2000; McManus *et al.*, 2002) and the molecular biology of the genes involved in pathogenicity, virulence and production of symptoms (Steinberger & Beer, 1988; Barny *et al.*, 1990; Bugert & Geider, 1995; Eastgate, 2000; Ma *et al.*, 2001). Other works about the phenotypic and genotypic characteristics of the bacterium have shown that this species has a great homogeneity at genetic level (Momol *et al.*, 1997; Momol & Aldwinckle, 2000; Jock *et al.*, 2002), that corresponds with a similar homogeneity in biological and biochemical characteristics and with a wide host range, with the only exception of the isolates from *Rubus* (Momol & Aldwinckle, 2000; Paulin, 2000). One of the features common to all the pathogenic strains analyzed so far that have been isolated in nature is the presence of a 29 kb plasmid, called pEA29, and no reports have been made about the existence in nature of pathogenic strains without this plasmid. It has been assumed that all the pathogenic *E. amylovora* strains should carry the plasmid pEA29, due to its high stability and non transmissibility. Because of these characteristics, some studies have focused on the possible roles it might play, by means of curing this plasmid from different strains

(Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*, 1989; McGhee & Jones, 2000) and studying the consequences of its absence. Strains cured of the plasmid showed a loss in the virulence properties (delayed appearance of symptoms, reduction in the severity of symptoms, decreased amounts of ooze in artificial inoculations) compared to wild type strains. Accordingly, its involvement in some possible functions in fitness and virulence properties have been proposed so that the pEA29 could modulate the development of fire blight symptoms, having then an important role in virulence traits (Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*, 1989; McGhee & Jones, 2000).

In one survey performed in 1996 at a nursery and vicinities in Segovia, central part of Spain, typical symptoms of fire blight were found in some ornamental plants, and 30 isolates of *E. amylovora* were obtained from different hosts. A detailed analysis of one strain (IVIA 1614-2a) obtained from a *Crataegus*, 45 km far from the nursery, showed that it lacks the pEA29 plasmid. The objective of the present work was to perform an extensive phenotypic and molecular characterization of the strain, including plasmid profiles and DNA hybridization analyses. The results obtained were related to the pathogenicity and virulence on several host plants, and were compared to strains of *E. amylovora* harboring the plasmid pEA29.

5.3. Materials and methods

5.3.1. Bacterial strains and culture properties

The bacterial strains employed in the analyses are listed in Table 1. All the strains were grown on King's B medium (King *et al.*, 1954), and incubated for 24 h at 26°C. Growth rate in King's B, SNA (Billing *et al.*, 1961), CCT media (Ishimaru & Klos, 1984), as well as in minimal medium M9 with and without thiamine (Maniatis *et al.*, 1982) was

compared with reference strains in two independent experiments using the Bioscreen C system (Labsystems Oy, Finland). Ten μl of a suspension of 10^4 CFU/ml of each strain were incubated at 26°C , and the O.D. at 600 nm recorded for 5 days at intervals of 1 h with temporary shaking. Growth morphology on King's B, SNA and CCT media and on the selective media MM1Cu and MM2Cu (Bereswill *et al.*, 1998) and MS (Miller & Schroth, 1972) were analyzed and compared among the reference strains.

5.3.2. Phenotypic characterization

Biochemical and serological characteristics of strain 1614-2a were compared against some *E. amylovora* reference strains from different origins and hosts to confirm the identity of the isolate as belonging to such species. The strains were analyzed using biochemical tests, including commercial strips as API50CH, API20E, API20NE, APIZYM, (BioMérieux, France) following the manufacturer's instructions with modifications (V. Donat *et al.*, unpublished data), and also by their fatty acid profile (van der Zwet & Wells, 1993). Enrichment-ELISA with specific monoclonal antibodies according to Gorris *et al.* (1996a,b) was also used for identification of the isolate.

Resistance to antibiotics was tested on LB medium (Maniatis *et al.*, 1982) supplemented with streptomycin (Str, $50\ \mu\text{g/ml}$), kanamycin, (Km, $50\ \mu\text{g/ml}$), kasugamycin (Ksm, $200\ \mu\text{g/ml}$), and chloramphenicol (Cm, $50\ \mu\text{g/ml}$), and incubated at 26°C for 48 h. Other analyses performed involved hypersensitivity reaction (HR) in tobacco leaves (*N. tabacum*). The test was performed by infiltrating leaves with 10^9 CFU/ml bacterial suspensions in sterile distilled water and the HR reaction monitored after 24 h incubation at room temperature.

5.3.3. Molecular characterization

Strain IVIA 1614-2a was analyzed by different molecular techniques, to find genetic differences in comparison to reference strains. Methods used were REP-PCR (REP, BOX and ERIC) (Louws *et al.*, 1994), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) on total DNA restricted with enzyme *XbaI* following the method described in Jock *et al.* (2002), and PCR ribotyping with primers from 16S-23S rDNA intergenic spacer as described in McManus & Jones (1995b). PCR with three sets of chromosomal primers was performed in 1x reaction buffer, 1,5 mM MgCl₂, 100 μM dNTPs and 5 pmols of each primer. The amplification conditions were as described (Bereswill *et al.*, 1995; Guilford *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 1996)

5.3.4. Plasmid and hybridization analyses

The method of Zhou *et al.* (1990) was employed to check the plasmid content of the different strains. The Maxiprep GFII reagent kit (Q-BIOgene, USA) was used to extract the plasmids for restriction analyses. Plasmid content of reference strains and of strain 1614-2a and the corresponding restriction profiles using the enzymes *BamHI* and *EcoRI* were compared (*BamHI* has a unique restriction site in pEA29). The plasmid size was calculated with the fragments obtained with enzyme *BamHI* using the Kodak digital science 1D software (v. 3.0.1) (New Haven, USA). Plasmids pEA29 from strain CFBP 1430 and the 70 kb plasmid from strain IVIA 1614-2a were excised from gel, purified using the GeneClean Turbo kit (Qbiogene, USA), and labeled using the DIG High Prime DNA labeling kit I (Roche, Mannheim, Germany) to be used as probes. The plasmid extractions and restriction digests were transferred to nitrocellulose membranes using a modified rapid alkaline transfer method (Reed & Mann, 1985), and hybridized at 65°C. The membranes were recovered following the manufacturer instructions after using the

70 kb probe (Roche, Mannheim, Germany) to be hybridized again with the pEA29 probe. Plasmids of strain IVIA 1614-2a and reference strains were hybridized against the probes before and after restriction with the two enzymes. Also, total DNA was extracted following a simple protocol (Llop *et al.*, 1999), digested with *EcoRI* and hybridized against the pEA29 probe to detect any homology in the sequence of the chromosome of strain IVIA 1614-2 with the pEA29 *E. amylovora* plasmid.

The detection was performed using the Dig Wash and Block buffer set (Roche, Mannheim, Germany), and the membranes developed using X-OMAT UV film (Kodak, France) or alternatively visualized using the LAS 3000 system (Fuji film, Japan).

5.3.5. Pathogenicity and virulence assays

Assays of pathogenicity of strain IVIA 1614-2a and reference strains were carried out on immature pear fruits (cv. Williams and Blanquilla). Prior to inoculation, the fruits were washed once with a solution of 50% sodium hypochlorite (v/v) and rinsed twice with sterile distilled water for 5 min. Inoculations were performed by making a transverse cut with a disinfected scalpel and pipetting inside the wound 10 μ l of a 10^9 CFU/ml bacterial suspension in sterile PBS. Pears inoculated with strain CFBP 1430 and PBS were used as positive and negative controls, respectively. Fruits were incubated in humidity chambers at 25°C for a week and symptoms development was recorded daily. All the inoculations were repeated twice.

Virulence assays were performed on immature pear fruits (cv. Passe Crassane) and pear (cv. Conference), apple (cv. Fuji), and *Pyracantha* plants. They were inoculated with strain IVIA 1614-2a and reference strains. Plants were inoculated by dipping scissors in a 10^8 CFU/ml suspension of the bacteria and by cutting the three youngest leaves of the seedlings located at the tip. Plants were covered with plastic bags

and maintained in a controlled environment chamber at 22°C with high humidity conditions under a photoperiod of 16 hours of light. Evaluation of blight symptoms was made after 10 days of incubation by means of a visual scale (from 0 to 4). The scale was based on necrosis progression as follows: 0=no symptoms; 1=necrosis located at the inoculation point and the midvein; 2=necrosis affecting the midvein and the petiole; 3=necrosis expanding through the shoot; 4=necrosis affecting the shoot and other leaves down in the shoot (Duron *et al.*, 1987). Disease severity (*S*) was calculated for each plant according to the following formula:

$$S = \sum_{n=1}^N \frac{I_n}{(N \cdot I_{max})} \cdot 100$$

where I_n is the corresponding rating of infection in an inoculated leaf, N is the number of leaves inoculated per plant, and I_{max} is the maximum disease rate.

Virulence assays were also performed on immature pear fruits (2-3 cm diameter), which were surface-disinfected as previously described and let stand to remove excess wetness. Then, fruits were wounded in the equatorial zone (four wounds per fruit) with a flame sterilized nail to a uniform depth of 5 mm and approximate wide of 3 mm. Each wound was inoculated by deposition of 10 µl of a suspension adjusted to 10³ CFU/ml. Then, fruits were placed in polystyrene tray packs, covered with plastic bags to maintain high humidity conditions, and incubated at 21 °C. The incidence of infected wounds (%) for each repetition was assessed after 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 days of incubation.

The experimental design in both experiments (fruits and plant tests) consisted of three replicates of three plants/fruits per treatment. The effect of strain on disease severity and incidence was determined by an analysis of variance (ANOVA) using the

general linear models (GLM) procedure of statistical analysis system (SAS) (Version 8.2, SAS Institute Inc., NC, USA). Means were separated by the Tukey's test.

5.4. Results

5.4.1. Phenotypic and molecular characterization and growth rates

All the analyses performed with strain IVIA 1614-2a provided similar results to reference strains harboring the plasmid pEA29. The morphology of this isolate on King's B, SNA, and CCT media was identical to that of reference *E. amylovora* strains, and only on MS medium the colonies presented a rough instead of smooth surface. *E. amylovora* strains do not grow on MM1Cu medium, and the same was observed with the strain analyzed. It was identified as *E. amylovora* by characterization with API systems, fatty acid profile and ELISA with specific monoclonal antibodies. Growth rate was the same for all the strains compared in all media except in M9 medium in absence of thiamine, in which strains PMV6014, cured of plasmid pEA29, and IVIA 1614-2a presented a lower growth than the other strains, but similar between them (Fig. 1).

Hypersensitivity reaction on tobacco leaves was positive for strain IVIA 1614-2a as well as for the reference strains.

The results obtained in the different assays performed for molecular characterization of the isolate are shown in Table 1. When analyzed by PCR with primers from the plasmid, strain IVIA 1614-2a did not provide any signal but with chromosomal primers the PCR gave the same band size as the *E. amylovora* reference strains. Molecular analyses employed for characterization (REP-ERIC-BOX) showed identical patterns between IVIA 1614-2a and strains carrying plasmid pEA29 (data not shown). Strain IVIA 1614-2a exhibited pattern Pt3 by PFGE analysis with restriction enzyme *Xba*I.

PCR ribotyping provided the same pattern band for all strains corresponding to type 1 (Donat *et al.* unpublished results).

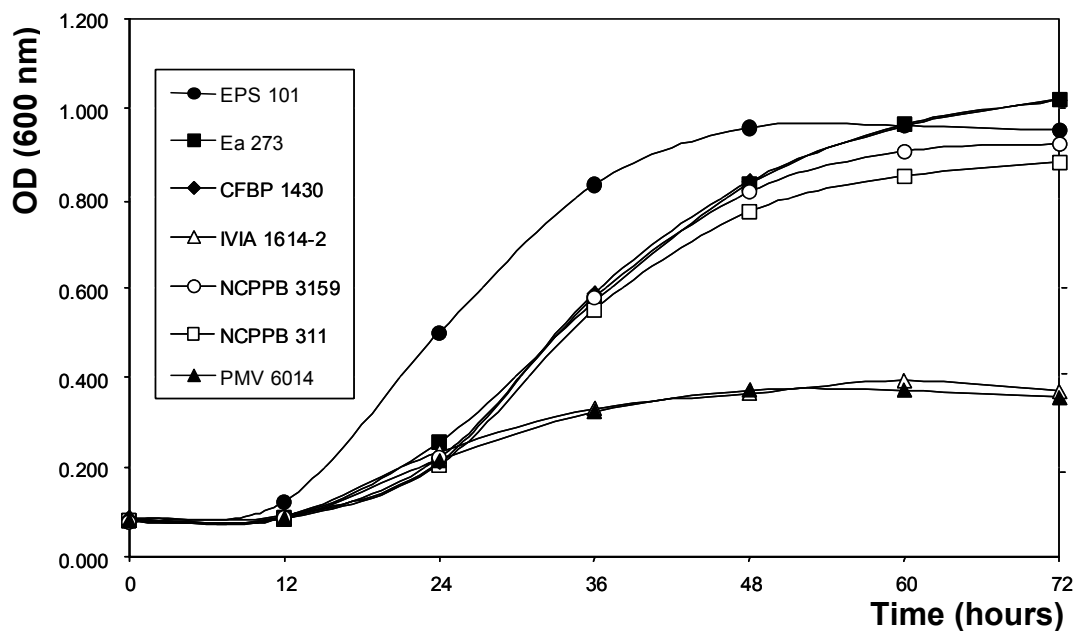


Fig. 1. Growth of strain IVIA 1614-2a compared to reference strains in M9 minimal medium without thiamine. The behavior is similar to the cured strain PMV 6014.

Table 1. Molecular characterization of strain IVIA 1614-2a in comparison to *E. amylovora* reference strains.

Strain	Origin	Host	PCR			PFGE ^e
			pEA29 ^b	Chromosome ^c	Ribotyping ^d	
CFBP 1430	France	<i>Crataegus</i>	+	+	+	Pt3A
Ea 273	USA	<i>Malus</i>	+	+	+	Pt4
NCPPB 311	Canada	<i>Pyrus</i>	+	+	+	Pt1
NCPPB 3159	The Netherlands	<i>Malus</i>	+	+	+	Pt1
EPS 101	Spain	<i>Pyrus</i>	+	+	+	Pt4
IVIA 1614-2a	Spain	<i>Crataegus</i>	-	+	+	Pt3
PMV 6014 ^a	France	-	-	+	+	-

^a: Strain CFBP 1430 cured of plasmid pEA29 (Laurent *et al.*, 1989)

^b: Using primers designed from the pEA29 plasmid (Bereswill *et al.*, 1992; McManus & Jones, 1995a; Llop *et al.*, 2000)

^c: Using primers designed from the chromosome (Bereswill *et al.*, 1995, Guilford *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 1996)

^d: Assay as previously described (McManus & Jones, 1995b)

^e: Profiles obtained with PFGE according to Jock *et al.* (2002)

5.4.2. Plasmid profiles and hybridization analyses

The plasmid content of strain IVIA 1614-2a was compared to that of reference strains. The strain IVIA 1614-2a harbors only one plasmid of higher size than pEA29, and similar to another plasmid present in some of the reference strains employed in this work (Fig. 2). The band profiles after restriction with enzymes *EcoRI* and *BamHI* were different with strain IVIA 1614-2a compared to the reference strains (data not shown),

and the calculation of the bands provided an estimate size of *c.* 70 kb (Fig. 3). The restriction of the large plasmids present in some of the reference strains (Ea 273, NCPPB 311) also showed, as the plasmid content displayed in Fig. 2, a size of approx. 70 kb, but the restriction profile was different to the plasmid from strain IVIA 1614-2a.

Hybridizations performed after restriction of plasmid content with *EcoRI* and *BamHI* enzymes with the 70 kb plasmid from strain IVIA 1614-2a as probe were negative with the reference strains, whereas only this strain produced hybridization signal (Fig. 4A). With the plasmid pEA29 as probe all the reference strains hybridized but the strain IVIA 1614-2a did not provide any signal (Fig. 4B). The results obtained with total DNA showed that no homologous sequence belonging to the pEA29 plasmid was present in the chromosome of strain IVIA 1614-2a (data not shown). All these analyses demonstrated, along with the negative results of the PCR assays with primers specific for the pEA29 plasmid and the analysis of the plasmid content, that this isolate does not harbor the pEA29 plasmid characteristic of all wild strains described. Also these results showed that no sequences from pEA29 were found inserted neither in the chromosome nor in the 70 kb plasmid. For this reason, the virulence studies became necessary to assess if the absence of the ubiquitous plasmid made the isolate less fitted in symptom development than strains carrying the plasmid.

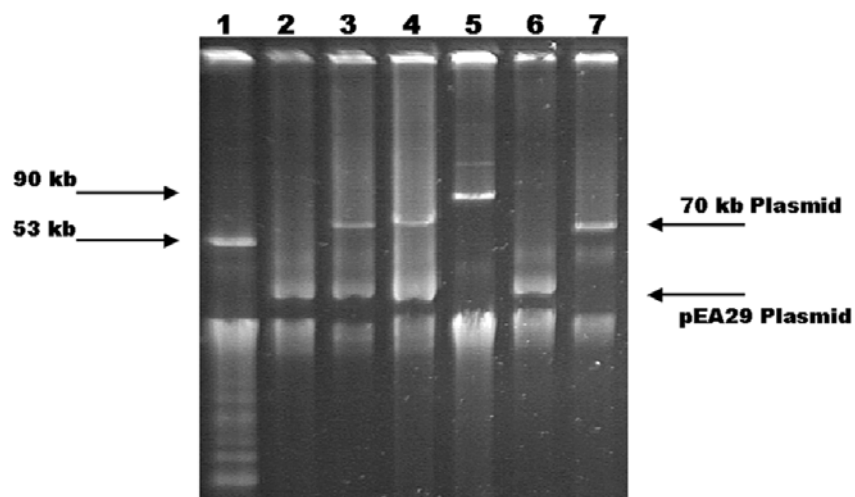


Fig. 2. Plasmid content of strain IVIA 1614-2a compared to reference strains. Lane 1: *E. coli* strain V517 (plasmid marker); lane 2: strain EPS 101; lane 3: strain Ea 273; lane 4: strain NCPPB 311; lane 5: plasmid PJB4JI (plasmid marker); lane 6: strain CFBP 1430; lane 7: strain IVIA 1614-2a.

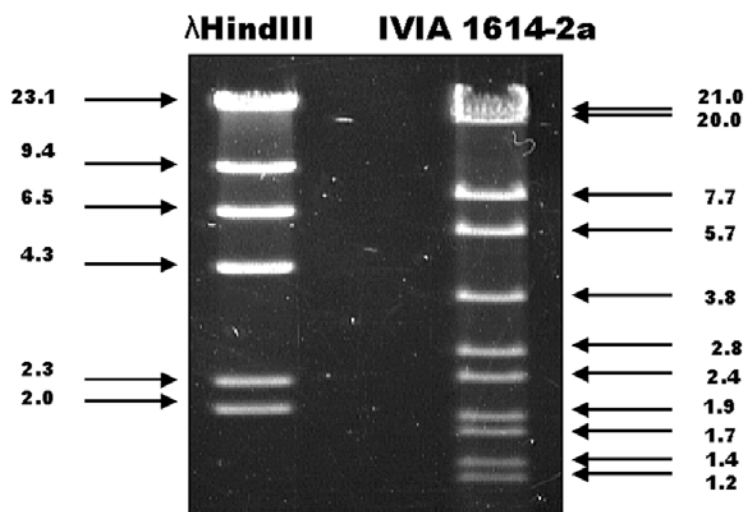


Fig. 3: Restriction analysis of strain IVIA 1614-2a with *Bam*HI enzyme and size estimation using the Kodak digital science software v. 3.0.1. The size of the bands obtained is shown in kb. Plasmid from strain IVIA 1614-2a was approx 70 kb.

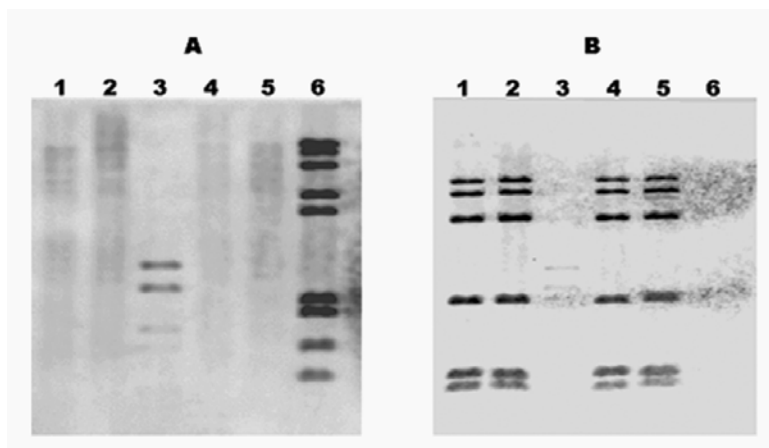


Fig. 4. Hybridization analyses performed with the plasmids of the *E. amylovora* strains after restriction with *EcoRI* with 70 kb plasmid from strain IVIA 1614-2a (A) and with pEA29 after recovering the membrane (B) as probes. Lane 1: strain EPS 101; lane 2: Ea 273; lane 3: marker VI (Boehringer Mannheim); lane 4: NCPBP 311; lane 5: CFBP 1430; lane 6: IVIA 1614-2a. No hybridization signal was obtained between the two plasmids with any of the probes assayed.

5.4.3. Pathogenicity and virulence assays

Pathogenicity assays made on immature pear fruits gave positive results with strain IVIA 1614-2a as well as with the reference strains analysed with the two cultivars employed (Williams and Blanquilla), and the ooze production was observed at the same time with the only exception of strain NCPBP 311, which produced no symptoms or very small necrosis, without ooze production (Fig. 5).

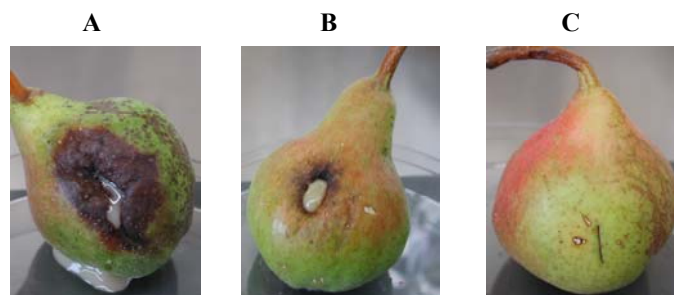


Fig. 5. Pathogenicity assays on immature pear fruits. Ooze production observed a week after inoculation. A: Control strain CFBP 1430; B: strain IVIA 1614-2a; C: negative control. The production of ooze was clearly observed in strain IVIA 1614-2a without pEA29, although with a smaller amount than with CFBP 1430.

Virulence assays were performed on apple, pear and *Pyracantha* plants and immature pear fruits to compare the severity of infections developed by isolate IVIA 1614-2a with those of strains that carry the pEA29 plasmid. Strain IVIA 1614-2a exhibited a global virulence level similar to that of the reference strains. The severity of infection in plants was above of strain NCPPB 311, similar to strains CFBP 1430 and EPS 101 in apple and *Pyracantha* and in all hosts with strains Ea 273 and NCPPB 3159. Disease levels caused by IVIA 1614-2a were only below of strains CFBP 1430 and EPS 101 in pear. In immature pear fruits the incidence of infected wounds was superior to strains NCPPB 311 and NCPPB 3159, and similar to the other strains (Table 2).

The time course of incidence of infected wounds in immature pear fruits is shown in Fig. 6. Disease development of strain IVIA 1614-2a was produced at intermediate levels. However, after the tenth day from inoculation, no differences in disease levels were observed among strains. The time required to observe lesions in wounds was shorter for strain IVIA 1614-2a than for strains CFBP 1430, NCPPB 3159 and NCPPB 311.

Table 2. Virulence of strain IVIA 1614-2a in plants and immature pear fruits compared to reference *E. amylovora* strains.

Strain ^a	Severity of infections in plants (%) ^b					Incidence of infected wounds in immature pear fruits (%) ^c	
	Pear		Apple		<i>Pyracantha</i>		
CFBP 1430	90.7	a	60.6	A	18.1	100.0	a
Ea 273	65.7	bc	69.6	a	13.9	100.0	a
NCPPB 311	1.0	d	3.7	b	2.8	12.5	c
NCPPB 3159	63.0	c	54.5	a	5.6	83.3	b
EPS 101	84.3	ab	64.5	a	20.8	100.0	a
IVIA 1614-2a	65.7	bc	43.9	a	11.1	95.8	a

^aMeans within the same column followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$) according to Tukey's test.

^bPlants were inoculated by cutting youngest leaves with scissors dipped into a bacterial suspension of 10^8 CFU/ml. Severity was calculated as percentage of the maximum observed according to the formula described in Materials and Methods.

^cImmature pear fruits were inoculated by deposition of 10 μ l of a bacterial suspension of 10^3 CFU/ml in each wound. Results are means of three replicates of three fruits with four wounds per fruit.

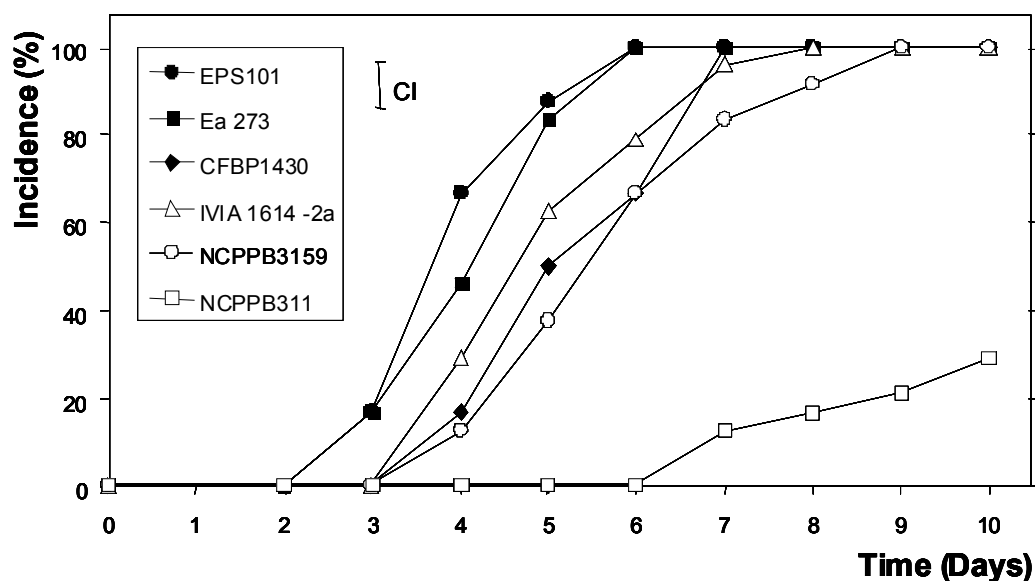


Fig. 6. Time course of incidence of infected wounds in immature pear fruits inoculated with either strain IVIA 1614-2a or reference strains. The mean confidence interval (CI) for all data points is indicated.

5.5. Discussion

Several works have demonstrated the presence of plasmid pEA29 in pathogenic strains of *E. amylovora* (Falkenstein *et al.*, 1988; Laurent *et al.*, 1989; Steinberger *et al.*, 1990; Momol *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1995; Lecomte *et al.*, 1997; Llop *et al.*, 2000). The sequencing of this plasmid has shown that it does not carry any transfer nor mobilization genes (McGhee & Jones 2000), and this, along with its high stability, has induced the common idea that all virulent strains in nature should harbor the plasmid.

Despite the fact that not known pathogenicity nor virulence genes have been found in the sequence of the plasmid, the virulence experiments performed on strains cured of pEA29 compared to the same strains harboring the plasmid showed a loss in the virulence properties (delayed virulence, reduction in the severity of disease symptoms, lower amount of ooze in artificial inoculations). This led to the conclusion that it may play a role on virulence and fitness (Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*,

1989; McGhee & Jones, 2000). Nevertheless, such plasmid has only been implicated in the metabolic pathway of thiamine (McGhee & Jones, 2000) suggesting that the lack of the plasmid could reduce the adaptative fitness for survival in plant tissues. This reason could explain the delay in the development of symptoms in the cured strains and the failure in finding in nature plasmidless strains. However, some research has pointed out the possible existence of naturally occurring strains that could not present the pEA29 plasmid. Brown *et al.* (1996) reported that five strains out of 100 from 21 countries and 13 host genera, analyzed by PCR for the presence of the plasmid, failed to amplify with primers of pEA29. More recently, Brennan *et al.* (2002) analyzed 75 *E. amylovora* strains with primers from such plasmid, and four of them failed to give the amplification signal. Although the lack of the pEA29 plasmid was postulated as an explanation of the results obtained, no further studies were performed. Until now, no research has demonstrated the existence in nature of pathogenic strains without the pEA29 plasmid.

The isolate IVIA 1614-2a is considered an *E. amylovora* strain regarding its biochemical, serological and molecular characteristics. Also, the growth rate of the strain in several media is similar to other *E. amylovora* strains. The only exception was the growth on minimal medium without thiamine, where it shows the same slower development as mutants cured of the plasmid pEA29.

Virulence experiments showed differential levels among the *E. amylovora* strains studied, including IVIA 1614-2a. The concept of differential virulence has been proposed previously (Norelli *et al.*, 1984, 1986; Steinberger *et al.*, 1990) and it may be affected by the host. In our experiments, some of the strains exhibited rapid development of symptoms and strong aggressiveness (EPS 101, CFBP 1430), whereas others presented minor or delayed symptoms (NCPPB 311) in comparison to more

aggressive strains. Taken into account the range of virulence among *E. amylovora* strains carrying the pEA29 plasmid, strain IVIA 1614-2a was situated in an intermediate position. However, this strain does not harbor the pEA29 plasmid common in all pathogenic strains, instead, it contains a plasmid of a size of *c.* 70 kb, similar to other large plasmids present in some of the reference strains, but with no relation between them, as demonstrated by the restriction and hybridization analyses.

Regarding all the studies carried out on *E. amylovora* strains, the lack of plasmid pEA29 must be quite scarce, but plasmidless strains may exist with virulence capabilities at a level that allow them to infect and provoke the disease in susceptible plants. The fact that such strains have not been previously reported could be related to: (i) the stability of the plasmid, that makes it very difficult to be ride of it, (ii) a reduced fitness related to pathogenicity characteristics of the bacteria without the plasmid for surviving and competing against the others, (iii) the lack of analyses by PCR with primers from the plasmid over a large collection of strains.

The most sensitive technique available for the detection of *E. amylovora* is considered to be the PCR using primers designed from the 0.9 kb *Pst*I fragment of the pEA29 kb plasmid (Bereswill *et al.*, 1992; McManus & Jones, 1995a; Llop *et al.*, 2000). Therefore, the existence of strains without pEA29 compromises these detection systems, an aspect of great concern in epidemiological studies and eradication programs. Furthermore, the finding of these strains strongly supports the need to use a combination of several techniques in an integrated approach for detection of *E. amylovora* in plant material (López, 2004).

The existence of a strain capable of competing and staying in nature without harboring the pEA29 represents a novelty, but probably is not an exception. The origin

of this strain remains unclear: is it a strain that has lost the 29 kb plasmid and also carried another that still conserve or it never harbored the plasmid? Is its 70 kb plasmid involved in virulence features that provide similar characteristics as strains with the pEA29 plasmid? The study of the plasmid content of more isolates obtained from the same outbreak could provide some light about these questions.

The possible roles of the pEA29 plasmid in *E. amylovora* need to be reconsidered, and further studies on the plasmid and chromosomal content of strain IVIA 1614-2a compared to other *E. amylovora* strains would be of great interest to clarify these questions.

5.6. Acknowledgements

We thank Carmina Montón and Francesc García for fatty acid analyses, and Marie Anne Barny for providing strain PMV 6014. This work was supported by Projects AGF98-0402-C03 and AGL20012349-C03 from the “Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología-CICYT” of Spain. V. Donat thanks the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias for a predoctoral grant.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6: Discusión general y conclusiones

6.1. Discusión general

El presente trabajo incluye la primera caracterización fenotípica y genotípica de un gran número de cepas de *Erwinia amylovora* aisladas en España desde los primeros focos detectados en 1995 y los sucesivos hasta el año 2001. Con el objeto de constituir la colección de cepas procedentes de distintas Comunidades Autónomas y hospedadores que ha servido de base para esta investigación, en primer lugar se ha confirmado la identidad serológica y molecular de los aislados de *E. amylovora*, así como su poder patógeno. Los resultados han confirmado la validez de dos métodos de identificación desarrollados en los Laboratorios de Bacteriología y de Virología e Inmunología del IVIA: el ELISA-DASI (ELISA indirecto de doble *sandwich* de anticuerpos) (Gorris *et al.* 1996a,b), que utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales, y está disponible comercialmente en forma de un estuche para la detección específica de *E. amylovora* (PlantPrint Diagnòstics, Valencia, España), y que ha proporcionado una reacción serológica positiva para todas las cepas estudiadas. El otro método es la *Nested*-PCR en un solo tubo (Llop *et al.*, 2000) cuya principal ventaja reside en la minimización del riesgo de contaminaciones, además de proporcionar elevadas sensibilidad y especificidad. Asimismo, ha quedado confirmada la utilidad de la pEA29-PCR con los iniciadores desarrollados por McManus y Jones (1995a) para la identificación de este patógeno bacteriano. La reproducción de síntomas no sólo se ha demostrado en peras inmaduras, sino también en frutos inmaduros de otros hospedadores como el níspero y no hospedadores como el albaricoque, lo cual revela la utilidad de estos dos últimos para la confirmación del poder patógeno de *E. amylovora*, así como el riesgo potencial

que supondría la presencia de esta bacteria para otros frutales que hasta ahora no se han visto afectados por el fuego bacteriano.

Las características generales de las cepas españolas de *E. amylovora* en comparación con las cepas de referencia se resumen a continuación, habiendo mostrado todas ellas una elevada homogeneidad fenotípica en sus características morfológicas, culturales, bioquímicas y fisiológicas. Han crecido mostrando la morfología colonial típica en los distintos medios semiselectivos y selectivos ensayados: colonias blancas abombadas en SNA (Billing *et al.*, 1961), violáceas abombadas en CCT (Ishimaru y Klos, 1984), rojas fluidas en MS (Miller y Schroth, 1972) y amarillas en MM2Cu (Bereswill *et al.*, 1998), con un grado de mucosidad variable en este último medio. Tal como era de esperar, ninguna de las cepas ha crecido en MM1Cu (Bereswill *et al.*, 1998).

Como excepciones, se han encontrado una cepa española y dos de referencia deficientes en la producción de levano, ya que no produjeron las típicas colonias abombadas en los medios SNA y CCT. Este hecho atípico ya había sido descrito anteriormente por Bereswill *et al.* (1997) en cepas holandesas de *E. amylovora*, en las que la expresión del gen de la levansucrasa parecía estar regulada por la temperatura. Este fenómeno podría favorecer a la bacteria en función del contenido en sacarosa de las distintas partes de las plantas rosáceas (Geier y Geider, 1993; Bogs y Geider, 2000). En nuestro trabajo se ha descartado que las cepas deficientes en la producción de levano sean mutantes en el gen de la levansucrasa afectados en su patogenicidad, como habían propuesto Geier y Geider (1993), ya que produjeron necrosis y exudados típicos en brotes de peral. También se ha excluido la existencia de defectos en el metabolismo de

la sacarosa, ya que mostraron crecimiento normal en medio mínimo suplementado con este azúcar como fuente única de carbono.

La reacción de hipersensibilidad (HR) en hojas de tabaco se confirmó en todos los casos, incluso con las cepas deficientes en la producción de levano, aunque en dos cepas españolas y una de referencia, el desarrollo de la respuesta se retrasó hasta las 72 h, en lugar de las 24 h habituales. Este retraso no se debe a una menor velocidad de crecimiento de estas cepas, ya que la curva de crecimiento de estas cepas es similar a la de la cepa referencia. Tampoco se ha podido atribuir a una auxotrofia puesto que estas cepas crecieron con normalidad en el medio mínimo M9 (Maniatis *et al.*, 1982).

Todas las cepas españolas de *E. amylovora* examinadas fueron susceptibles a varios antibióticos de uso agronómico frente al fuego bacteriano: tetraciclina, ácido oxolínico, kasugamicina y estreptomina (Saygili y Üstün, 1996; Psallidas y Tsiantos, 2000; Shtienberg *et al.*, 2001), a excepción de una cepa de referencia aislada en Estados Unidos que fue capaz de crecer en presencia de estreptomina a la concentración ensayada. Ambos resultados eran esperables ya que el uso de estos antibióticos no está permitido en la UE (excepto la kasugamicina, cuyo uso está registrado en España), pero sí en Estados Unidos y Nueva Zelanda, donde se utiliza la estreptomina en la lucha contra el fuego bacteriano y ya se habían descrito resistencias a ésta (Jones y Schnabel, 1998; Vanneste y Voyle, 1998).

El estudio de la diversidad intraespecífica de las cepas españolas de *E. amylovora* mediante los sistemas multiprueba API 20E, API 50CH, API ZYM y ATB G-5 (bioMérieux) ha confirmado la homogeneidad de este patógeno y la utilidad de estas pruebas para la identificación de esta especie.

La utilización de distintos sustratos mediante el sistema comercial miniaturizado API 20E (bioMérieux) ha puesto de manifiesto la elevada homogeneidad de las cepas españolas desde el punto de vista bioquímico, hecho anteriormente observado en cepas de otros países (Paulin y Samson, 1973; Mergaert *et al.*, 1984; Vantomme *et al.*, 1986; Verdonck *et al.*, 1987). Los dos perfiles mayoritarios, exhibidos por alrededor del 50% y el 30% de las cepas respectivamente, sólo difieren en el resultado de la actividad β -galactosidasa, que fue positivo para el primer grupo. Los otros perfiles obtenidos han sido minoritarios y se deben a las variaciones encontradas en la producción de gelatinasa y de ácido a partir de manitol, sorbitol y arabinosa. Dos de los perfiles hallados coinciden con algunos de los descritos en trabajos previos (Mergaert *et al.*, 1984; Vantomme *et al.*, 1986).

Los resultados de las galerías API 50CH también han mostrado consistencia con estudios anteriores (Verdonck *et al.*, 1987), aunque con ligeras diferencias en las pruebas variables. Estas discrepancias probablemente se deben a la utilización de un medio basal distinto ya que, en nuestro trabajo, el medio provisto por el fabricante se ha sustituido por el medio basal de Ayers, modificado con mayor concentración del indicador (Biosca *et al.*, 2003). La utilización del sistema API 50CH también ha puesto de manifiesto la capacidad de *E. amylovora* para hidrolizar esculina, en desacuerdo con estudios anteriores (Paulin y Samson, 1973; Verdonck *et al.*, 1987) pero en coincidencia con otro más reciente de Rijckaert (1994), citado en Hauben *et al.* (1998). No obstante, esta reacción se ha observado a partir de los 5 días, cuando el tiempo de lectura habitual para la galería API 50CH es de 48 h. El uso de pruebas convencionales ha confirmado este resultado para tiempos de experimentación desde 5 hasta 21 días, dependiendo de la cepa.

El análisis de actividades enzimáticas mediante las galerías API-ZYM ha revelado perfiles idénticos para las cepas evaluadas (que han producido hasta seis enzimas distintos) de modo que este sistema resulta más adecuado para la identificación presuntiva de *E. amylovora* que para el estudio de su diversidad intraespecífica.

Igualmente, la susceptibilidad *in vitro* frente a antibióticos de uso clínico estudiada mediante el uso de las galerías ATB G-5 (bioMérieux) tampoco ha producido perfiles variables que pudieran ser relacionados con ninguna otra característica de la bacteria. En general, las cepas examinadas de *E. amylovora* han proporcionado un perfil dominante de resistencia a cefalotina y sensibilidad al resto de antibióticos a las concentraciones ensayadas, resultado que no sorprende, ya que los antibióticos evaluados son de uso clínico. No obstante, cabría destacar una cepa española que ha presentado resistencia a un antibiótico β -lactámico (amoxicilina), tanto con ácido clavulánico como sin él. Ello sugiere una posible transferencia horizontal de plásmidos portadores de dicha resistencia, hecho ya constatado en otra *Erwinia* fitopatógena (Vimont *et al.*, 2002) y en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de animales (Pezzella *et al.*, 2004). De manera análoga, anteriormente ya se había detectado la transferencia del plásmido pEA34, portador de resistencia a estreptomicina, desde *Pantoea agglomerans* a *E. amylovora* (Chiou y Jones, 1993).

Con respecto a la caracterización molecular, los métodos seleccionados para este trabajo han sido aquellos que previamente habían proporcionado datos útiles para investigar la diversidad intraespecífica de *E. amylovora* (McManus y Jones, 1995b). Sin embargo, al aplicar las técnicas de MSP-PCR, AFLP y RAPD a una selección de cepas, se han obtenido perfiles idénticos para todas las cepas estudiadas, a excepción de una de ellas, aislada de *Cotoneaster* de Guipuzcoa en 1996. Ésta última ha podido ser

distinguida de las demás procedentes de la misma zona y época mediante MSP-PCR, AFLP y RAPD, ya que en todas ellas mostró un perfil distinto al de las cepas restantes, hecho que sugiere una posible correlación entre los resultados de las tres técnicas anteriormente mencionadas.

Los resultados de AFLP del presente trabajo contrastan con los de Rico *et al.* (2004), utilizando una colección reducida de cepas de *E. amylovora* (algunas españolas). Éstas se han podido distinguir de forma individual, aunque las diferencias observadas no han podido relacionarse con el origen geográfico, hospedador o año de aislamiento (Rico *et al.*, 2004). De modo similar, la utilización de la técnica de PCR-ribotipado en las cepas españolas ha mostrado un único perfil, que coincide con uno de los cuatro descritos en cepas del este de Norteamérica: el ribotipo 1, dominante en Nueva Zelanda y el este de Norteamérica (McManus y Jones, 1995b). Esta homogeneidad sugiere una relación clonal entre las cepas españolas del patógeno del fuego bacteriano. No obstante, la homogeneidad hallada en nuestro estudio no es de extrañar, teniendo en cuenta la reciente presencia de la enfermedad en España (desde 1995) en comparación con Norteamérica, donde persiste desde hace más de 200 años, siendo un tiempo lo suficientemente largo como para que hayan tenido lugar cambios en el genoma de la bacteria.

En este trabajo también se ha abordado el análisis mediante macrorrestricción con *XbaI* y posterior separación por PFGE del ADN genómico de una colección de cepas de *E. amylovora* de Bélgica, Reino Unido, Francia, Alemania, Italia, Holanda, España, Polonia, Bulgaria y Egipto. Los resultados han mostrado los cinco patrones ya conocidos (Pt1 a Pt5), que apoyan la hipótesis sobre las distintas olas de la enfermedad en el continente europeo (Bazzi *et al.*, 1999). También se ha observado el

fraccionamiento en la distribución geográfica del patrón Pt3, que prevalece en zonas separadas como el norte de Francia, el norte de Italia y centro de España. Además, se ha detectado un nuevo patrón (Pt6) en Italia, aparentemente transitorio puesto que lo han presentado únicamente las cepas aisladas en ese país durante 1991 y 1992. Los patrones de macrorrestricción con *Xba*I del genoma de las cepas de *E. amylovora* de diversos países europeos (incluyendo España) seguida de separación mediante PFGE, muestran variaciones mínimas debidas a mutaciones espontáneas menores en el genotipo que parecen estar relacionadas con el origen geográfico (Bazzi *et al.*, 1999). Estos patrones son muy estables en grandes zonas y se mantienen tras las sucesivas resiembras en el laboratorio, lo cual, junto con su elevada reproducibilidad, hace de esta técnica una herramienta adecuada para la identificación de este patógeno.

El estudio del polimorfismo de los fragmentos generados con *Xba*I por las cepas españolas de *E. amylovora* ha revelado, pese a la homogeneidad de los perfiles, una banda de 130 kb que permite diferenciarlas en dos patrones previamente descritos: Pt4, que presenta esta banda, y Pt3, que carece de dicho fragmento diferenciador. Las cepas del País Vasco, Navarra, Cataluña y Aragón han presentado el patrón Pt4, descrito en el oeste de Francia y el sur del Reino Unido (Bazzi *et al.*, 1999). Éstas podrían estar relacionadas con cepas persistentes al otro lado de la frontera en el sur de Francia, desde donde pudo haberse introducido el patógeno por diseminación natural o a través de material vegetal asintomático. Sólo las cepas aisladas de viveros de Guadalajara y Segovia presentaron el patrón Pt3, descrito en el norte de Italia, el norte de Francia, Bélgica y Holanda (Zhang *et al.*, 1998; Bazzi *et al.*, 1999). Como resultado del presente estudio, se ha hallado una relación entre este patrón y el origen geográfico de estos aislados, ya que ambos viveros habían importado plantas de *Crataegus* de Bélgica en el

año precedente a la detección. Este resultado indica que la importación de plantas de países terceros podría haber sido la causa de su introducción en nuestro país, ya que los dos viveros se hallan a más de 400 Km. de distancia de otro foco de fuego bacteriano y el patrón Pt3 no ha sido identificado hasta ahora en ningún otro foco español.

Los polimorfismos observados en los fragmentos de macrorrestricción se deben a una única banda y/o a la pequeña distancia entre dos bandas, lo cual hace difícil sacar conclusiones geográficas (Bazzi *et al.*, 1999). Pese a este hecho, la técnica de PFGE presenta cierta ventaja en el caso que nos ocupa frente a otras como AFLP (Rico *et al.*, 2004) o SSR (Ruppitsch *et al.*, 2004), ya que, aunque éstas han mostrado mayor capacidad para detectar variabilidad, la caracterización mediante PFGE ha permitido formular hipótesis acerca de la relación entre focos y la diseminación del fuego bacteriano en España. Los resultados obtenidos en este trabajo mediante PFGE, junto con los de MSP-PCR, AFLP y RAPD en una selección de cepas, apoyan dos hipótesis sobre el origen y la diseminación del fuego bacteriano en nuestro país: en primer lugar, la introducción de material vegetal infectado (posiblemente asintomático) procedente de otros países de Europa como posible responsable de uno de los focos de infección de esta enfermedad en España y, en segundo lugar, la existencia de, al menos, tres fuentes de inóculo distintas.

La detección de cepas de *E. amylovora* que exhiben alguna propiedad atípica de forma natural es poco frecuente, y por tanto no son significativas en la variabilidad, aunque podrían ser objeto de posteriores estudios de cara a un mejor conocimiento de propiedades como la producción de levano y la HR. Además de las cepas anteriormente mencionadas que diferían en las características ya comentadas, la cepa de referencia NCPPB 595 mostró una serie de rasgos fenotípicos distintos a los habituales en *E.*

amylovora, como la falta de crecimiento en los medios MM2Cu (Bereswill *et al.*, 1998) y MS (Miller y Schroth, 1972), cuyas fuentes de carbono son sorbitol y manitol, respectivamente. Tampoco creció en medio basal Ayers (Ayers *et al.*, 1919) suplementado o no con ácido nicotínico, ni en medio mínimo M9 suplementado con glucosa (Maniatis *et al.*, 1982), hechos que sugieren posibles auxotrofías. En las inoculaciones en frutos inmaduros fue incapaz de producir los síntomas típicos del fuego bacteriano en peras y en nísperos, aunque sí los produjo débilmente en albaricoques inmaduros. Tras inocularla en brotes de peral, tampoco se observaron síntomas.

De forma parecida, otra cepa de referencia (NCPPB 311) tampoco reprodujo la necrosis ni los exudados típicos en peras, nísperos, ni albaricoques inmaduros, además de presentar retraso en el desarrollo de la HR y en el desarrollo de síntomas en brotes de peral. Éstas y otras cepas con comportamientos similares constituyen potencialmente un material de base para futuras investigaciones acerca de la patogenicidad y/o el metabolismo y las características nutricionales de esta especie. Además, su existencia hace patente la necesidad de utilizar varias técnicas en la identificación del patógeno del fuego bacteriano, tal como se recomienda en el protocolo DIAGPRO para el diagnóstico de *E. amylovora* (López *et al.*, 2002b, 2004; López, 2004).

Otro rasgo atípico de mayor relevancia detectado en una de las cepas españolas del patógeno del fuego bacteriano es la carencia de forma natural del plásmido de 29 kb. Hasta ahora era considerado ubicuo debido a su alta estabilidad y a la ausencia de genes de movilización en su secuencia (McGhee y Jones, 2000), por tanto, se trata de la primera descripción de este fenómeno en el patógeno del fuego bacteriano. La cepa IVIA 1614-2a se aisló en 1996 de una planta de *Crataegus* con síntomas de fuego

bacteriano procedente de un vivero de Segovia y se identificó como *E. amylovora* mediante pruebas bioquímicas y ELISA-enriquecimiento en el momento de su aislamiento, aunque mostró un resultado negativo en la reacción de PCR utilizando iniciadores basados en secuencias del plásmido pEA29.

Años más tarde, la ausencia de amplificación al llevar a cabo la pEA29-PCR (Bereswill *et al.*, 1992; McManus y Jones, 1995a; Llop *et al.*, 2000) ha llevado a confirmar la identidad de esta cepa mediante pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares, examinar su contenido plasmídico, comprobar su patogenicidad y evaluar su grado de virulencia. Los resultados han confirmado que se trata de una cepa de *E. amylovora* sin el plásmido pEA29 y además han revelado la presencia de otro plásmido de mayor tamaño, de aproximadamente 70 kb. Los ensayos de hibridación y los análisis de restricción han mostrado asimismo que este plásmido de mayor tamaño no tiene homología con el pEA29 ni con el otro plásmido anteriormente descrito en esta especie, pCPP60, de unas 56 kb (Steinberger *et al.*, 1990). Dado que las cepas curadas del pEA29 presentan un requerimiento de tiamina, (Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*, 1989), se ha ensayado el crecimiento de la cepa IVIA 1614-2a en medio mínimo sin tiamina, mostrando el mismo comportamiento que las cepas curadas: un crecimiento más lento que las cepas provistas de este plásmido.

No obstante, el hecho más sobresaliente observado en esta cepa es la producción de síntomas de la enfermedad con niveles similares a otras que contienen el pEA29, tal como se ha comprobado tras su inoculación en plantas de peral, manzano y *Pyracantha*, así como en peras inmaduras. Ello replantea el papel anteriormente propuesto del pEA29 en el grado de virulencia de *E. amylovora* (Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*, 1989; McGhee y Jones, 2000). Estos autores se basaron en el comportamiento de las

cepas curadas de este plásmido, que mostraron retraso en la aparición de síntomas y reducción en su severidad (Falkenstein *et al.*, 1989; Laurent *et al.*, 1989; McGhee y Jones, 2000). Además, la existencia de cepas de *E. amylovora* desprovistas del plásmido pEA29 en la naturaleza pasa inadvertida para uno de los métodos más extendidos en la detección de esta bacteria, como es la PCR basada en secuencias del plásmido de 29 kb (Bereswill *et al.*, 1992; McManus y Jones, 1995a; Llop *et al.*, 2000), lo cual podría tener consecuencias importantes en la epidemiología y la erradicación de la enfermedad. Ello pone de manifiesto la necesidad de disponer de iniciadores fiables para la detección del patógeno del fuego bacteriano y la conveniencia de que su diseño se base, preferentemente, en secuencias conservadas del cromosoma bacteriano de *E. amylovora*.

Otra necesidad que surge a partir de los resultados de esta caracterización es la búsqueda de técnicas adecuadas para diferenciar las cepas españolas de *E. amylovora* en relación con su origen. En el trabajo de McGhee *et al.* (2002a) se analizó la secuencia de la región intergénica espaciadora de los genes ribosómicos 16S y 23S en varias cepas del patógeno del fuego bacteriano. El polimorfismo hallado en dicha región se debía a varias causas, una de las cuales era la presencia o ausencia de un sitio de restricción de *Xba*I, que podría ser el responsable de alguna de las diferencias observadas mediante PFGE (McGhee *et al.*, 2002a). En este sentido, sería interesante profundizar en las bases genéticas de la variabilidad observada mediante esta técnica: la secuenciación del fragmento diferenciador de los patrones Pt3 y Pt4 quizá podría revelar alguna conexión con otras variaciones encontradas entre cepas de *E. amylovora* de distintos orígenes.

Otras preguntas que se plantean a la luz de los resultados de nuestro estudio son: el origen de la cepa IVIA 1614-2a (desprovista del pEA29 de modo natural) la probable

existencia de otras cepas similares y su frecuencia de aparición en la naturaleza, así como el papel del nuevo plásmido de 70 kb identificado en esta cepa de *E. amylovora*. Las respuestas a estos interrogantes, que requieren investigaciones posteriores, contribuirán a mejorar los métodos de detección de este patógeno y, consecuentemente, a prevenir la diseminación del fuego bacteriano. No obstante, las medidas de erradicación aplicadas en España, junto con las prospecciones que se llevan a cabo con el fin de detectar precozmente la enfermedad, han permitido que nuestro país sea declarado como zona protegida y libre de la enfermedad.

Pese a las medidas aplicadas, no sólo existe el peligro de que *E. amylovora* continúe afectando a los cultivos de peral y manzano, sino también al cultivo del níspero, que reporta elevados rendimientos económicos en España. Hasta la fecha aún no ha sido detectado el patógeno en este hospedador en nuestro país, pero la posible propagación de la enfermedad a los cultivos de níspero españoles conllevaría graves pérdidas económicas, en especial para la Comunidad Valenciana.

Los análisis realizados en este trabajo y otros similares han mostrado diferencias genéticas entre las cepas españolas de *E. amylovora*, que son observables mediante distintas técnicas y que permiten clasificarlas en tres grupos, que podrían corresponderse con, al menos, tres introducciones distintas. Sin embargo, es muy probable que en el grupo más numeroso de cepas existan otras diferencias, no apreciables mediante las técnicas utilizadas en el presente estudio. Para poner de manifiesto la existencia de esas posibles diferencias, se requeriría la secuenciación de determinadas zonas no conservadas del genoma de *E. amylovora* o el uso de otras técnicas moleculares.

6.2. Conclusiones

1. La identificación de 130 aislados españoles de *E. amylovora* ha confirmado la validez de dos métodos desarrollados en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, ELISA-DASI (ELISA indirecto de doble *sandwich* de anticuerpos) y *nested*-PCR en un solo tubo, para su identificación específica.
2. La confirmación de la patogenicidad de los aislados españoles de *E. amylovora* se ha demostrado no sólo en frutos inmaduros de especies hospedadoras como pera y níspero, sino también en frutos inmaduros de albaricoque.
3. Los aislados españoles de *E. amylovora* se han mostrado muy homogéneos desde el punto de vista fenotípico, estudiados mediante diversos métodos bioquímicos y fisiológicos: ensayos de patogenicidad, crecimiento en medios generales y selectivos, susceptibilidad a antibióticos de uso agronómico y/o clínico y pruebas miniaturizadas de utilización de carbohidratos.
4. La comparación intraespecífica de los aislados españoles de *E. amylovora*, examinada mediante MSP-PCR, AFLP, RAPD, PCR ribotipado y PFGE, ha revelado asimismo una elevada homogeneidad, sugiriendo una relación clonal entre la mayoría de ellos, aunque también algunas diferencias.

5. La clasificación obtenida por PFGE, junto con los resultados de MSP-PCR, AFLP y RAPD, ha mostrado relación con el origen geográfico de uno de los grupos observados, permitiéndonos formular dos hipótesis:
 - Una de dichas introducciones puede proceder de material vegetal infectado procedente de otros países de Europa.
 - La introducción del fuego bacteriano en España ha sido resultado de, al menos, tres fuentes de inóculo.

6. Los resultados de la identificación y de las caracterizaciones fenotípica y genotípica de la colección de aislados españoles de *E. amylovora* han aportado información sobre la dispersión del fuego bacteriano en España, útil de cara al control integrado de esta enfermedad.

7. Tanto la identificación como la caracterización nos han revelado asimismo la existencia de cepas atípicas (levano negativas, con HR retardada, asintomáticas en frutos inmaduros o brotes de especies hospedadoras y posibles auxótrofos), potencialmente útiles en investigaciones futuras sobre el patógeno que lleven a una mejor comprensión de su fisiología y mecanismos de patogenicidad.

8. La demostración de la existencia de una cepa patógena de *E. amylovora* que carece del pEA29 de forma natural, descarta que dicho plásmido sea ubicuo en esta especie y cuestiona el papel en la virulencia que hasta ahora se le atribuía a este plásmido. Además, este hecho compromete la universalidad de uno de los sistemas más ampliamente utilizados en la detección de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aldridge, P., Metzger, M. y Geider, K. 1997. Genetics of sorbitol metabolism by *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. *Molecular General Genetics* 256:611-619.
- Aldwinckle, H.S. y Beer, S.V. 1978. Fire blight and its control. *Horticultural reviews* 1:423-474.
- Alexandrova, M., Porrini, C., Bazzi, C., Carpana, E., Bigliardi, M. y Sabatini, A.G. 2002. *Erwinia amylovora* longevity in beehives, beehive products and honeybees. *Acta Horticulturae* 590:201-205.
- Alfano, J.R. y Collmer, A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *Journal of Bacteriology* 179:5655-5662.
- Anónimo/Anonymous, 1992. Quarantine procedure. *Erwinia amylovora*. Sampling and test methods. EPPO Bulletin, 22:225-231.
- Anónimo/Anonymous, 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, Volume 43:1-112.
- Anónimo/Anonymous, 2003. Commission Directive 2003/116/EC of 4 December 2003 amending Annexes II, III and V to Council Directive 2000/29/EC as regards the harmful organism *Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. *et al.* Official Journal of the European Union, L321, 6 December 2003, p. 36.
- Ayers, A.R., Ayers, S.B. y Goodman, R.N. 1979. Extracellular polysaccharide of *Erwinia amylovora*: a correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 38:659-666.
- Ayers, S.H., Rupp, P. y Johnson, W.T. 1919. A study of the alkali-forming bacteria in milk. US Department of Agriculture Bulletin, 782.
- Barney, M.A. 1995. *Erwinia amylovora* *hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on hosts plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *European Journal of Plant Pathology* 101:333-340.
- Barney, M.A., Guinebretière, M.H., Marçais, B., Coissac, E., Paulin, J.P. y Laurent, J. 1990. Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP 1430 virulence. *Molecular Microbiology* 4:777-786.
- Bazzi, C. 1992. Present status and new occurrences of fire blight: Italy. Pag. 9 en: Fire Blight Newsletter. T. van der Zwet (ed.), Kearneysville, USDA.
- Bazzi, C., Jock, S., Kim, W.S., López, M.M. y Geider, K. 2000. Tipizzazione molecolare di ceppi di *Erwinia amylovora* mediante analisi PFGE. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2:367-370.
- Bazzi, C., Merighi, M., Zhang, Y., Jock, S., Geider, K. y López, M.M. 1999. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains isolated in Southern Europe by PFGE analysis. *Acta Horticulturae* 489:197-200.
- Beer, S.V., Bocsanczy, A.B., Perna, N.T. y Parkhill, J. 2004. Sequencing the entire genome of *Erwinia amylovora*. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- Beer, S.V., Kim, J.H., Gustafson, H.L., Zumoff, C.H., Momol, M.T., Bogdanove, A.J., Laby, R.J., Tani, A., Tamura, O. y Aldwinckle, H.S. 1996. Characterization of bacteria that cause 'bacterial shoot blight of pear' in Japan. *Acta Horticulturae* 411:179-181.

- Bennet, R.A. y Billing, E. 1978. Capsulation and virulence in *Erwinia amylovora*. *Annals of Applied Biology* 89, 41-45.
- Bereswill, S., Bugert P., Bruchmüller I. y 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., Aldridge, P., Janse, J.D. y Geider, K. 1997. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:215-225.
- Bereswill, S., Jock, S., Bellemann, P. y Geider, K. 1998. Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining with lectin. *Plant Disease* 82:158-164.
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. y Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR-analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3522-3526.
- Berg, C.W. y Gibbins, L.N. 1983. Impairment of substrate oxidation in the cytoplasm membrane of the fire blight organism *Erwinia amylovora* by hydroquinone. *Canadian Journal of Plant Pathology* 5:1-6.
- Billing, E. 1960. An association between capsulation and phage sensitivity in *Erwinia amylovora*. *Nature (London)* 186:819-820.
- Billing, E. 1974. The effect of temperature on the growth of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Journal of Applied Bacteriology* 37:643-648.
- Billing, E. 1985. Avirulent mutants of *Erwinia amylovora*: relationship between phage sensitivity and biological properties. Pags. 617-622 en: *Plant Pathogenic Bacteria*. E.L. Civerolo, A. Collmer, R.E. Davis y A.G. Gillespie (eds.), Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- Billing, E. 1992. Billing's revised system (BRS) for fireblight risk assessment. *EPPO Bulletin* 22:1-102.
- Billing, E. 2000. Fire blight risk assessment. Systems and models. Pags. 293-318 en: *Fire blight. The disease and its causative agent*. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Billing, E., y Garrett, C.M.E. 1980. Phages in the identification of plant pathogenic bacteria. Pags. 319-338 en: *Microbial classification and identification*. M. Goodfellow, R.G. Board (eds.), Academic Press, London, UK.
- Billing, E., Baker, L.A.E., Crosse, J.E. y Garrett, C.M.E. 1961. Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* *Journal of Applied Bacteriology* 24:195-211.
- Billing, E., Crosse, J.E. y Garrett, C.M.E. 1960. Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight of pear. *Plant Pathology* 1960:19-25.
- Biosca, E.G., González, R., López, M.J., Soria, S., Montón, C., Pérez-Laorga, E. y López, M.M. 2003. Isolation and characterization of *Brenneria quercina* causing bark canker and drippy nut of *Quercus* in Spain. *Phytopathology* 93:485-492.
- Biosca, E.G., Marco-Noales, E., Ordax, M. y López, M.M. 2004. Long-term starvation-survival of *Erwinia amylovora* in natural water. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- Bobev, S., Garbeva, P., Hauben, L., Crepel, C. y Maes, M. 1999. Fire blight in Bulgaria – Characteristics of *E. amylovora* isolates. *Acta Horticulturae* 121-126.

- Bogdanove, A.J., Kim, J.F. y Beer, S.V. 2000. Disease-specific genes of *Erwinia amylovora*: keys to understanding pathogenesis and potential targets for disease control. Pags. 163-177 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Bogs, J. y Geider, K. 2000. Molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. *Journal of Bacteriology* 182:5351-5358.
- Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar C. y Geider, K. 1998. Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*, labelled with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology* 88:416-421.
- Boman, J. y Hultmark, D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Annual Review of Microbiology* 41:103-126.
- Bonaterra, A., Mari, M., Casalini, L. y Montesinos, E. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology* 84:93-104.
- Bonn, W.G. 1999. Opening address. *Acta Horticulturae* 489:27-28.
- Bonn, W.G. y van der Zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. Pags. 37-53 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Brennan, J.M., Doohan, F.M., Egan, D., Scanlan, H. y Hayes, D. 2002. Characterization and differentiation of Irish *Erwinia amylovora* isolates. *Journal of Phytopathology* 150:414-422.
- Brenner, D.J. 1984. Family I. *Enterobacteriaceae*. Pags. 408-420 (Vol. 1) en: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. N.R.A. Krieg y J.G. Holt (eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- Brown, E.W., Janisiewicz, W. y van der Zwet, T. 1996. Preliminary phenotypic and genetic differentiation of the fire blight bacterium, *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 411:199-210.
- Bugert, P. y Geider, K. 1995. Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Molecular Microbiology* 15:917-933.
- Burrill, T.J. 1883. New species of *Micrococcus*. *Am. Naturalist* 17:319.
- Cabrefiga, J. 2004. Fire blight (*Erwinia amylovora*) of rosaceous plants. Pathogen virulence and selection and characterization of biological control agents. Tesis Doctoral, Universitat de Girona.
- Calzolari, A., Peddes, P., Mazzucchi, U., Mori, P. y Garzena, C. 1982. Occurrence of *Erwinia amylovora* in buds of asymptomatic apple plants in commerce. *Phytopathologische Zeitschrift* 103:156-162.
- Cambra, M., Olmos, A., Gorris, M.T., Durán, N., Román, M.P., Camarasa, E. y Dasí, M.A. 1996. Sensitive detection of plant pathogen by using immobilized targets in tissue imprinted membranes. Abstracts of 4th International Symposium EFPP, 9-12.09.1996 Bonn, Germany.
- Cambra, M.A., Palacio, A., González, M.L. y Fortanete, J. 2004. Fire blight in Aragón (Spain): efficacy of containment measures. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- Cassagne, H. 1966. Milieux spéciaux et produits divers. Pags. 59-83 en: *Milieux de culture et leurs applications*. Éditions de la Tourelle, St. Mandé, Seine, France.

Cesbron, S., Brisset, M.N., Barny, M.A., Tharaud, M. y Paulin, J.P. 2004. The sigma factor *hrpL* negatively affects flagella synthesis in *Erwinia amylovora*. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.

Chase, A.R. 1993. Efficacy of fosetyl-AI for control of some bacterial diseases on ornamentals. *Plant Disease* 77:771-776.

Chatterjee, A.K. y Gibbins, L.N. 1971. Induction of nonpigmented variants of *Erwinia herbicola* by incubation at supraoptimal temperatures. *Journal of Bacteriology* 105:107-112.

Chatterjee, A.K. y Starr, M.P. Genetics of *Erwinia* species. 1980. *Annual Review of Microbiology*, 34:645.

Chatterjee, A.K., Buss, R.F., y Starr, M.P. 1977. Unusual susceptibility of *Erwinia amylovora* to antibacterial agents in relation to the barrier function of its cell envelope. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11:897-905.

Chiou, C.S. y Jones, A.L. 1991. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 81:710-714.

Chiou, C.S. y Jones, A.L. 1993. Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 175:732-740.

Chiou, C.S. y Jones, A.L. 1995. Expresión and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*. *Gene* 152:47-51.

Civerolo, E.L. 1990. Bacteriophages. Pags. 205-213 en: *Methods in Phytobacteriology*. Z. Klement, K. Rudolph y D.C. Sands (eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest.

Curto, M. G., 1992. Bilancio delle avversità in Emilia Romagna. *Terra e Vita* 33:156-162.

Dellagi, A., Brisset, M.N., Paulin, J.P. y Expert, D. 1998. Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:734-742.

Düring, K. 1996. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. *Molecular Breeding* 2:297-305.

Duron, M., Paulin, J.P. y Brisset, M.N. 1987. Use of *in vitro* propagated plant material for rating fire blight susceptibility. *Acta Horticulturae* 217:317-324.

Dye, D.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 1. The '*amylovora*' group. *New Zealand Journal of Science* 11:590-607.

Dye, D.W. 1969a. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 2. The '*carotovora*' group. *New Zealand Journal of Science* 12:81-97.

Dye, D.W. 1969b. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 3. The '*herbicola*' group. *New Zealand Journal of Science* 12:223-236.

Dye, D.W. 1969c. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 4. Atypical erwinias. *New Zealand Journal of Science* 12:833-839.

Eastgate, J.A. 2000. *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease. *Molecular Plant Pathology* 1:325-329.

- Epton, H.A.S., Wilson, M., Nicholson, S.L. y Sigee, D.C. 1994. Biological control of *Erwinia amylovora* with *Erwinia herbicola*. Pags. 335-352 en: Ecology of plant pathogens. J.P. Blakeman y B. Williamson (eds.), CAB International Biddles, Guilford.
- Expert, D., Dellagi, A. y Kachadourian, R. 2000. Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferrioxamine E, the main siderophore of *Erwinia amylovora*. Pags. 179-195 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Falkenstein, H., Bellemann, P., Walter, S., Zeller, W. y Geider, K. 1988. Identification of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. Applied and Environmental Microbiology 54:2798-2802.
- Falkenstein, H., Zeller, W. y Geider, K. 1989. The 29 kb plasmid common in strains of *Erwinia amylovora*, modulates development of fire blight symptoms. Journal of General Microbiology 135:2643-2650.
- Feistner, G.J. 1988. (1)-2,5-Dihydrophenylalanine from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Phytochemistry 27:3417-3422.
- Feistner, G.J. y Staub, C.M. 1986. 6-Thioguanine from *Erwinia amylovora*. Current Microbiology 13:95-101.
- Feistner, G.J., Stahl, D.C. y Gabrik, A.H. 1993. Proferrioxamine siderophores of *Erwinia amylovora*. A capillary liquid chromatographic/electrospray tandem mass spectrometry study. Organic Mass Spectrometry 28:163-175.
- Geider, K. 2000. Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. Pags. 117-140 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Geier, G. y Geider, K. 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Physiological Molecular Plant Pathology 42:387-404.
- Gill, J.J., Svircev, A.M., Smith, R. y Castle, A.J. 2003. Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. Applied and Environmental Microbiology 69:2133-2138.
- Gorris, M.T., Camarasa, E., López, M.M., Paulin, J.P., Chartier, R. y 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. y 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.
- Gross, M., Geier, G., Rudolph, K. y Geider, K. 1992. Levan and levansucrase synthesized by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Physiological and Molecular Plant Pathology 40:371-381.
- Gugerli, P. y Gouk, S.C. 1994. Identification of *Erwinia amylovora* with monoclonal antibodies. Pags. 325-330 en: Plant Pathogenic Bacteria, Versailles, France. M. Lemattre, S. Freigoun, K. Rudolph y J.G. Swings (eds.). Les Colloques 66, INRA-ORSTOM, Paris.
- Guilford, P.J., Taylor, R.K., Clark, R.G., Hale, C.N. y 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. y Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Systematic and applied Microbiology 21:384-397.

Hickey, K.D. y van der Zwet, T. 1999. Observations of presence of endophytic *Erwinia amylovora* bacteria in symptomless apple tissues in the orchard. *Acta Horticulturae* 489:453-458.

Hildebrand, D.C. y Schroth, M.N. 1963. Relation of arbutin-hydroquinone in pear blossoms to invasion by *Erwinia amylovora*. *Nature* 197:153.

Hildebrand, D.C., Schroth, M.N. y Sands, D.C. 1988. Pseudomonas. Pags. 60-80 en: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. N.W. Schaad (ed.), APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9ª edición, 787 pags. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

Hutschemackers, J., Verhoyen, M. y Bazin, H. 1987. Production of rat monoclonal antibodies specific to *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 217:71-76.

Ishimaru, C. y Klos, E.J. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* 74:1342-1345.

Jabrane, A., Sabri, A., Compere, P., Jacques, P., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., y Thonart, P. 2002. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5704-5710.

James, D.J., Passey, A.J., Webster, A.D., Barbara, D.J., Viss, P., Dandekar, A.M. y Uratsu, S. 1993. Transgenic apples and strawberries: advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. *Acta Horticulturae* 336:179-184.

Jeng, R.S., Beliaeva, L., Hubbes, M., Svircev, A.M. y Myers, A.L. 1999. The use of 16S and 16S-23S rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 489:49-54.

Jin, S. y Sato, N. 2003. Benzoquinone, the substance essential for antibacterial activity in aqueous extracts from succulent young shoots of the pear *Pyrus* spp. *Phytochemistry* 62:101-107.

Jock, S. y Geider, K. 2004. Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from North America and of two Asian pear pathogens by analyses of PFGE patterns and *hrpN* genes. *Environmental Microbiology* 6:480-490.

Jock, S., Donat, V., López, M.M., Bazzi, C. y 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.

Jock, S., Jacob, T., Kim, W.S., Hildebrand, M., Vosberg, H.P. y Geider, K. 2003. Instability of short-sequence DNA repeats of pear pathogenic *Erwinia* strains from Japan and *Erwinia amylovora* fruit tree and raspberry strains. *Molecular Genetics and Genomics* 268:739-749.

Jock, S., Kim, W.S., Bazzi, C., López, M.M. y Geider, K. 2001. Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from Europe and the Mediterranean region. Pags. 121-123 en: *Proceedings of the 10th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria 2000*. S. De Boer (ed.).

Jock, S., Rodoni, B., Gillings, M., Kim, W.S., Copes, C., Merriman, P. y Geider, K. 2000. Screening of ornamental plants from the Botanic Gardens of Melbourne and Adelaide for the occurrence of *Erwinia amylovora*. *Australasian Plant Pathology* 29:120-128.

Johnson, K.B. y Stockwell, O. 2000. Biological control of fire blight. Pags. 319-337 en: *Fire blight. The disease and its causative agent*. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.

Jones, A.L. y Aldwinckle, H.S. 1990. *Compendium of apple and pear diseases*. American Phytopathological Society Press.

- Jones, A.L. y Geider, K. 2001. *Erwinia amylovora* group. Pags. 40-55 en: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. N.W. Schaad, J.B. Jones y W. Chun (eds.), APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Jones, A.L. y Schnabel, E.L. 1998. Streptomycin and oxytetracycline resistance determinants detected among bacteria from Michigan apple orchards and their potential importance. *Acta Horticulturae* 489:673.
- Jones, A.L. y Schnabel, E.L. 2000. The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*. Pags. 235-251 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Jones, A.L., Chiou, C.S. y McManus, P.S. 1996. Epidemiology and genetic diversity of streptomycin resistance in *Erwinia amylovora* in Michigan. *Acta Horticulturae* 411:327-330.
- Kachadourian, R., Dellagi, A., Laurent, J., Bricard, L., Kunesch, G. y Expert, D. 1996. Desferrioxamine-dependent iron transport in *Erwinia amylovora* CFBP 1430: cloning of the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR. *BioMetals* 9:143-150.
- Keck, M., Chartier, R., Zislavsky, W., Lecomte, P. y Paulin, J.P. 1995. Heat treatment of plant propagation material for the control of fire blight. *Plant Pathology* 44:124-129.
- Keck, M., Hevesi, M., Ruppitsch, W., Stöger, A. y Richter, S. 2002. Spread of fire blight in Austria and Hungary – variability of *Erwinia amylovora* strains. *Plant Protection Science*, 38:00-00.
- Keil, H.L. y van der Zwet, T. 1972. Recovery of *Erwinia amylovora* from symptomless stems and shoots of Jonathan apple and Bartlett pear trees. *Phytopathology* 62:39-42.
- Kerppola, T.K., Serwold-Davis, T., Gross, D.C. y Kahn, M.L. 1987. Effect of increased β -glucosidase activity on virulence of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 53:677-682.
- Kim, J.F. y Beer, S.V. 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *Journal of Bacteriology* 180:5203-5210.
- Kim, J.F. y Beer, S.V. 2000. *hrp* genes and harpins of *Erwinia amylovora*: a decade of discovery. Pags. 141-161 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Kim, W.S. y Geider, K. 1999. Analysis of variable short-sequence DNA repeats on the 29-kb plasmid of *Erwinia amylovora* strains. *European Journal of Plant Pathology* 105:703-713.
- Kim, W.S. y Geider, K. 2000. Characterization of a viral EPS-depolymerase, a potential tool for control of fire blight. *Phytopathology* 90:1263-1268.
- Kim, J.F., Beer, S.V., Zumoff, C.H., Laby, R.J., Gustafson, H.L., Aldwinckle, H.S. y Tanii, A. 1996. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different hosts and geographical areas. *Acta Horticulturae* 411:183-185.
- Kim, W.S., Hildebrand, M., Jock, S. y Geider, K. 2001b. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology/SGM* 147:2951-2959.
- Kim, W.S., Jock, S., Paulin, J.P., Rhim, S.L. y Geider, K. 2001a. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian Pear Pathogen. *Plant Disease* 85:1183-1188.
- Kim, W.S., Rhim, S.L., Volksch, B., Gardan, L., Paulin, J.P., Jock, S. y Geider, K. 1999. Characterization of a new *Erwinia* species affecting Asian pear trees. *Acta Horticulturae* 489:201-205.

- Kim, W.S., Salm, H. y Geider, K. 2004. Expression of bacteriophage Φ Ea1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 150:2707-2714.
- Kim, J.H., Zumoff, C.H., Tanii, A., Laby, R.J. y Beer, S.V. 1995. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different hosts and geographical areas. *Phytopathology* 85:1148.
- King, E.O., Ward, M. y Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 44:401-407.
- Klement, Z. 1982. Hypersensitivity. Pags. 149-177 en: *Phytopatogenic Prokaryotes*. M.S. Mount y G.S. Lacy (eds.), Academic Press, New York.
- Kritzman, G., Shwartz, H., Marcus, R., Manulis, S., Klietman, F., Oppenheim, D., Zilberstaine, M. y Shtienberg, D. 2003. Testing a rapid diagnostic medium for *Erwinia amylovora* and development of a procedure for sampling blossoms in pear orchards. *Phytopathology* 93:931-940.
- Laby, R.J. y Beer, S.V. 1992. Hybridization and functional complementation of the *hrp* gene cluster from *Erwinia amylovora* strain Ea 321 with DNA of the other bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5:412-419.
- Laurent, J., Barny, M.A., Kotoujansky, A., Dufriche, P. y Vanneste, J.L. 1989. Characterization of an ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:160-164.
- Lecomte, P., Manceau, C., Paulin, J.P. y Keck, M. 1997. Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible for an outbreak in Central Europe. *European Journal of Plant Pathology* 103:91-98.
- Lecomte, P., Paulin, J.P., Audusseau, C. y Huberdeau, D. 1996. Feu bactérien et nécrose de porte-greffe du pommier: Responsabilité confirmée. *Phytoma* 486:38-40.
- Lelliot, R.A. 1967. The diagnosis of fire blight (*Erwinia amylovora*) and some diseases caused by *Pseudomonas syringae*. *EPPO Bulletin* 45:27-34.
- Lelliot, R.A. y Dickey, R.S. 1984. Genus VII. *Erwinia*. Pags. 469-476 en: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. N.R. Krieg y J.G. Holt (eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- Lelliot, R.A. y Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. British Society for Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications.
- Lespinasse, Y. y Aldwinckle, H.S. 2000. Breeding for resistance to fire blight. Pags. 253-273 en: *Fire blight. The disease and its causative agent*. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Lin, C.P., Chen, T.A., Wells, J.M. y van der Zwet, T. 1987. Identification and detection of *Erwinia amylovora* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* 77:376-380.
- Lindow, S.E., McGourty, G. y Elkins, R. 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury. *Phytopathology* 86:841-848.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. y 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. y 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., Montesinos, E., Palomo, J.L. y López, M.M. 2004. A fully virulent *Erwinia amylovora* strain without plasmid pEA29, isolated in a nursery from hawthorn. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- Loper, J.E., Henkels, M.D., Roberts, R.G., Grove, G.G., Willett, M.J., y Smith, T.J. 1991. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State. *Plant Disease* 75:287-290.
- López, M.M. 2004. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants. Diagnosis on *Erwinia amylovora*. EPPO, <http://www.csl.gov.uk/science/organ/ph/diagpro/>.
- López, M.M. y Cambra, M. 1996. Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas. Págs. 587-625 en: *Patología Vegetal*. G. Llácer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello (eds.), Sociedad Española de Fitopatología.
- López, M.M. y Montesinos, E. 1996. Enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas. Cap. 18 en: *Patología Vegetal*. G. Llácer *et al.* (eds.), SEF-Agropubli.
- López, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cambra, M., Roselló, M., Berra, D., Borruel, M., Plaza, B., García, P. y Palomo, J.L. 1999a. Fire blight in Spain: situation and monitoring. *Acta Horticulturae* 489:187-191.
- López, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B. y Cambra, M. 1997. Selective enrichment improves isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. Pags. 117-121 en: *Diagnosis and Identification of plant pathogens*. H.W. Dehne *et al.* (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- López, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Peñalver, J. y Cambra, M. 2002b. Standardization of diagnostic protocols (Diagpro) for *Erwinia amylovora* in the European Union. *Acta Horticulturae* 590:69-72.
- López, M.M., Keck, M., Llop, P., Gorris, M.T., Peñalver, J., Donat, V. y Cambra, M. 2004. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- López, M.M., Llop, P., Donat, V., Peñalver, J., Rico, A., Ortiz, A., Murillo, J., Llorente, I., Badosa, E. y Montesinos, E. 2002a. Chronicle of a disease foretold (that advances slowly): the 2001 Spanish situation. *Acta Horticulturae* 590:35-38.
- López, M.M., Montesinos, E., Lecomte, P. y 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. y Scortichini, M. 1999b. Problemática de las infecciones latentes de *Agrobacterium* spp., *Erwinia amylovora* y *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en viveros de frutales. *Phytoma España* 114:142-145.
- López, M.M., Noval, C., Palazón, E. y Sampayo, M., 1987. El fuego bacteriano. *Erwinia amylovora*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 72 pp.
- Louws, F.J., Fullbright, D.W., Stephens, C.T. y deBruijn, F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2286-2295.
- Ma, W., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C.K., Mukherjee, A. y Chatterjee, A.K. 2001. Molecular characterization of global regulatory RNA species that control pathogenicity factors in *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. *Journal of Bacteriology* 183:1870-80.

- Maes, M., Garbeva, P. y 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.
- Malnoy, M., Borejsza-Wysocka, E.E., Jin, Q.L., He, S.Y. y Aldwinckle, H.S. 2004a. Transgenic apple lines over-expressing the apple gene MpNPR1 have increased resistance to fire blight. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- Malnoy, M., Faize, M., Venisse, J.S., Geider, K. y Chevreau, E. 2004b. Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. *Plant Cell Reports (Issue Online)*.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Manulis, S., Kleitman, F., Dror, O., David, I. y Zutra, D. 1998. Characterization of the *Erwinia amylovora* population in Israel. *Phytoparasitica* 26:39-46.
- Martin, F., Costa, G., Delaruelle, C. y Diez, J. 1998. Genomic fingerprinting of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR. Pags. 463-474 en: *Mycorrhiza manual*. A. Varma (ed.), Springer, Berlin.
- Matushek, M.G., Bonten, M.J.M. y Hayden, M.K. 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 39:2598-2600.
- Maxon-Stein, K., McGhee, G.C., Smith, J.J., Jones, A.L. y 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*. Istituto di Patologia Vegetale-Università degli Studi di Bologna.
- Mazzucchi, U. 1994. The fireblight monitoring network in northern Italy: origin and development. *EPPO Bulletin* 24:783-791.
- Méndez-Álvarez, S., Pavón, V., Esteve, I., Guerrero, R. y Gaju, R. 1995. Analysis of bacterial genomes by pulsed-field gel electrophoresis. *Microbiología SEM* 11:323-336.
- McGhee, G.C. y Jones, A.L. 2000. Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4897-4907.
- McGhee, G.C., Foster, G.C. y Jones, A.L. 2002a. Genetic diversity among *Erwinia amylovora*'s ubiquitous plasmid pEA29. *Acta Horticulturae* 590:413-421.
- McGhee, G.C., Schnabel, E.L., Maxson-Stein, K., Jones, B., Stromberg, V.K., Lacy, G.H. y Jones, A.L. 2002b. Relatedness of chromosomal and plasmid DNAs of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:6182-6192.
- McIntyre, J.L., Huber, D., Kuc, J. y Williams, E.B. 1975. Aminopeptidase profiles of virulent and avirulent *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola*. *Phytopathology* 65:1206-1212.
- McLaughlin, R.J., Chen, T.A. y 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. y Jones, A.L. 1994a. Epidemiology and genetic analysis of streptomycin resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology* 84:627-633.
- McManus, P.S. y Jones, A.L. 1994b. Role of wind, driven rain, aerosols and contaminated budwood in incidence and spatial pattern of fire blight in an apple nursery. *Plant Disease* 78:1059-1066.

- McManus, P.S. y Jones, A.L. 1995a. Detection of *Erwinia amylovora* by nested-PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. *Phytopathology* 85:618-623.
- McManus, P.S. y Jones, A.L. 1995b. Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopathology* 85:1547-1553.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W. y Jones, A.L. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 40:443-65.
- Mergaert, J., Verdonck, L., Kersters, K., Swings, J., Boeufgras, J.M. y De Ley, J. 1984. Numerical taxonomy of *Erwinia* species using API systems. *Journal of General Microbiology* 130:1893-1910.
- Merighi, M., Sandrini, A., Landini, S., Ghini, S., Girotti, S., Malaguti, S. y Bazzi, C. 2000. Chemiluminescent and colorimetric detection of *Erwinia amylovora* by immunoenzymatic determination of PCR amplicons from plasmid pEA29. *Plant Disease* 84:49-54.
- Miller, T.D. y Schroth, M.N. 1972. Monitoring of epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pears with selective medium. *Phytopathology* 62:1175-1182.
- Mohan, S.K. y Thomson, S.V. 1996. An outbreak of fire blight in plums. *Acta Horticulturae* 411:73-96.
- Molina, L., Défago, G. y Duffy, B. 2004. Autoinduction in *Erwinia amylovora*. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- Moller, W.J., Schroth, M.N. y Thomson, S.V. 1981. The scenario of fire blight and streptomycin resistance. *Plant Disease* 65:563-568.
- Momol, M.T. y Aldwinckle, H.S. 2000. Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. Pags. 55-72 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Momol, E.A., Momol, M.T. y Hacıoglu, E. 1994. A PCR approach for early and specific detection of *Erwinia amylovora* in monitoring studies in Turkey. *Phytopathology* 84:1087.
- Momol, M.T., Momol, E.A., Lamboy, W.F., Norelli, J.L., Beer, S.V. y Aldwinckle, H.S. 1997. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified poly-morphic DNA fragments (RAPDs). *Journal of Applied Microbiology* 82:389-398.
- Momol, E.A., Momol, M.T., Norelli, J.L., Beer, S.V., Burr, T.J. y Aldwinckle, H.S. 1999. Relatedness of *Erwinia amylovora* strains based on amplified 16S-23S ribosomal DNA restriction enzyme analysis – ARDREA. *Acta Horticulturae* 489:55-59.
- Montesinos, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* 6:245-52.
- Montesinos, E. y López, M.M. 1998. El fuego bacteriano de las rosáceas. Situación actual y perspectivas de control. *Phytoma España* 104:24-36.
- Montesinos, E. y López, M.M. 2000. Fuego Bacteriano (*Erwinia amylovora*). pp. 37-40. *Enfermedades de los frutales de pepita y hueso*. Ed. Mundi-Prensa. ISBN: 84-7114-916-8.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Francés, J., Alemany, J., Llorente, I. y Moragrega, C. 2002. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology* 5:169-75.
- Montesinos, E., López, M.M. y Murillo, J. 1999. Importancia y situación actual del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en España. *Epidemiología, daños y prevención*. *Phytoma España* 114:128-136.

- Mosch, J., Mende, A., Zeller, W., Rieck, M. y Ullrich, W. 1993. Plant extracts with a resistance induction effect against fireblight (*Erwinia amylovora*). *Acta Horticulturae* 338:389-395.
- Mourgues, F., Chevreau, E., Lambert, C. y De Bondt, A. 1996. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Reports* 16:245-249.
- Norelli, J.L. y Aldwinckle, H.S. 2000. Transgenic varieties and rootstocks resistant to fire blight. Pags. 275-292 en: *Fire blight. The disease and its causative agent*. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Norelli, J.L. y Miller, S.L. 2004. Using prohexadione-calcium (Apogee) to control fire blight in young apple trees. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S. y Beer, S.V. 1984. Differential host x pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 74:136-139.
- Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S. y Beer, S.V. 1986. Differential susceptibility of *Malus* spp. cultivars Robusta 5, Novole, and Ottawa 523 to *Erwinia amylovora*. *Plant Disease* 70:1017-1019.
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M.M. y Biosca, E.G. 2004. Copper induces the viable but nonculturable (VBNC) state in *Erwinia amylovora*. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.
- Palmer, E.L., Teviotdale, B.L. y Jones, A.L. 1997. A relative of the broad host range plasmid RSF1010 detected in *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4604-4607.
- Paulin, J.P. 2000. *Erwinia amylovora*: general characteristics. Pags. 87-115 en: *Fire blight. The disease and its causative agent*. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Paulin, J.P., y Lachaud, G. 1978. Fire blight situation in France: August 78. Pags. 519-521 en: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers.
- Paulin, J.P. y Primault, J. 1993. Feu bactérien et culture du pommier à cidre. INRA-CFC, Paris 60 pp.
- Paulin, J.P. y Samson, R. 1973. Le feu bactérien en France II. Caracteres des souches d'*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, 1920 isolées du foyer Franco-Belge. *Annales de Phytopathologie* 5:389-397.
- Paulin, J.P., Jacquart-Romon, C. y Lecomte, P. 1994. El programa Parafeu. Una herramienta para luchar racionalmente contra el fuego bacteriano. *Phytoma España* 61:44-48.
- Perombelon, M.C.M. 1992. The genus *Erwinia*. Pags. 2899-2921 en: *A handbook of the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 2^a edición. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K.H. Schleifer (eds.), Springer Verlag, New York.
- Perombelon, M.C.M. 1994. Diversity in erwinias as plant pathogens. Pags. 113-128 en: *Plant Pathogenic Bacteria*, Versailles, France. M. Lemattre, S. Freigoun, K. Rudolph y J.G. Swings (eds.). *Les Colloques* 66, INRA-ORSTOM, Paris.
- Pezzella, C., Ricci, A., DiGiannatale, E., Luzzi, I. y Carattoli, A. 2004. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:903-908.
- Psallidas, P.G. y Tsiantos, J. 2000. Chemical control of fire blight. Pags. 199-234 en: *Fire blight. The disease and its causative agent*. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Ray, T.C., Smith, A.R.W., Carter, K.J. y Hignett, R.C. 1986. Composition of lipopolysaccharides from four strains of *Erwinia amylovora*. *Journal of General Microbiology* 132:3159-3167.
- Raymundo, A.K. y Ries, S.M. 1980a. Motility of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 70:1062-1065.
- Raymundo, A.K. y Ries, S.M. 1980b. Chemotaxis of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 70:1066-1069.
- Reed, K.C. y Mann, D.A. 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Research* 13:7207-7221.
- Rico, A., Ortiz-Barredo, A., Ritter, E. y Murillo, J. 2004. Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology* 96:302-310.
- Rijckaert, C. 1994. Taxonomische studie van de *Erwinia amylovora* groep (DYE 1968) PhD thesis, University Gent, Belgium.
- Roselló, M., Tarín, A., Llop, P., Gorris, M.T., Donat, V., Peñalver, J., García Vidal, S., Gardan, L., Chartier, R., Paulin, J.P. y López, M.M. 2002. Characterization of an *Erwinia* sp. isolated from necrotic pear blossoms in Valencia, Spain. *Acta Horticulturae* 590:139-142.
- Ruppitsch, W., Stöger, A.R. y Keck, M. 2004. Stability of short sequence repeats and their application for the characterization of *Erwinia amylovora* strains. *FEMS Microbiology Letters* 234:1-8.
- Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J. y Potempa, J. 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 41:1801-1804.
- Samson, R. 1972. Hétérogénéité des antigènes thermostables de surface chez *Erwinia amylovora*. *Annales de Phytopathologie* 4:157-163.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. Pags. 199-204 en: *Methods in Phytobacteriology*. Z. Klement, K. Rudolph y D.C. Sands (eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Savelkoul, P.H.M., Aarts, H.J.M., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L.W., Schouls, L. y Lenstra, J.A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3083-3091.
- Saygili, H. y Üstün, N. 1996. Studies on effectiveness of some chemicals to fire blight pathogen *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* *Acta Horticulturae* 411:331-335.
- Schaad, N.W. (ed.), 1988. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press.
- Schnabel, E.L. y Jones, A.L. 1998. Instability of a pEA29 marker in *Erwinia amylovora* previously used for strain classification. *Plant Disease* 82:1334-1336.
- Schnabel, E.L. y Jones, A.L. 2001. Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:59-64.
- Schroth, M.N., y Hildebrand, D.C. 1998. *Erwinia*. Pags. 37-59 en: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. N.W. Schaad (ed.), APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Schwartz, D.C. y Cantor, C. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75.

Schwartz, T., Bernhard, F., Theiler, R. y Geider, K. 1991. Diversity of the fire blight pathogen in production of dihydrophenylalanine, a virulence factor of some *Erwinia amylovora* strains. *Phytopathology* 81:873-878.

Scortichini, M. y Rossi, M.P. 1993. *In vitro* behavior of *Erwinia amylovora* towards some natural products showing bactericidal activity. *Acta Horticulturae* 338:191-198.

Seemüller, E.A. y Beer, S.V. 1976. Absence of cell wall polysaccharide degradation by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 66:433-436.

Seemüller, E.A. y Beer, S.V. 1977. Isolation and partial characterization of two neutral proteases of *Erwinia amylovora*. *Phytopathologische Zeitschrift* 90:12-21.

Shtienberg, D., Zilberstaine, M., Oppenheim, D., Herzog, Z., Manulis, S., Shwartz H. y Kritzman, G. 2001. Efficacy of oxolinic acid and other bactericides in suppression of *Erwinia amylovora* in pear orchards in Israel. *Phytoparasitica* 29:143-154.

Slade, M.B. y Tiffin, A.I. 1984. Biochemical and serological characterization of *Erwinia*. Pags. 228-293 (vol. 15) en: *Methods in Microbiology*. T. Bergon (ed.), Academic Press, London.

Sobiczewski, P., Deckers, T. y Pulawska, J. 1997. Fire blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. P. Sobiczewski, T. Deckers, J. Pulawska (eds.), Phare the EUROPEAN UNION'S. Phare Partnership and Institution Building programme.

Starr, M.P. 1981. The genus *Erwinia*. Pags. 1260-1271 (vol. II) en: *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Ballows y H.G. Schlegel (eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Toronto.

Starr, M.P. y Chatterjee, A.K. 1972. The genus *Erwinia*: enterobacteria pathogenic to plants and animals. *Annual Review of Microbiology* 26:389-426.

Starr, M.P. y Mandel, M. 1950. The nutrition of phytopathogenic bacteria. IV. Minimal nutritive requirements of the genus *Erwinia*. *Journal of Bacteriology* 60:669-672.

Starr, M.P., Cardone, C. y Folsom, D. 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopatology* 41:915-919.

Steinberger, E.M. y Beer, S.V. 1988. Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:135-144.

Steinberger, E.M., Cheng, G.Y. y Beer, S.V. 1990. Characterization of a 56-kb plasmid of *Erwinia amylovora* Ea322: its noninvolvement in pathogenicity. *Plasmid* 24:12-24.

Steiner, P.W. 1989. Predicting canker, shoot and trauma blight phases of apple fire blight epidemics using MARYBLTY model. *Acta Horticulturae* 273:149-158.

Sundin, G.W., McGhee, G.C., Foster, G.C. y Jones, A.L. 2004. Genetic analysis of the ubiquitous plasmid pEA29 and two new *Erwinia amylovora* plasmids. Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, July 2004.

Thibault, B. y Le Lezec, 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.

Thomson, S.V. 1986. The role of stigma in fire blight infection. *Phytopathology* 76:476-482.

Thomson, S.V. 2000. Epidemiology of fire blight. Pags. 9-36 en: *Fire blight. The disease and its causative agent*. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Thomson, S.V., Gouk, S.C., y Paulin, J.P. 1999. Efficacy of Bion® (Actigard®) to control fire blight in pear and apple orchards in USA, New Zealand and France. *Acta Horticulturae* 489:589-595.
- van der Zwet, T. 1993. Worldwide spread and present distribution of fire blight – an update. *Acta Horticulturae* 338:29-31.
- van der Zwet, T. 1996. Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* 411:7-8.
- van der Zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. Pags. 37-54 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- van der Zwet, T. 2002. Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* 590:33-34.
- van der Zwet, T. y Beer, S.V. 1995. Fire Blight. Its nature, prevention and control: A practical guide to integrated disease management. U.S. Department of Agriculture. Bulletin no. 631, 83 pp.
- van der Zwet, T. y Bonn, W.G. 1999. Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* 489:167-168.
- van der Zwet, T. y Keil, H.L. 1979. Fire blight – a bacterial disease of rosaceous plants. USDA. Agriculture Handbook 510, 200 pp.
- van der Zwet, T. y Walter, J. 1996. Presence of *Erwinia amylovora* in apparently healthy nursery propagating material. *Acta Horticulturae* 411:127-130.
- van der Zwet, T. y Wells, J.M. 1993. Application of fatty acid class analyses for the detection and identification of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 338:233.
- van der Zwet, T., Bell, R.L. y Stroo, H. 1982. Long distance dissemination of *Erwinia amylovora* as resident bacteria in apparently healthy pear budwood (Abstr.). *Phytopathology* 72:711.
- Van Laere, O., De Wall, L. y De Mey, J. 1985. Immuno gold staining (IGS) and immuno gold silver staining (IGSS) for the identification of the plant pathogenic bacterium *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.* *Histochemistry* 83:397-399.
- Vanneste, J.L. 1995. *Erwinia amylovora*. Pags. 21-41 (vol. 1) en: Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular basis. U.S. Singh, R.P. Singh y K. Kohmoto (eds.), Pergamon Press, Oxford and London, UK.
- Vanneste, J.L. 1996. Honey bees and epiphytic bacteria to control fire blight, a bacterial disease of apple and pear. *Biocontrol News and Information* 17:67-78.
- Vanneste, J.L. 2000. What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? Pags. 1-6 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Vanneste, J.L. y Boyd, R.J. 2002. Inhibition of *Erwinia amylovora* and potential antagonistic bacteria by essential oils and natural compounds. *Acta Horticulturae* 590:315-317.
- Vanneste, J.L. y Eden-Green, S. 2000. Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. Pags. 73-83 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Vanneste, J.L. y Paulin, J.P. 1990. Isolation of lytic phages of *E. amylovora*. *Acta Horticulturae* 273:95.
- Vanneste, J.L., y Voyle, M.D. 1998. Genetic basis of streptomycin resistance in pathogenic and epiphytic bacteria isolated in apple orchards in New Zealand. *Acta Horticulturae* 489:671-672.

- Vanneste, J.L., Paulin, J.P. y Expert, D. 1990. Bacteriophage Mu as a genetic tool to study *Erwinia amylovora* pathogenicity and hypersensitive reaction on tobacco. *Journal of Bacteriology* 172:932-941.
- Vantomme, R., Rickjaert, C., Swings, J. y De Ley, J. 1986. Characterization of further *Erwinia amylovora* strains and the application of the API 20E system in diagnosis. *Journal of Phytopathology* 117:34-42.
- Vantomme, R., Swings, J., Goor, M., Kersters, K. y De Ley, J. 1982. Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoretic characterization of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. *Phytopatologische Zeitschrift* 103: 349-360.
- Venisse, J.S., Barny, M.A., Paulin, J.P. y Brisset, M.N. 2003. Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. *FEBS Letters* 537:198-202.
- Verdonck, L., Mergaert, J., Rickjaert, C., Swings, J., Kersters, K. y De Ley, J. 1987. Genus *Erwinia*: numerical analysis of phenotypic features. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:4-18.
- Versalovic, J., Koeth, T. y Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic Acid Research* 19:6823-6831.
- Vimont, S., Poirel, L., Naas, T. y Nordmann, P. 2002. Identification of a chromosome-borne expanded-spectrum class A β -lactamase from *Erwinia persicina*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46:3401-3405.
- Vos, P., Hogers, R., Blaker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., y Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Waldee, E.L. 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State Coll. J. Sci.* 19:435-484.
- Wei, Z. y Beer, S.V. 1995. *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of σ factors. *Journal of Bacteriology* 177:6201-6210.
- Wei, Z., Kim, J.F. y Beer, S.V. 2000. Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Molecular plant-microbe interactions* 13:1251-1262.
- Wei, Z., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. y Beer, S.V. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85-88.
- Wei, Z., Qiu, D., Kropp, M.J. y Schading, R.L. 1998. Harpin, an HR elicitor, activates both defense and growth systems in many commercially important crops. *Phytopathology* 88:S96.
- Wells, J.M., van der Zwet, T. y Hale, C.N. 1994. Differentiation of *Erwinia* species in the "Amylovora" group by class analysis of cellular fatty acids. *Journal of Phytopathology* 140:31-38.
- Welsh, J. y McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E. *et al.* 1920. The families and genera of the bacteria; *Erwineae*. *Journal of Bacteriology* 5:209.

Wright, S.A., Zumoff, C.H., Schneider, L. y Beer, S.V. 2001. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology 67:284-292.

Zhang, Y. y Geider, K. 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed-field gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 63:4421-4426.

Zhang, Y., Bak, D.D., Heid, H. y Geider, K. 1999. Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. Journal of Molecular Biology 289:1239-1251.

Zhang, Y., Merighi, M., Bazzi, C. y Geider, K. 1998. Genomic analysis by pulsed-field gel electrophoresis of *Erwinia amylovora* strains from the Mediterranean region including Italy. Journal of Plant Pathology 80:225-232.

Zhou, C., Yang, Y. y Jong, A.Y. 1990. Mini-prep in ten minutes. Biotechniques 82:172-173.

ANEJOS

Otras publicaciones relacionadas con esta memoria científica

**Proceedings of the Ninth International Workshop on Fire Blight
Napier, New Zealand (8th-12th October, 2001):**

- **Chronicle of a Disease Foretold (That Advances Slowly): The 2001 Spanish Situation.**
López, M.M., Llop, P., Donat, V., Peñalver, J., Rico, A., Ortiz, A., Murillo, J., Llorente, I., Badosa, E. and Montesinos, E.
2002. *Acta Horticulturae* 590:35-38.

- **Characterization of an *Erwinia* sp. Isolated from Necrotic Pear Blossoms in Valencia, Spain.**
Roselló, M., Tarín, A., Llop, P., Gorris, M.T., Donat, V., Peñalver, J., García Vidal, S., Gardan, L., Chartier, R., Paulin, J.P. and López, M.M.
2002. *Acta Horticulturae* 590:139-142.

**Proceedings of the Tenth International Workshop on Fire Blight
Bologna, Italy (5th-9th July, 2004):**

- **A *Erwinia amylovora* Strain Without Plasmid pEA29 Isolated in a Nursery from Hawthorn**
Llop, P., Donat, V., Rodríguez, M., Cabrefiga, J, Ruz, L., Palomo, J.L, Montesinos, E. and López, M.M.
2004. *Acta Horticulturae* (in press).

- **European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*.**
López, M.M., Keck, M., Llop, P., Gorris, M.T, Peñalver, J., Donat, V. and Cambra, M.
2004. *Acta Horticulturae* (in press).

Chronicle of a Disease Foretold (That Advances Slowly):

The 2001 Spanish Situation

M.M. López, P. Llop,
V. Donat and J. Peñalver
Instituto Valenciano
de Investigaciones Agrarias
(I.V.I.A.), 46113 Moncada
Spain

A. Rico, A. Ortiz, and
J. Murillo
Dep. Producción Agraria
Universidad Pública de
Navarra, 31006 Pamplona
Spain

I. Llorente, E. Badosa
and E. Montesinos
INTEA
Universidad de
Girona 17071 Girona
Spain

Keywords: *Erwinia amylovora*, fire blight, PCR, ELISA, monitoring eradication, characterization, AFLP, PFGE.

Abstract

Fire blight was first detected in Spain in 1995. In the following years the disease was identified in seven out of the seventeen Spanish regions, in the North-eastern and Central parts of the country. Typical symptoms were observed in pears, apples, loquats, quinces and in ornamental hosts susceptible to fire blight. The spatial and temporal distribution of the foci suggest that plant material has probably been responsible of the introduction of *Erwinia amylovora* in some of the areas. Eradication measures have been taken consisting of intensive surveys, analysis and destruction of diseased trees. These measures have been very effective so far because, in most of the zones, the number of outbreaks have not increased exponentially. Consequently, six years after the first detection, Spain is still considered a protected fire blight country in the European Union, because *E. amylovora* has only been found in a few areas and has subsequently been eradicated.

The characterization of 40 Spanish strains of *E. amylovora* was performed by conventional bacteriological tests, carbon utilization in miniaturized tests, serology, amplified fragment length polymorphism (AFLP) and macrorestriction fragment length polymorphism of genomic DNA followed by PFGE (MRFLP-PFGE). The obtained data support the hypothesis that *E. amylovora* has been introduced into Spain by infected plant material.

INTRODUCTION

Erwinia amylovora was identified for the first time in Spain in 1995 in Guipúzcoa (Northern part of the country), close to the Atlantic French border (López et al., 1999). Since then, fire blight surveys have been intensified in all the regions including visual inspections of the areas with fire blight hosts, twice a year, following an official established network. In addition, in 1999 Spain developed national legislation concerning fire blight that includes compulsory eradication with economic compensation for losses due to the destruction of the affected plants. The legislation

also includes a list of highly susceptible cultivars which were not compensated for after eradication if they were planted in the nurseries or in the orchards after 1999.

Rapid eradication (one week to one month after being found infected) of the affected plants and surrounding susceptible hosts has been done according to the legislation. In addition, intensive surveys were performed every one to two weeks, in the same year of the detection, beginning at blossom time. The survey frequency was reduced to every month in the subsequent years. No planting of fire blight hosts is allowed in the plots after eradication.

In this context, this paper describes the evolution of fire blight in Spain since 1995 until 2001 and the characteristics of Spanish strains of *E. amylovora* from the different foci.

MATERIALS AND METHODS

Analysis of Samples

Analysis of samples with symptoms was performed as indicated by López et al. (1999), by isolation on three media, enrichment-DASI-ELISA using specific monoclonal antibodies (Gorris et al., 1996a) with the kit provided by Plant Print Diagnostics (Faura, Valencia, Spain) and by PCR using a simple method for extracting bacterial DNA from the samples (Llop et al., 1999) and a nested PCR in a single closed tube (Llop et al., 2000). The samples were considered positive when *E. amylovora* was isolated, its pathogenicity proved by inoculation on pear fruitlets or pear shoots, and the bacterium identified by physiological, serological and molecular characteristics.

Surveys in nurseries, orchards and gardens were also carried out in fire blight free areas. Visual inspection was followed by analysis of randomly taken samples of flowers, shoots or buds. Enrichment-DASI-ELISA (Gorris et al., 1996) was used as the screening method. If the results were positive or doubtful a confirmation by isolation and PCR was performed with the same plant extract or with new samples taken from the same plant .

Characterization of Strains of *E. amylovora*

Morphology of the colonies was observed on King's B (King et al., 1954), CCT (Ishimaru and Klos, 1984), sucrose nutrient agar (SNA) and MM2Cu (Bereswill et al., 1998) growth media. Physiological characterization of 40 strains was performed using API 20E, API 20NE and API 50CH galleries (Bio-Merieux, Madrid, Spain). Fatty acid profiles were analyzed as described by Siverio et al. (1996). Serological identification was based on agglutination, indirect immunofluorescence using polyclonal antibodies and indirect ELISA using specific monoclonal antibodies (Gorris et al., 1996). Molecular identification was performed by PCR using specific primers described by Bereswill et al. (1992) and Llop et al. (2000).

Four primer sets (EIM1, E2M1, E3M1, E2M3) and two enzymes (EcoRI/Mse) were used for obtaining AFLP profiles and 16 to 26 polymorphic bands were analyzed in a selection of strains. Macrorestriction fragment length polymorphism of genomic DNA followed by PFGE was performed in some strains using the methodology

described by Zhang and Geider (1997). Strain CFBP 1430 of *E. amylovora*, isolated in France, was used as a positive control.

RESULTS AND DISCUSSION

Evolution of Fire Blight

Table 1 indicates the year of the first detection of the disease in the different regions and the years of subsequent detections. The main hosts affected are also indicated. The analysis of the origin, incidence and distribution of the diseased plants in the different outbreaks and the characteristics of the *E. amylovora* strains isolated from the different foci support the hypothesis that, at least in some areas, the pathogen was introduced with contaminated plant material.

Eradication measures have been taken consisting of intensive surveys, analysis of presence of *E. amylovora* and destruction of diseased trees. These measures have been very effective so far because, in most of the zones, the number of outbreaks did not increase exponentially. Consequently, six years after the first detection of *E. amylovora*, Spain is still considered in the European Union to be a protected fire blight country. This means that *E. amylovora* has been found only in a few areas of reduced extension and has subsequently been eradicated.

Analysis of Symptomless Plants

The analysis of different symptomless organs of fire blight hosts using highly sensitive techniques has been performed in several Spanish regions. So far, no plants with latent infections have been found after the systematic analysis of more than 14000 symptomless plants from orchards and nurseries in fire blight free areas. Nevertheless, as shown in Table 2, *E. amylovora* has been detected by several techniques in symptomless plants located less than 2 km from some fire blight foci.

Characterization of Spanish Strains

A collection of 150 strains from most of the Spanish outbreaks has been compared with strains from other countries. All the strains were able to elicit HR in tobacco and were pathogenic on pear fruitlets. They showed the typical morphology on King's B, CCT, SNA and MM2Cu media. A selection of 40 strains was analyzed by conventional tests and by API 20E, API 20NE and API 50CH, showing homogeneous patterns with little differences. Fatty acid profiles were very similar for all the analysed strains. The strains also exhibited positive reactions in agglutination, and immunofluorescence with polyclonal antibodies, and in ELISA with the specific monoclonal antibodies obtained Gorris et al. (1996). They produced the expected band by PCR amplification using the primers described by Bereswill et al. (1992) and Llop et al. (2000).

AFLP results of a selection of strains showed no correlation between the obtained pattern for each strain and host of origin, year of appearance or location of isolation, except for a group of isolates from *Pyracantha* sp. from Navarra. However, polymorphisms were observed among strains from several outbreaks.

The PFGE profiles of *E. amylovora* DNA after digestion with *Xba*I showed that most of the Spanish strains from the different outbreaks showed the pattern Pt 4 and only the isolates from two isolated foci in nurseries located in Segovia and Guadalajara belonged to the Pt3 pattern according to the profiles described by Zhang and Geider (1997). These results support the hypothesis of the introduction of *E. amylovora* with plant material, because the affected plants in both outbreaks were imported from Belgium, where the pattern Pt3 is common. In addition, these nurseries were located more than 300 km from other fire blight outbreaks.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Subdirección General de Sanidad Vegetal of the Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación of Spain for providing data on the different outbreaks. We also acknowledge M. Roselló and co-workers for analysis of symptomless plants in the Comunidad Valenciana, and the Plant Health Service of the Generalitat de Catalunya for other support. This work was supported in part by project AGF 1998-0402-C03-02 of the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) of Spain.

Literature Cited

- Bereswill, S., Jock, S., Belemann, P. and Geider, K. 1998. Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining. *Plant Disease* 82:158-164.
- Bereswill, S., Pahl, A., Belemann, P., Berger, F., Zeller, W. and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3522-3526.
- Gorris, M.T., Camarasa, E., Lopez, M.M., Paulin, K.P., Chartier, R. and Cambra, M. 1996. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. *Acta Hort.* 411:47-51.
- Ishimaru, C. and Klos, E.J. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its protected fire blight country. This use in epidemiological studies. *Phytopathology* 74:1342-1345.
- King, E.O., Ward, M. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
- López, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cambra, M., Roselló, M., Berra, D., Borrue1, M., Plaza, B., García, P. and Palomo, J.L. 1999. Fire blight in Spain: situation and monitoring. *Acta Hort.* 489:187-191.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. and 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2071-2078.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. and López, M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods* 37:23-31.

Siverio, F. and López, M.M. 1996. Characteristics of the whole cell fatty acids profiles of *Pseudomonas corrugata*. Eur. J. Plant Pathol. 192:519-526.

Zhang, Y. and Geider, K. 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed field gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 63:4421-4426.

Tables

Table I. Main hosts of *E. amylovora* in the different foci.

Foci	Year*	Main hosts**	Possible source
Guipúzcoa	1995 to 2001	A, P, O	French foci, plant material
Segovia	1996	O, P	Plant material
Navarra	1996 to 2000	A, P, O	Guipúzcoa foci, plant material
Huesca	1998	O	Plant material
Madrid	1998	O	Plant material
Guadalajara	1998, 2000	A, P, O	Plant material
Lérida	1998, 1999	P	Plant material
Vizcaya	1999	P, O	Guipúzcoa foci, plant material
La Rioja	2000	P	Unknown
Zaragoza	2000, 2001	P	Unknown
Alava	2000	O	Plant material
Valladolid	2000	O	Plant material
Palencia	2001	O	Plant material
Burgos	2001	O	Plant material

*The year of the first detection and the years of the new outbreaks are indicated. Eradication programs have been also performed in the outbreaks detected in the subsequent years.

**A: apple cultivars; P: pear cultivars; O: ornamental plants (*Crataegus* sp., *Cotoneaster* sp., *Pyracantha* sp.).

Table 2. Detection of *E. amylovora* in symptomless plant material located near fire blight foci.

Species	Samples	PCR*	E-ELISA**	Isolation
<i>Cotoneaster</i>	1	+	-	-
<i>Crataegus</i>	1	+	-	-
Quince	1	-	-	+
Loquat	1	+	-	-
Apple	8	+	3	3
<i>Pyracantha</i>	16	+	6	6
Pear	25	+	6	1
	53	52	15	11

*Nested PCR performed using primers described by Llop et al. (2000).

**Enrichment-ELISA performed using the monoclonal antibodies described by Gorrís et al. (1996) and the kit supplied by Plant Print Diagnostics.

Characterization of an *Erwinia* sp. Isolated from Necrotic Pear Blossoms in Valencia, Spain

M. Roselló and S. García Vidal
S.C. Sanidad Vegetal, Silla,
Valencia, Spain

A. Tarín
C.A. La Turisana, Turis, Valencia, Spain

P. Llop, M.T. Gorris, V. Donat,
J. Peñalver and M.M. López
IVIA, Moncada, Valencia, Spain

R. Chartier, J.P. Paulin and L. Gardan
INRA, Beaucouzé, Cedex, France

Keywords: Biochemical tests, serology, inoculations, PCR, PFGE, *E. amylovora*.

Abstract

A Gram negative bacterium was consistently isolated from necrotic blossoms of pear cvs. 'Ercolini' and 'Tendral' in Valencia (Spain) in 1999, 2000 and 2001. The symptoms resembled those of fire blight but affected only blossoms and did not progress to other parts of the trees. Isolates showed colony morphology similar to those of *Erwinia amylovora* on King's B, SNA and CCT media and their pathological, microbiological and molecular features were studied. The pear isolates were identified as an *Erwinia* sp. and were able to elicit the hypersensitive reaction in tobacco and necrosis in detached pear flowers, but were unable to develop specific *E. amylovora* symptoms in immature pear fruits, pear shoots, apple and quince slices and loquat leaves. They showed an API 20E pattern close to *E. amylovora*. Dendrograms from API biotype 100 tests showed that the pear isolates and *E. amylovora* were clustered in different phena. Serological results were similar to those of *E. amylovora* in IF using polyclonal or monoclonal antibodies but different in ELISA using specific *E. amylovora* monoclonal antibodies. PCR assays with primers from 23S rDNA sequences of *E. amylovora* were positive but no signal was obtained with primers from plasmid pEa29 or from chromosomal DNA sequences. Macrorestriction and subsequent PFGE analysis produced patterns different to *E. amylovora*. Complementary analyses are being undertaken to determine accurately the taxonomic position of the Valencian isolates.

INTRODUCTION

Pear trees of cvs. 'Ercolini' (Coscia) and 'Tendral' showing symptoms of necrotic pear blossoms (NPB) were observed in Turis, Valencia (an area of Spain where *Erwinia amylovora* has never been detected) during springtime in 1999, 2000 and 2001. The range of NPB per tree varied between 30% and 70% in different plots and 40-80% trees per plot were affected. No symptoms were observed in other fire blight hosts from the

same area. The symptoms did not progress either in the summer or in the autumn, but severe loss of fruit production resulted from them.

In 2000, a first attempt to determine the incidence of the symptoms in this zone was done. Approximately 10% of the total pear area was surveyed, focused in two zones in which pear production is concentrated. In the first zone 22.9% (3.3 Ha) of the plots contained pear trees with NPB and in the second zone all the pear plots visited (2.99 Ha) contained affected pear trees.

In order to determine the etiology of such symptoms, isolations were performed and the characterisation of the isolated bacteria is reported here.

MATERIALS AND METHODS

NPB were processed and plated on King's B (King et al., 1954), sucrose nutrient agar (SNA) and CCT (Ishimaru and Klos, 1984) media. Plates were incubated at 25°C and suspected colonies purified and identified.

Inoculations were performed with a representative selection of 10 NPB colonies in tobacco plants cv. Xanthi for hypersensitive reactions, and on detached pear flowers, fruitlets and shoots, quince and apple slices and detached loquat leaves, using a suspension of 10^9 cfu/ml and incubating for 7 days at 25°C.

NPB strains (and one typical *E. amylovora* strain) were leaf inoculated on actively growing seedlings of pear and apple in the greenhouse, with scissors dipped in bacterial suspension (10^9 cfu/ml). Blossom and shoot inoculations (10^8 cfu/ml, spray inoculation and 10^9 cfu/ml, syringe inoculation, respectively) were performed on diverse fire blight host plants in the orchard.

Physiological characterization of 10 purified colonies from different plots was performed using API 20E and API50CH galleries (Bio-Mérieux). Fatty acid profiles were analyzed as described by Siverio et al. (1996). Serological characterization based on agglutination and indirect immunofluorescence (IF), using commercial polyclonal and monoclonal antibodies and ELISA with specific monoclonal antibodies (Gorris et al., 1996) using the enrichment kit provided by Plant Print Diagnostics (Faura, Valencia, Spain). Molecular identification was performed by PCR with specific primers described by Bereswill et al. (1992), Maes et al. (1996), Guilford et al. (1996), and Llop et al. (2000). Macrorestriction using *Xba*I and subsequent PFGE analysis were performed on some isolates according to Zhang and Geider (1997). Strain CFBP 1430 of *E. amylovora*, isolated in France, was employed as a control in all the experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolations and Inoculations

E. amylovora-like colonies were consistently isolated from the NPB samples on King's B, SNA and CCT media. They were characterized as *Erwinia* sp. by

conventional biochemical tests. The isolated strains were able to elicit hypersensitive reactions on tobacco. Ten selected strains isolated from NPB were successfully inoculated on detached pear flowers of cv. Ercolini maintained for 7 days at room temperature. Necrosis was observed after 3-5 days in the flowers inoculated with the *Erwinia* sp. strains from NPB but not in those inoculated with sterile water. Comparative results of inoculation of strains from NPB and *E. amylovora* on detached organs showed that the NPB strains were only able to produce exudates in quince slices, and some of them in pear slices, but were negative when inoculated on pear shoots or fruitlets, loquat leaves and apple slices.

The results of comparative pathogenicity of *E. amylovora* and NPB strain on several fire blight hosts are shown in Table 1. Results of pathogenicity test in the orch were rather weak, even with the *E. amylovora* strains, due to unfavourable weather conditions. Nevertheless *E. amylovora* did express pathogenicity on plants of nine species and cultivars, while NPB strains never produced any symptoms. Similarly no pathogenicity was seen with NPB strains in greenhouse inoculations on seedlings, contrasting markedly with *E. amylovora*.

Biochemical Characterization

The NPB strains were similar to *E. amylovora* in conventional biochemical tests with few exceptions. They were quite similar to *E. amylovora* in API 20E but differing in three tests. Dendrograms from API biotype 100 tests showed that NPB isolates were clustered in a unique phenon, related to but different from phenon from *E. amylovora* and also from *E. pyrifoliae*, recently described by Kim et al. (1999). The fatty acid profile was homogeneous among strains from NPB but differed from *E. amylovora* in minor peaks when compared to profiles obtained by the MIS system.

Serological Characterization

Results obtained in immunofluorescence (IF) and ELISA with several antibodies are shown in Table 2. Differences between strains from NPB and *E. amylovora* were only observed in ELISA when monoclonal antibodies were used.

Molecular Characterization

Amplification was obtained with strains from NPB using the primers EAF and EAR described by Maes et al. (1996) and unspecific bands were obtained with primers A and B described by Bereswill et al. (1992). However, no amplification was obtained with primers EA71 and EA72 described by Guilford et al. (1996) and the nested primers described by Llop et al. (2000).

PFGE profiles obtained with *Xba*I were different from those described for *E. amylovora* by Bazzi et al. (1999).

CONCLUSIONS

The strains isolated from NPB in Turís (Spain) were clearly distinct from *E. amylovora* in pathogenicity on several fire blight hosts. Moreover, these strains differ in the utilisation of some carbon sources, the serological reaction with monoclonal antibodies, the amplification with some *E. amylovora* specific primers, and PFGE after macrorestriction with *Xba*I. These preliminary results suggest that they belong to a novel *Erwinia* species which is different from those previously described.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to F. García and C. Montón for performing fatty acid analysis.

Literature Cited

- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Berger, F., Zeller, W. and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3522-3526.
- Bazzi, C., Merighi, M., López, M.M., Zhang, Y., Jock, S. and Geider, K. 1999. Differentiation of *E. amylovora* strains isolated in Southern Europe by PFGE analysis. *Acta Hort.* 489:197-200.
- Gorris, M.T., Camarasa, E., López, M.M., Paulin, K.P., Chartier, R. and Cambra, M. 1996. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. *Acta Hort.* 411:47-51.
- Guilford, P.J., Taylor, R.K., Clark, R.G., Hale, C.N. and Forster, R.L.S. 1996. PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* 411:53-56.
- Ishimaru, C. and Klos, E.J. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use on epidemiological studies. *Phytopathology* 74:1342-1345.
- Kim, W.S., Gardan, L., Rhim, S.L. and Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Int. J. Syst. Bact.* 49:899-906.
- King, E.O., Ward, M. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. and 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2071-2078.
- Maes, M., Garbeva, P. and 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 Pathol.* 45:1139-1149.

Siverio, F. and López, M.M. 1996. Characteristics of the whole cell fatty acids profiles of *Pseudomonas corrugata*. Eur. J. Pl. Pathol. 192:519-526.

Zhang, Y. and Geider, K. 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed field gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 63:4421-4426.

Tables

Table 1. Pathogenicity of NPB strains compared with *E. amylovora*.

Inoculations	<i>E. amylovora</i>	NPB
● In the greenhouse		
Pear seedlings	+	-
Apple seedlings	+	-
● In the orchard		
Pear shoots		
cvs. Williams, Shinseiki	+	-
Pear flowers		
cvs. Conference, M2426, Harrow	-	-
Sweet		
Apple flowers		
cvs. Idared	-	-
Apple shoots		
cvs. Idared, Prima, Xuanina, R. Picon	+	-
Evereste, Robusta, Golden Delicious	-	-
<i>Pyracantha</i> flowers		
cvs. Mohave, Dart's Red, PIA40, PIA 76	+	-

+: typical fire blight symptoms; -: no symptoms

Table 2. Serological characterization of NPB strains, compared with *E. amylovora*.

Antibody	Technique	<i>E. amylovora</i>	NPB sp.
Mab 7A IVIA	Agglutination	+	+
PAb Loëwe	Agglutination	+	+
PAb Loëwe	IF	+	+
PAb IVIA	IF	+	+
Mab 7A IVIA	ELISA	+	-/+*
Mab 5G IVIA	ELISA	+	-
Mab 5H IVIA	ELISA	+	-
Mab 3B IVIA	ELISA	+	-

* Negative result in untreated samples, positive after treatment at 100°C for 5 min.

A *Erwinia amylovora* Strain Without Plasmid pEA29 Isolated In a Nursery from Hawthorn

P. Llop, V. Donat and M. M. López
Departamento de Protección Vegetal
y Biotecnología, Instituto Valenciano
de Investigaciones Agrarias (IVIA),
46113 Moncada, Valencia, Spain.

J. Cabrefiga, L. Ruz, and E.
Montesinos
Instituto de Tecnología
Agroalimentaria, Universidad de
Girona, 17071 Girona, Spain

J.L. Palomo
Centro Regional de Diagnóstico,
Apartado 61, 37080 Salamanca,
Spain.

M. Rodríguez
Departamento de Biología Celular,
Universidad Simón Bolívar,
Caracas, Venezuela.

Additional keywords: PCR, pathogenicity, hybridization

Abstract

A strain of *Erwinia amylovora* (IVIA 1614-2a) was isolated in Segovia (central Spain) in 1996 from an outbreak of fire blight. *E. amylovora* was isolated from a *Crataegus* sp. which showed symptoms of the disease. The morphology of the colonies on several media (King's B, SNA, CCT) was identical to that of reference strains. The strain was positive by ELISA using specific monoclonal antibodies, but not by PCR using primers designed from sequences of the plasmid pEA29. Nevertheless, the strain amplified with primers designed from chromosomal regions. The biochemical characterization using commercial strips API20E, API20NE, API50CH, and fatty acid profile gave the same results as the reference strain CFBP1430. On the other hand, strain IVIA 1614-2a resembled one *E. amylovora* strain cured from plasmid pEA29 in the slow growth in minimal medium without thiamine. The analyses of the plasmid content showed that it contains one plasmid of *c.* 70 kb, with no homology with pEA29, reported as an ubiquitous plasmid present in pathogenic *E. amylovora* strains. This was demonstrated by comparing their restriction profiles using three enzymes and by hybridisation of the plasmid fragments obtained using the pEA29 as probe. Several virulence assays on pear and apple plants and fruits showed that this isolate had virulence levels similar to other pathogenic strains containing the pEA29 plasmid. As far as we know, this is the first report of the isolation from naturally infected plant material of a fully virulent strain of *Erwinia amylovora* without plasmid pEA29.

INTRODUCTION

Erwinia amylovora is the causal agent of fire blight, a serious disease with a rapid spread in the last years in Europe (Van der Zwet and Bonn, 1999; Bonn and van der Zwet, 2000; Jock et al., 2002). One of the characteristics of *E. amylovora* common to the pathogenic strains analyzed so far that have been isolated in nature is the presence of a 29 kb plasmid, called pEA29 (Falkenstein et al., 1989; Laurent et al., 1989), and no reports have been found about the existence in nature of pathogenic strains without this

plasmid. It has been generally assumed that all the pathogenic *E. amylovora* strains should carry the plasmid pEA29, due to its high stability and non transmissibility.

In a survey performed in 1996 after finding an outbreak in a nursery in Segovia, typical symptoms of fire blight were found in some ornamental plants, and 30 isolates of *E. amylovora* were obtained from different hosts. A detailed analysis of one strain (IVIA 1614-2a) obtained from hawthorn (*Crataegus* sp), demonstrated that it lacks the pEA29 plasmid. The objective of the present work was to perform an extensive phenotypic and molecular characterization of the strain, including plasmid profiles and DNA hybridization analyses.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture properties

The bacterial strains employed in the analyses are listed in Table 1. All the strains were grown on King's B medium (King et al., 1954), and incubated for 24 h at 26°C. Colony morphology was also evaluated on Sucrose Nutrient Agar (Billing et al., 1961) and CCT (Ishimaru and Klos, 1984). Growth rate in minimal medium M9 with and without thiamine was compared with reference strains using the Bioscreen C system (Labsystems Oy, Finland). Ten μl of a suspension of 10^4 cfu ml^{-1} of each strain were incubated at 26°C, and the O.D. at 600 nm recorded for 5 days at intervals of 1 h.

Phenotypic characterization

Biochemical characteristics of strain IVIA1614-2a were compared to those of some *E. amylovora* reference strains using commercial strips as API50CH, API20E, API20NE, (BioMérieux, France) and also fatty acid profile (Van der Zwet and Wells 1993). The tests were performed as described by the manufacturer for API strips but incubating at 25°C or following the instructions of the MIDI system. Other analyses performed involved hypersensitivity reaction (HR) in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*).

Molecular characterization.

Strain IVIA 1614-2a was analyzed by PCR with primers designed from the pEA29 plasmid (Bereswill et al., 1992; McManus and Jones, 1995; Llop et al., 2000). Also, three sets of chromosomal primers were assayed (Bereswill et al., 1995; Guilford et al., 1996; Maes et al., 1996). The amplification conditions were performed in 1x reaction buffer, 1,5 mM MgCl_2 , 100 μM dNTPs and 5 pmols of each primer as described.

Plasmid and hybridization analyses.

The method of Zhou et al. (1990) was employed to check the plasmid content of the different strains. The plasmid size was calculated with the fragments obtained with enzyme *Bam*HI using the Kodak digital science 1D software (v. 3.0.1) (New Haven, USA). Plasmids pEA29 from strain CFBP 1430 and the 70 kb plasmid from strain IVIA 1614-2a were used as probes. Plasmids of strain IVIA 1614-2a and reference strains were hybridized against the probes before and after restriction with the two enzymes. Total DNA was digested with *Eco*RI and hybridized against the pEA29 probe to detect any homology in the sequence of the chromosome of strain IVIA 1614-2 with the pEA29 *E. amylovora* plasmid. The detection was performed using the Dig Wash and Block buffer set (Roche, Mannheim, Germany), and the membranes developed using X-

OMAT UV film (Kodak, France) or alternatively visualized using the LAS 3000 system (Fuji film, Japan).

Pathogenicity and virulence assays.

Pathogenicity assays were carried out on immature pear fruits (cv. Williams and Blanquilla). Inoculations were performed with 10^7 cfu/wound. Fruits were incubated in humidity chambers at 25°C for a week and symptoms development was recorded daily. All the inoculations were repeated twice.

Virulence assays were performed on immature pear fruits (cv. Passe Crassane) and pear (cv. Conference), apple (cv. Fuji), and *Pyracantha* plants. Plants were inoculated by dipping scissors in a 10^8 cfu ml⁻¹ suspension of the bacteria and by cutting the three youngest leaves of the seedlings located at the tip. Plants were covered with plastic bags and maintained in a controlled environment chamber at 22°C with high humidity conditions under 16 hours of light. Evaluation of blight symptoms was made after 10 days of incubation by means of a visual scale (from 0 to 4). Wound inoculations were also performed on immature pear fruits with 10 cfu/wound (four wounds per fruit). Then, fruits were placed in polystyrene tray packs, covered with plastic bags, and incubated at 21 °C. The incidence of infected wounds (%) for each repetition was assessed after 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 days of incubation.

The experimental design in both experiments (fruits and plant tests) consisted of three replicates of three plants/fruits per treatment. The effect of strain on disease severity and incidence was determined by an analysis of variance (ANOVA) using the general linear models (GLM) procedure of statistical analysis system (SAS) (Version 8.2, SAS Institute Inc., NC, USA). Means were separated by the Tukey's test.

RESULTS

Phenotypic and molecular characterization and growth rates.

Strain IVIA 1614-2a provided similar results to reference strains harboring the plasmid pEA29 with the biochemical tests. It was identified as *E. amylovora* by API systems and fatty acid profile. Colony morphology on the different media was the same for all the strains compared. Growth rate was different in the M9 medium without thiamine, in which strains PMV6014, cured of plasmid pEA29, and IVIA 1614-2a presented a lower rate of growth than the other strains, but similar between them (Fig. 1). Hypersensitivity reaction on tobacco leaves was positive for strain IVIA 1614-2a as well as for the reference strains.

The results obtained in the assays of molecular characterization of the isolate are shown in Table 1. PCR with primers from the plasmid (Bereswill et al., 1992; McManus and Jones, 1995; Llop et al., 2000) did not provide any signal with strain IVIA 1614-2a, but with chromosomal primers (Bereswill et al., 1995; Guilford et al., 1996; Maes et al., 1996) the PCR gave the same band size as the *E. amylovora* reference strains.

Plasmid profiles and hybridisation analyses.

The strain IVIA 1614-2a harbours only one plasmid of higher size than pEA29, and similar to another plasmid present in some of the reference strains employed in this work and it provided an estimate size of *c.* 70 kb. The restriction of the large plasmids present in some of the reference strains (Ea 273, NCPPB 311) was different to that of the plasmid from strain IVIA 1614-2a.

Hybridisations performed after restriction of plasmid content with *EcoRI* and *BamHI* with the 70 kb plasmid from strain IVIA 1614-2a as probe were negative with the reference strains, whereas only this strain produced hybridisation signal (Fig. 2A). With the plasmid pEA29 as probe all the reference strains hybridised, but strain IVIA 1614-2a did not provide any signal (Fig. 2B). The results obtained with total DNA showed that no homologous sequence belonging to the pEA29 plasmid was present in the chromosome of strain IVIA 1614-2a (*data not shown*). All these analyses demonstrated that this isolate does not harbour the pEA29 plasmid characteristic of wild strains, and that no sequences from pEA29 were found inserted neither in the chromosome nor in the 70 KB plasmid.

Pathogenicity and virulence assays.

Pathogenicity assays made on immature pear fruits gave positive results with strain IVIA 1614-2a as well as with the reference strains analysed on the two cultivars 'Williams' and 'Blanquilla', and ooze production was observed. Strain IVIA 1614-2a exhibited a global virulence level similar to that of the reference strains. The severity of infection in plants was above of strain NCPPB 311 and similar to strains CFBP 1430 and EPS 101 in apple and *Pyracantha*. The severity was also similar in all hosts to that of strains Ea 273 and NCPPB 3159. Disease levels caused by IVIA1614-2a were only below of strains CFBP 1430 and EPS 101 in pear. The incidence of infected wounds in immature pear fruits was superior to strains NCPPB 311 and NCPPB 3159, and similar to the other strains (Table 2).

DISCUSSION

Several works have demonstrated the presence of plasmid pEA29 in pathogenic strains of *E. amylovora* (Falkenstein et al., 1989; Laurent et al., 1989; Llop et al., 2000). The sequencing of this plasmid has shown that it does not carry any transfer nor mobilization genes (McGhee and Jones, 2000), and this, along with its high stability, has induced the common idea that all virulent strains in nature should harbor the plasmid. However, some research has pointed out the possible existence of naturally occurring strains that could not present the pEA29 plasmid (Brown et al., 1996, Brennan et al., 2002). We have isolated from a hawthorn showing fire blight symptoms an atypical *E. amylovora* strain without pEA29 but retaining pathogenicity, and with the phenotypic characteristics of the typical *E. amylovora* (according to Paulin, 2000).

Virulence experiments showed differential levels among a selection of *E. amylovora* strains, including IVIA 1614-2a. Taken into account the range of virulence among *E. amylovora* strains carrying the pEA29 plasmid, strain IVIA 1614-2a was situated in an intermediate position. As far as we know, this is the first report of the isolation from naturally infected plant material of a pathogenic strain of *Erwinia amylovora*, which does not harbour the plasmid pEA29 and that it carries a new plasmid of *c.* 70 kb.

The most sensitive technique available for the detection of *E. amylovora* is considered to be the PCR using primers designed from the 0.9 KB *PstI* fragment of the pEA29 plasmid (Bereswill et al., 1992; McManus and Jones, 1995; Llop et al., 2000; López et al., 2004). Therefore, the existence of strains without pEA29 compromises these detection systems, an aspect of great concern in epidemiological studies and eradication programs. Furthermore, the finding of these strains strongly supports the need to use a combination of several techniques in an integrated approach for detection of *E.*

amylovora in plant material (López et al., 2004).

The existence of a strain capable of competing and surviving in nature without harbouring the pEA29 represents a novelty, but probably is not an exception. The study of the plasmid content of more isolates could provide some light about the role of this plasmid.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. Montón and F. García for fatty acid analyses, and M.A. Barny and J. P. Paulin for providing strain PMV 6014. This work has been funded by “Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología-CICYT” of Spain (Projects AGF98-0402-C03, AGL2001-2349-C03). V. Donat thanks the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias for a predoctoral grant.

Literature cited

- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3522-3526.
- Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmuller, I., Geider, K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2636-2642.
- Billing, E., L. A. E. Baker, J. E. Crosse, and C. Garret. 1961. Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *J. Appl. Bacteriol.* 24:195-211.
- Bonn, W. G. and van der Zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. Pages 37-55. In: Fire Blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. J.L. Vanneste, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Brennan, J. M., Doohan, F. M., Egan, D. Scanlan, H., and Hayes, D. 2002. Characterization and differentiation of Irish *Erwinia amylovora* isolates. *J. Phytopathology* 150:414-422.
- Brown, E. W., Janisiewicz, W. and van der Zwet, T. 1996. Preliminary phenotypic and genetic differentiation of the fire blight bacterium, *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* 411:199-210.
- Falkenstein, H., Zeller, W., and Geider, K. 1989. The 29 kb plasmid, common in strains of *Erwinia amylovora*, modulates development of fireblight symptoms. *J. Gen. Microbiol.* 135:2643-2650.
- Guilford, P. J., Taylor, R. K., Clark, R. G., Hale, C. N., Forster, R. L. S., and Bonn, W. G. 1996. PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* 411:53-56.
- Ishimaru, C., and E. J. Klos. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology.* 74:1342-45.
- Jock, S., V. Donat, M. M. López, C. Bazzi, and Geider, K. 2002. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environ. Microbiol.* 4:106-114.
- King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307
- Laurent, J., Barny, M. A., Kotoujansky, A., Dufrique, P., and Vanneste, J. L. 1989. Characterization of a ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microbe Interactions* 2:160-164.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., and 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. Appl. Environ. Microbiol. 66:2071-8.
- López, M. M. 2004. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants. Diagnosis on *Erwinia amylovora*. EPPO. <http://www.csl.gov.uk/science/organ/ph/diagpro/>.
- Maes, M., Garbeva, P., and 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.
- McGhee, G. C., and Jones, A. L. 2000. Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation. Appl. Environ. Microbiol. 66:4897-4907.
- McManus, P. S. and Jones, A. L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. Phytopathology 85:618-623.
- Paulin, J. P. 2000. *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. Pages 87-115 in: Fire Blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. J.L. Vanneste, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Van der Zwet, T. and Bonn, W. G. 1999. Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. Acta Hort. 489:167-168.
- Van der Zwet, T. and Wells, J. M. 1993. Application of fatty acid class analyses for the detection and identification of *Erwinia amylovora*. Acta Hort. 338:233.
- Zhou, C., Yang, Y. and Jong, A. Y. 1990. Mini-prep in ten minutes. Biotechniques. 82:172-3.

Table 1. *E. amylovora* reference strains and molecular characterization in comparison to strain IVIA 1614-2a.

Strain	Origin	Host	PCR	
			pEA29 ^b	Chromosome ^c
CFBP 1430	France	<i>Crataegus</i>	+	+
Ea 273	USA	<i>Malus</i>	+	+
NCPPB 311	Canada	<i>Pyrus</i>	+	+
NCPPB 3159	The Netherlands	<i>Malus</i>	+	+
EPS 101	Spain	<i>Pyrus</i>	+	+
IVIA 1614-2a	Spain	<i>Crataegus</i>	-	+
PMV 6014 ^a	France	-	-	+

a: Strain CFBP 1430 cured of plasmid pEA29

b: Using primers designed from the pEA29 plasmid

c: Using primers designed from the chromosome

Table 2. Virulence of strain IVIA 1614-2a in plants and immature pear fruits compared to reference *E. amylovora* strains

Strain ^a	Severity of infections in plants (%) ^b					Incidence of infected wounds in immature pear fruits (%) ^c
	Pear	Apple	<i>Pyracantha</i>			
CFBP 1430	90.7 a	60.6 a	18.1	a	100.0	a
Ea 273	65.7 bc	69.6 a	13.9	a	100.0	a
NCPPB 311	1.0 d	3.7 b	2.8	a	12.5	c
NCPPB 3159	63.0 c	54.5 a	5.6	a	83.3	b
EPS 101	84.3 ab	64.5 a	20.8	a	100.0	a
IVIA 1614-2a	65.7 bc	43.9 a	11.1	a	95.8	a

^aMeans within the same column followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$) according to Tukey's test.

^bPlants were inoculated by cutting youngest leaves with scissors dipped into a bacterial suspension of 10^8 CFU/ml.

^cImmature pear fruits were inoculated by deposition of 10 μ l of a bacterial suspension of 10^3 CFU/ml in each wound. Results are means of three replicates of three fruits with four wounds per fruit.

Fig. 1. Growth of strain IVIA 1614-2a compared to reference strains in M9 minimal medium without thiamine.

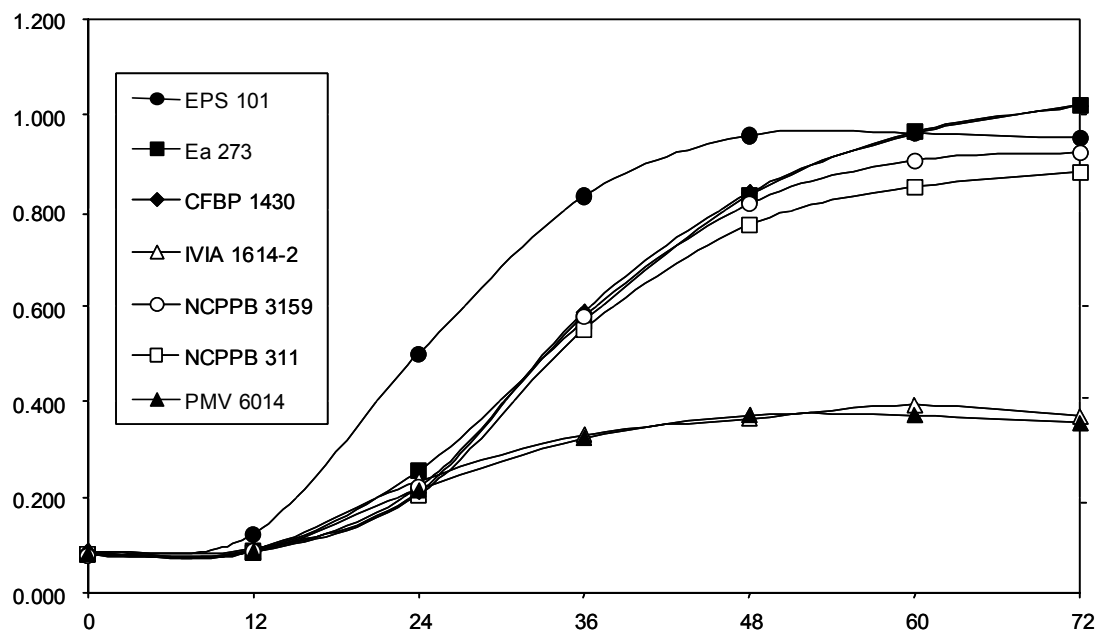
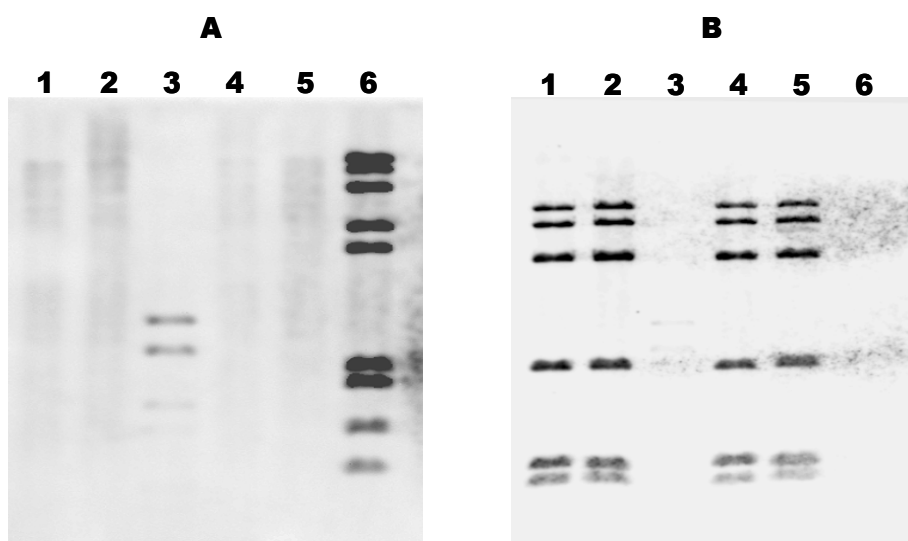


Fig. 2. Hybridization analyses performed with the plasmids of the *E. amylovora* strains after restriction with *EcoRI* with 70 kb plasmid from strain IVIA 1614-2a (A) and with pEA29 after recovering the membrane (B) as probes. Lane 1: strain EPS 101; lane 2: Ea 273; lane 3: marker VI (Boehringer Mannheim); lane 4: NCPPB 311; lane 5: CFBP 1430; lane 6: IVIA 1614-2a.



European Protocol for Diagnosis of *Erwinia amylovora*

López M.M., Llop P., Gorris M.T.,
Peñalver J., Donat V., Cambra M.

Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias (IVIA)
46113 Moncada, Valencia, Spain

Keck M.
Bundesamt und Forschungszentrum fuer
Landwirtschaft
Spargelfeldstrasse 191, A. 1226,
Vienna, Austria

Abstract

The EU-funded project DIAGPRO has developed diagnostic protocols for 18 quarantine pests including *Erwinia amylovora*. The protocol for this organism includes a diagnosis scheme for detection of the bacterium in symptomatic and asymptomatic plants with details of the different techniques as isolation in three media, direct tissue print-ELISA, enrichment DASI-ELISA, immunofluorescence, conventional PCR and nested-PCR in a single closed tube (before and after enrichment of the samples in two liquid media).

A ring test was conducted to evaluate and standardize some techniques and protocols. Testing was performed independently at 10 plant health laboratories analysing 15 samples (healthy, spiked or inoculated). The reliability of the diagnosis across all laboratories decreased with inoculum concentration. The accuracy of the different techniques, defined as: (true positive diagnosis + true negatives)/total number of samples, was: 0.88, 0.92 and 0.92 respectively for isolation in King's B, SNA and CCT media; 0.70, 0.72 and 0.66 for immunofluorescence performed with one monoclonal and two polyclonal antibodies commercially available; 0.79 and 0.83 for enrichment-ELISA with a commercial kit after enrichment in two media; 0.51 for conventional PCR and 0.69 for nested-PCR in a single tube, both techniques increasing their accuracy up to 0.78 and 0.86, respectively, after enrichment. The designed protocol is freely available at the web site: www.csl.gov.uk/science/organ/ph/diagpro

INTRODUCTION

Erwinia amylovora is considered a quarantine organism in the European Union (EU) and specific legislation regarding phytosanitary measures to avoid further spread has been published by the EU Commission (Anonymous, 2000, 2003). This includes the analysis of symptomless plants located in areas where fire blight is known to occur before being moved to a protected zone, but there is a lack of protocols for the routine detection of *Erwinia amylovora* in plant samples, especially when low bacterial numbers are expected. Consequently, accurate detection tools are needed for routine analysis of symptomatic and especially for asymptomatic plants.

It has been assumed in the past that *Erwinia amylovora* is a bacterium easy to isolate and that typical fire blight symptoms always appear when a plant is infected. However, it is now accepted that the bacterium is able to survive in symptomless plants and it can be responsible of latent infections (Thomson, 2002). Furthermore, direct isolation cannot be successful when the bacterial cells are stressed, in very low numbers or in viable but non culturable (VBNC) state (Ordax et al., this volume). Consequently, in addition to isolation, other laboratory techniques of high efficiency are required. However, for many years, the only official recommendation was the EPPO protocol

(Anonymous, 1992), that only included isolation and indirect immunofluorescence.

A project (DIAGPRO) was funded by the EU to design diagnostic protocols for quarantine organisms including *E. amylovora*. On the basis of a preliminary screening of existing methods and available probes, those with higher sensitivity and specificity were selected and optimized. This paper reports the ring test evaluation of the selected and optimised methods, performed in ten European laboratories.

MATERIALS AND METHODS

The protocol was prepared by the IVIA Laboratory, Valencia, Spain, who coordinated the ring test and evaluated the results. Ten laboratories indicated in Table 1 were involved. Details of the different reagents and techniques of the evaluated protocol are available at www.gov.uk/science/organ/ph/diagpro.

Sample preparation

Healthy *Pyracantha* shoots were sent to the ten laboratories to prepare spiked samples. Five blind samples (three healthy shoots of loquat, pear and cotoneaster and one pyracantha shoot and pear wood inoculated with *E. amylovora*) were also provided. The healthy *Pyracantha* shoots were cut to prepare 10 samples of 0.1 g of material per sample and antioxidant buffer (Plantprint Diagnostics) was added to the samples. They were put into ten extraction bags and serial dilutions from 10^9 to 10^0 cfu/ml of a 48-72h old culture of *E. amylovora* strain CFBP 1430 were added to the plant material in each bag. PBS (10 mM phosphate buffer saline, pH 7.2) was used as negative control. The blind samples were processed in the same buffer. After 10 min. maceration, the samples were used the same day for isolation, enrichment and fixation on the slides for the immunofluorescence antibody staining (IFAS). One tube of each sample was stored at -20°C for PCR analysis.

Isolation

Each macerate and three decimal dilutions in PBS were plated on the semiselective CCT medium (Ishimaru and Klos, 1984), King's medium B (King et al., 1954) and Nutrient Agar with 5% sucrose medium (Anonymous, 1992). The plates were incubated at 25°C for 72 h. From each sample *E. amylovora*-like colonies were purified and their identity was confirmed by inoculation on the available host and by DASI-ELISA or PCR.

Enrichment

As soon as the macerates were made, 0.9 ml of each sample were dispensed in two sterile Eppendorf tubes with the same volume of King's B and CCT liquid enrichment media. As negative control, two tubes with maceration buffer and the same volume of each enrichment medium were prepared. They were incubated at 25°C for 40h without shaking.

Enrichment-plating

The enriched samples, as well as their three decimal dilutions, were plated only on CCT. They were incubated at 25°C for 72h.

Enrichment-DASI-ELISA

To analyze the samples previously enriched by DASI-ELISA they were treated

at 100°C for 10 minutes before being processed following the procedure of Gorris et al. (1996b), using the monoclonal antibodies described by Gorris et al. (1996a) available in the commercial kit developed by Plant Print Diagnostics .

Immunofluorescence antibody staining (IFAS)

Commercially available monoclonal antibody 7A-IVIA (Plant Print Diagnostics) and polyclonal antibodies (Loewe 07309 and EPS-1430-IVIA) were used at the respective dilutions indicated by the suppliers. The macerate and three decimal dilutions were analysed .

PCR

Samples of 1ml of each macerate and their enrichments were used for extracting the DNA according to Llop et al. (1999). Then, two different amplification protocols were applied: the conventional one was performed according to Bereswill et al. (1992) with primers 1 and 2, and the nested-PCR in a single tube was performed according to Llop et al. (2000) with primers AJ75, AJ76 as external primers and PEANT1, PEANT2 as internal.

Inoculation

Suspected *E.amylovora* colonies from the isolation and enrichment plates were inoculated to prove their pathogenicity. Inoculation of immature fruits (pear, apple) were performed on whole fruits or on slices using 10 µl of 10⁹ cfu/ml suspensions of the colonies.

Analysis of the results

All the results obtained were included in the analysis. The methodology applied by the Medical University of South Carolina, USA, was used. It defined for each technique and protocol: Sensitivity (total real positives) = true positives/(true positives + false negatives), to indicate the probability of the test finding the bacteria among the true positives. Specificity (total real negatives)= true negatives/(true negatives + false positives), to indicate the probability of the test finding the bacteria among the true negatives. Hit rate (accuracy)= (true positives+ true negatives)/ total number of samples, to indicate the amount of samples with true positive or negative diagnostic.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of all tests showed that for 150 samples, the highest *E. amylovora* populations (from 10⁸ to 10⁶ cfu/ml) were more consistently detected by all the laboratories, but lower populations (from 10⁵ to 10⁴ cfu/ml) were detected in less laboratories. The reliability of detection across all laboratories varied with bacterial concentration, irrespective of the methods used. Table 2 shows the sensitivity, specificity, and the accuracy of the techniques and protocols evaluated. Isolation was the most robust technique and PCR before enrichment got poor results. It is noticed that for PCR and enrichment-PCR, a high specificity did not correspond to a high sensitivity and the same was observed for IFAS.

To our knowledge, this is the first report on the results of a multi-laboratory ring test evaluation of a full range of techniques for their efficiency in detecting *E. amylovora* from 1 to 10⁸ cfu/ml in plant samples, analysed independently in ten laboratories. It is not surprising that the isolation was the most accurate technique

because of the high experience in all the participating laboratories and their expertise in recognising the *E. amylovora* colonies. Conversely, the relatively low accuracy obtained by the IFAS technique with the three antibodies used was surprising, in spite of the experience of the participants in using this technique. The enrichment-ELISA showed variable results with 100% true detection in some of the laboratories. Surprisingly, conventional PCR gave poor results, using the primers of Bereswill et al. (1992) and Llop et al. (2000). Enrichment-PCR gave better results probably due to the dilution of the inhibitory compounds of the samples. Performing the nested-PCR in a single tube gave the best results, especially after enrichment of the samples. It is necessary to take into account that no optimization of the amplification conditions in each laboratory and thermocycler was done before the ring test, and this can explain some of the unexpected results as those obtained with the Bereswill et al. (1992) primers.

The main goal of this paper was to show in detail the evaluation in ten laboratories of the different techniques proposed in a diagnostic protocol, as a result of an EU funded project and, consequently, a diagnosis scheme for symptomatic and asymptomatic plants has been proposed. We consider that this diagnostic protocol includes several techniques in an integrated approach to minimise the risk of false positives and negatives. It has been validated by the ring test and the potential utilisers should take into account the kind of material to process and the robustness of the different techniques, when selecting the techniques for analysis. A decision making protocol on the basis of these evaluated and standardized methods has been published at the EPPO Bulletin (Anonymous, 2004).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was granted by the SMT project SMT4-CT98-2252 and the CICYT project AGL 2001-2439-CO3-02. We specially thank all the participants in the ring test and the company Plantprint Diagnostics (Faura, Spain)

Literature cited

- Anonymous, 1992. Quarantine procedure. *Erwinia amylovora*. Sampling and test methods. Bulletin OEPP 22, 225-231.
- Anonymous, 2000. Commission Directive 2000/29/EC related to the measures against the introduction in the Community of organisms harmful to plants or plant products. Off. J. Eur. Union 10.07.2000, L/169.
- Anonymous, 2003. Commission Directive 2003/116/EC of 4.12.2003 amending Annexes II, III, IV and V to Council Directive 2000/29/EC as regards the harmful organism *Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et al. Off J. Eur. Union 6.12.2003, L321/36.
- Anonymous, 2004. EPPO Standards. Diagnostic protocols for regulated pests. PM720 *Erwinia amylovora* EPPO Bull. 34: 159-171.
- Bereswill, S., Pahl, P., Bellemann, P., Berger, F., Zeller, W., Geider, K. 1992. Sensitive and species specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3522-3526.
- Billing, E. Crosse, I.E. and Garret C.M.E. 1960. Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight of pear. Plant Pathology 9, 19-25.
- Gorris, M.T. Camarasa, E. López, M.M. Paulin, J.P. Chartier, R. and Cambra ,M. 1996a. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. Acta Horti. 411,

- 47-51.
- Gorris, M.T. Cambra, M. Lecomte, P. Llop, P. Chartier, R. Paulin, J.P. and López, M.M. 1996b. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae* 411, 41-46.
- Ishimaru, C. and Kloss, E. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* 74, 1342-1345.
- King, E.O., Ward, M., Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 401-407.
- Llop, P. Bonaterra, A. Peñalver, J. and 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2071-2078.
- Llop, P. Caruso, P. Cubero, J. Morente, C. and López, M.M., 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods* 37: 23-31.
- Thomson, S.V., 2000. Epidemiology of fire blight. In :Fire Blight :the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. Vanneste ,J.L.(ed.) CABI Publishing, Wallingford, UK.

Table 1. European plant health laboratories participating in the ring test.

Laboratory	City	Country	Scientific responsible
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	The Netherlands	J. Janse
Osterreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vienna	Austria	M. Keck
Institut for Plant Protection	Oslo	Norway	A. Sletten
Centro de Protección Vegetal	Zaragoza	Spain	M.A.Cambra
Centro Regional de Diagnóstico	Salamanca	Spain	J.L. Palomo
Central Science Laboratory	York	Great Britain	S. Simpkins
Direcção Geral de Protecção das Culturas	Lisboa	Portugal	M.T.T. Duarte
Laboratoire National de la Protection des Végétaux	Angers	France	F. Poliakoff
Rijkstation voor Plantenziekten	Merelbeke	Belgium	J.van Vaerenbergh
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spain	M.M. López

Table 2. Sensitivity, specificity and accuracy of the different techniques and protocols evaluated.

Detection techniques	Sensitivity	Specificity	Accuracy
Dilution plating King's B	0.91	0.80	0.88
Dilution plating SNA	0.95	0.85	0.92
Dilution plating CCT	0.93	0.82	0.92
IFAS (MAb 7A IVIA)	0.61	0.97	0.70
IFAS (PAb Loewe)	0.63	0.97	0.72
IFAS (PAb EPS IVIA)	0.55	0.97	0.66
Enrichment (King's B) DASI-ELISA	0.72	1.00	0.79
Enrichment (CCT) DASI-ELISA	0.77	1.00	0.83
PCR (Bereswill et al.)	0.38	0.87	0.51
Enrichment (King's B) PCR (Bereswill et al.)	0.67	0.90	0.74
Enrichment (CCT)-PCR (Bereswill et al.)	0.72	0.95	0.78
Nested PCR (Llop et al.)	0.64	0.82	0.69
Enrichment (King's B)-Nested PCR	0.83	0.87	0.84
Enrichment (CCT)-Nested PCR	0.85	0.87	0.86