

Crónica de bacteriosis anunciadas: aprendiendo sobre nuevas y viejas bacterias fitopatógenas

María Milagros López (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Moncada, Valencia.
mlopez@ivia.es)

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre bacterias fitopatógenas en España comenzaron muy tarde respecto a otros países europeos. Resulta necesario recordar que el padre de las bacterias fitopatógenas Erwin F. Smith en su genial obra de 1920 “*An introduction to bacterial diseases of plants*”, tras exponer los conocimientos sobre las bacterias presentes en distintos países, indica sobre España y Portugal: “*These countries are a terra incognita*”. Esta carencia de información sobre las bacteriosis continuó hasta finales de la década de 1960, ya que fueron escasos los trabajos publicados aquí sobre estas enfermedades.

Actualmente, la creciente importancia en España de nuevas bacteriosis que afectan a los principales cultivos, es esencialmente debida al mejor conocimiento que existe sobre las mismas, al mayor número de bacteriólogos y al comercio de semillas o de material vegetal de reproducción que traslada las bacterias fitopatógenas desde países en donde son endémicas, a zonas españolas en las que encuentran especies susceptibles, condiciones favorables y socios de la SEF dispuestos a estudiarlas.

En el libro *Patología Vegetal* de Urquijo, Sardiña y Santaolalla, que fue durante muchos años el “libro de texto oficial”, se citan sólo las siguientes enfermedades bacterianas, como presentes en España, en su edición de 1971: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas phaseolicola*, *Pseudomonas savastanoi*, *Streptomyces scabies*, *Xanthomonas campestris* y *Xanthomonas phaseoli*. Ello demuestra que en el período anterior a la constitución de la SEF, la información y la investigación sobre estas bacterias era muy reducida. Pero a pesar de ello, algunos futuros socios fundadores de la SEF ya habían producido muy brillantes resultados. Muchos ignoran que en 1962 Miguel Rubio-Huertos y Ramona (Monchi) Beltrá del Instituto Jaime Ferrán de Microbiología del CSIC, (hoy Centro de Investigaciones Biológicas), publicaron en *Nature* el trabajo: “*Fixed pathogenic L forms of Agrobacterium tumefaciens*”, seguido de otro en 1966, en la misma revista.

La década de los años 1980: los primeros bacteriólogos de la SEF

Parece que las bacterias fitopatógenas fueron el patito feo de la Patología Vegetal española durante las décadas de 1960 y 1970, cuando se desarrollaron con gran empuje y entusiasmo varios grupos de micólogos, virólogos y nematólogos. En 1981, cuando se creó la SEF, ninguna bacteria fitopatógena era considerada como causante de una enfermedad de importancia económica en España. Entre los primeros 78 socios de la SEF, a los que se considera como fundadores, sólo figuraban cinco bacteriólogas. Cuatro de ellas procedían de centros de investigación de Madrid (Ramona Beltrá, Genoveva Tejerina, Ramona de la Vega y Cristina Noval) y una de Valencia (María Milagros López), por lo que de alguna manera se puede deducir que la información sobre estas enfermedades en el resto de España era realmente mínima.

En la década de 1980 los estudios sobre bacterias fitopatógenas a nivel internacional aparecían caracterizados por los avances en biología molecular e ingeniería genética. Los genes bacterianos se convirtieron en los reyes de las publicaciones. Las palabras plásmido, restricción, clonación, recombinación, secuenciación etc. definen esta década, pero en la SEF estábamos todavía



Síntomas de
Agrobacterium tumefaciens en rosal.

conociendo las bacterias presentes en España y las enfermedades que causaban, con la excepción de Ramona Beltrá, que ya empezó a utilizar técnicas de biología molecular. También se iniciaron los trabajos sobre el control biológico de *A. tumefaciens*.

En la práctica, sólo se conocían aquellas bacteriosis que eran muy reconocibles por lo característico de los síntomas que provocaban. Entre ellas, se señalaba a *A. tumefaciens* como la más frecuentemente encontrada y se citaban tres especies de *Erwinia*, ocho de *Pseudomonas*, una de *Streptomyces* y seis de *Xanthomonas* (López *et al.*, 1987), afectando a distintos cultivos. El conocimiento de la biología y epidemiología de estas enfermedades en nuestro país era muy escaso, los métodos de diagnóstico se limitaban a técnicas de aislamiento y serológicas y los de identificación se basaban fundamentalmente en pruebas bioquímicas. Por todo ello, en el congreso de la SEF de 1989 en Badajoz, sólo se presentaron 3 comunicaciones sobre bacterias fitopatógenas.

La década de los años 1990: crecimiento exponencial de la importancia de las bacterias fitopatógenas en la SEF

La década de 1990, vino marcada por avances muy significativos en el conocimiento de las bacterias, como la utilización masiva de técnicas moleculares de detección y caracterización, la secuenciación de los primeros genomas bacterianos y la demostración de la actuación colectiva de muchas especies revelada por la formación de biopelículas, los mecanismos tipo "quorum sensing", etc. Además, en el caso de las bacterias fitopatógenas los cambios taxonómicos fueron muy frecuentes.

En España, el casi desierto panorama de las bacterias fitopatógenas cambió radicalmente con la aparición de varios núcleos de generación de conocimiento bacteriano en la Universidad de Girona bajo la dirección de Emilio Montesinos, en las Escuelas Técnicas Superiores de Ingenieros Agrónomos de Madrid y Pamplona, con Pablo Rodríguez-Palenzuela y Jesús Murillo y en la Universidad de Málaga con Antonio de Vicente. Asimismo, fue determinante el desarrollo de los Laboratorios de Diagnóstico de los servicios de Sanidad Vegetal en las distintas CCAA, algunos de ellos, con clara vocación bacteriológica como en los casos de Miguel Cambra, Pablo García Benavides, José Luis Palomo o Montse Roselló, responsables de los análisis bacterianos en Aragón, Castilla-León y C. Valenciana, respectivamente. La llegada de nuevos grupos de jóvenes bacteriólogos se materializó en la presentación de 10 comunicaciones sobre bacterias fitopatógenas en el congreso de 1994 en Sitges, de 23 en el de 1996 en Córdoba y de 31 en el de 1998 en Salamanca.

En la primera edición del libro "Patógenos de plantas descritos en España", en 1998 se citaban ya 32 especies bacterianas: dos de *Agrobacterium*, una de *Clavibacter*, cuatro de *Erwinia*, 13 de *Pseudomonas*, una de *Ralstonia*, otra de *Streptomyces*, nueve de *Xanthomonas* y una de *Xylophilus*.

La década de los años 2000: las bacterias alcanzan la fase estacionaria en la SEF

En la primera década del siglo XXI a nivel general y también en Fitopatología, la genómica abre la puerta a las ómicas (proteómica, transcriptómica y metabolómica), así como a la metagenómica, facilitando el conocimiento de los organismos no cultivables. Además, la experimentación con organismos microbianos da paso a la microbiología de sistemas que estudia interrelaciones entre genes, proteínas, orgánulos, ambiente, etc. En los congresos de la SEF se



Síntomas de *Ralstonia solanacearum* en tubérculo de patata.

observa un predominio de las aproximaciones moleculares, de caracterización de genes y proteínas implicados en distintos procesos, aunque se siga investigando en las especies que están causando enfermedades en nuestro país.

Se crean o consolidan nuevos grupos de bacteriólogos como el de Jaime Cubero en el INIA de Madrid, el de Ana González en el SERIDA de Asturias, el de Cayo Ramos en la Universidad de Málaga, el de Ana Palacio en el CITA de Zaragoza, el de Ana Rodríguez en el ICIA de Canarias y el de Elena G. Biosca en la Universidad de Valencia, entre otros. Resulta muy interesante comprobar cómo se desarrollan y se mantienen las numerosas interacciones entre los bacteriólogos españoles, tanto entre los "senior", como entre ellos con los "junior" y las frecuentes colaboraciones entre grupos, que han dado lugar a simbiosis muy fructíferas.

El número de comunicaciones sobre bacterias fitopatógenas presentado en los congresos de la SEF de 2002 a 2010, ha ido creciendo hasta 2006 y luego viene siendo relativamente estable, entre el 10% y el 15% de las presentaciones totales. Se presentaron 32 comunicaciones en 2000 en el congreso de Valencia, 29 en 2002 en Almería, 38 en 2004 en Lloret de Mar, 52 en 2006 en Murcia, 47 en 2008 en Lugo y 46 en 2010 en el de Vitoria.

En la segunda edición del libro "Patógenos de plantas descritos en España", finalizada en 2006 (aunque publicada en 2010), se recoge ya la descripción de 50 especies de bacterias fitopatógenas. Aparecen dos especies de *Agrobacterium*, cuatro de *Brenneria*, dos de *Clavibacter*, una de *Curtobacterium*, una de *Dickeya*, tres de *Erwinia*, una de *Ewingella*, dos de *Pectobacterium*, veinte de *Pseudomonas*, una de *Ralstonia*, una de *Rhodococcus*, una de *Streptomyces*, diez de *Xanthomonas* y una de *Xylophilus*. Como los nombres genéricos o específicos de muchas bacterias se han modificado, parece que las antiguas bacterias han desaparecido y que nos encontramos con nuevos patógenos, pero ello es debido a los cambios en la taxonomía bacteriana. Entre ellas, se encuentran ya ocho especies bacterianas incluidas en la lista de organismos de cuarentena de la UE según la Directiva 2000/29, que son causantes de enfermedades de gran importancia económica siendo de erradicación obligatoria, mientras que sólo se citaban tres en la edición anterior. Sin embargo, el mayor número de bacterias descritas en nuestro país, no sólo es debido al mayor número de bacteriólogos y al trabajo de los Laboratorios de Diagnóstico de las CCAA. La apertura de fronteras entre los distintos países de la Unión Europea, y los cada vez más frecuentes intercambios entre países, están llevando a la globalización de las bacteriosis a nivel europeo, al igual que ha ocurrido con otras enfermedades.

Ejemplos representativos de los avances en el conocimiento de las bacterias fitopatógenas en España

Como resulta imposible resumir en este trabajo treinta años de intensa actividad de los bacteriólogos españoles, se repasan a continuación algunos de los logros conseguidos en distintos modelos bacterianos. La selección es obligatoriamente mínima y algo arbitraria, porque aunque son todos los que están, es evidente que no están todos los que son y pido disculpas anticipadas por los grupos o trabajos no citados. El objetivo no es hacer una descripción exhaustiva de todo lo que se ha avanzado en España en estas tres décadas, sino reflejar en cinco modelos representativos, algunos de los estudios realizados.

Agrobacterium tumefaciens, causante de tumores, está considerado un patógeno de calidad en la UE. Esta vieja enfermedad era conocida desde la primera mitad del siglo XX en España y ya ha sido citada en más de veinte especies huéspedes. Los estudios realizados a partir de 1981, han permitido conocer las características de las cepas españolas de frutales y vid (LÓPEZ *et al.*, 1983; PALACIO-BIELSA *et al.*, 2009), poner a punto protocolos sensibles y específicos de diagnóstico (CUBERO *et al.*, 1999), demostrar la migración bacteriana en varios huéspedes frutales (MARTÍ *et al.*, 1999) y la formación de biopelículas (ABARCA-GRAU *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado la eficacia del control biológico mediante las cepas K84 y K1026 (PENYALVER *et al.*, 2000), la transferencia de plásmidos entre cepas patógenas y agentes de biocontrol y el comportamiento de los transconjugantes (VICEDO *et al.*, 1996 y LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 1999), así como distintos mecanismos y genes implicados en la eficacia de dicho control (PENYALVER *et al.*, 2001 y 2009).

En cambio, *Dickeya spp.*, (antes *Erwinia chrysanthemi*), es mucho menos conocida y cepas de este género, que agrupa ahora a distintas especies responsables de podredumbres blandas en hortalizas y ornamentales, han sido identificadas como emergentes en Europa, incluida España. Bacterias de este género se han descrito aquí en patata, maíz, dieffenbachia, clavel y cebolla y se ha trabajado en métodos de identificación y en la caracterización de cepas (PALACIO-BIELSA *et al.*, 2006, 2007 y 2010). La patogenidad de la cepa Dd 3937 y su interacción con la planta ha sido intensamente estudiada y se han abordado aspectos moleculares de la bacteria y analizado, entre otros, el papel de los péptidos antimicrobianos, pH, distintos sistemas "multi drug resistance", estrés oxidativo o el papel del jasmonato en la defensa vegetal (LÓPEZ-SOLANILLA *et al.*, 1998 y 2001; MIGUEL *et al.*, 2000; LLAMA-PALACIOS *et al.*, 2000, 2003 y 2005; MAGGIORANI *et al.*, 2006 y RODRIGUEZ-SANZ *et al.*, 2010). Además, la disponibilidad del genoma completo de una cepa de esta especie ha permitido identificar algunos genes candidatos posiblemente implicados en quimiotaxis y en otros aspectos de interés fitopatológico (ANTÚNEZ-LAMAS *et al.*, 2009, GLASNER *et al.*, 2011).

Erwinia amylovora, responsable del fuego bacteriano de las rosáceas y también patógeno de cuarentena en la UE, era buscada y esperada en España desde la década de 1970, pero fue identificada por primera vez en España en 1995 en Guipúzcoa y posteriormente en otras regiones españolas (LÓPEZ *et al.*, 1999). Su aparición es la crónica de una bacteriosis anunciada, pero que afortunadamente ha avanzado más lentamente de lo previsto, posiblemente por lo acertado de las medidas tomadas. La necesidad de realizar prospecciones intensivas en todas las zonas de cultivo de especies sensibles obligó a diseñar técnicas serológicas (GORRIS *et al.*, 1996) y moleculares basadas en PCR (LLOP *et al.*, 2000), que forman parte del protocolo oficial de la EPPO (Anónimo, 2004). Actualmente, se han detectado distintos brotes en diez CC.AA. y se



Síntomas de *Erwinia amylovora* en peral.

han tomado drásticas medidas de erradicación, para las que han resultado imprescindibles los laboratorios de Diagnóstico de las CC.AA. y que hasta 2011 habían demostrado su eficacia en varias zonas. Se han estudiado las características de las cepas españolas utilizando distintas técnicas, que han permitido concluir que ha habido varias introducciones de *E. amylovora* en España, estando algunas directamente relacionadas con la importación de plantas de países de la UE (RICO *et al.*, 2004 y 2008; DONAT *et al.*, 2005 y 2007) y se ha evaluado también la virulencia de cepas (CABREFIGA y MONTESINOS, 2005; Ruz *et al.*, 2008). También, se han encontrado cepas con otro plásmido no previamente descrito (LLOP *et al.*, 2011), así como una nueva especie de *Erwinia*, denominada *E. piriflorinigra* (LÓPEZ *et al.*, 2011). Se ha demostrado la capacidad de *E. amylovora* de sobrevivir en agua (Santander *et al.*, 2011) y manzanas maduras (ORDAX *et al.*, 2009). También se ha visto que la bacteria entra en estado viable pero no cultivable por efecto del cobre y por falta de nutrientes (ORDAX *et al.*, 2006). Además, se han obtenido varios agentes de biocontrol y se ha estudiado su supervivencia (CABREFIGA *et al.* 2007; PUJOL *et al.*, 2005 y 2007) y su eficacia en distintas condiciones. También se han diseñado péptidos sintéticos y se ha evaluado su efecto antibacteriano (FERRER *et al.*, 2006; CABREFIGA *et al.*, 2011; GUELL *et al.* 2011).

En el género *Pseudomonas* nos encontramos con las causantes de viejas enfermedades, pero también de nuevas sintomatologías descritas y estudiadas en España. Entre las viejas conocidas se encuentran *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (objeto de otro artículo por lo que no se trata aquí) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, que es una de las bacterias más tempranamente descritas en España, por ser la causante de la grasa de la judía (SARDIÑA, 1939). Posteriormente, se han realizado estudios de caracterización de aislados españoles de este patovar (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; RICO *et al.*, 2003) y se han definido dos linajes genéticos en la especie, siendo uno no toxigénico (RICO *et al.*, 2003; OGUIZA *et al.*, 2004). Los determinantes de patogenidad de este patovar y su comparación con otros patovares y especies de *Pseudomonas*, han sido estudiados muy a fondo aquí y en colaboraciones con grupos extranjeros (GIBBON *et al.*, 1999; JACKSON *et al.*, 1999; SUNDIN and MURILLO, 1999; JACKSON *et al.*, 2000; SESMA *et al.*, 2000; RIVAS *et al.*, 2000 y 2005; AGUILERA *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2007; DE LA TORRE-ZAVALA *et al.*, 2011 y MURILLO *et al.*, 2011).

Pseudomonas syringae pv. *syringae* es otra especie conocida en España por afectar a frutales y ser causante de necrosis y marchitez de yemas en peral (MONTESINOS y VILARDELL, 1989 y 1991; MORAGREGA *et al.*, 1998, 2003) y por afectar también a cítricos, horticolas y ornamentales. En cambio, la necrosis apical del mango causada por esta bacteria (CAZORLA *et al.*, 1998), ha sido estudiada muy a fondo en Andalucía, ya que no existía ninguna información previa ni sobre la enfermedad que causa en esta especie, ni sobre su biología, patogenicidad bacteriana o métodos de lucha (CAZORLA *et al.*, 2002, 2006 y 2011; ARREBOLA *et al.*, 2003, 2007, 2009 y 2011 y KENNELLY *et al.*, 2007). Se trata de un claro ejemplo de cómo abordar el estudio de un problema desconocido y encontrar soluciones adaptadas a la zona.

Finalmente, *Ralstonia solanacearum* causa podredumbre y marchitez en las solanáceas cultivadas y es también un organismo de cuarentena en la UE. Esta bacteria no había sido citada en España hasta 1995, pero su aparición en distintos países europeos y su amplia presencia en Holanda, la hacía previsible en nuestro país. Se han identificado distintos brotes, especialmente en patatas importadas y de producción nacional, y también en tomate y/o aguas de Castilla-León, Castilla-La Mancha, País Vasco, Madrid, Extremadura y Andalucía. Se han puesto a punto métodos de detección, basados en anticuerpos monoclonales específicos y en PCR (CARUSO *et al.*, 2002 y 2003; MARCO-NOALES *et al.*, 2008), para el análisis en material vegetal y de agua. El estudio de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas españolas ha permitido determinar que se trata de cepas de la raza 3, biovar 2, filotipo 2, y que también han sido varias las introducciones identificadas. Además se han estudiado aspectos de la interacción con la planta (TITARENKO *et al.*, 1997). Se ha evaluado la supervivencia de cepas españolas en agua de riego y la influencia de la microbiota nativa, especialmente de fagos específicos, así como el efecto de bajas temperaturas en su supervivencia (CARUSO *et al.*, 2005; ÁLVAREZ *et al.*, 2007 y 2010). Se ha demostrado que en agua de río, a temperaturas inferiores a 15°C, la bacteria adopta el estado viable no cultivable, que es reversible cuando aumenta la temperatura (CARUSO *et al.*, 2000). Los efectos de la erradicación en España hasta ahora han sido satisfactorios, pero los riesgos de nuevas introducciones, y especialmente los focos de los ríos y arroyos, suponen un peligro constante para las solanáceas.

Conclusiones

La SEF ha pasado en estos treinta últimos años de tener un escaso número de socios bacteriólogos y muy poca información sobre la importancia real

de las bacteriosis en España, a tener más de 60 socios bacteriólogos (a tiempo completo o parcial) y un amplio conocimiento sobre bacterias y las enfermedades que causan. En unos casos las investigaciones tienen un puesto destacado a nivel mundial, a juzgar por la calidad de las revistas en las que se publican los trabajos y las citas de los mismos y en otros, aportan información fundamental sobre la incidencia de las distintas bacteriosis en cada CCAA, su erradicación u otros aspectos relacionados. Desgraciadamente, lo que no ha cambiado desde 1981 es la carencia de tratamientos eficaces para combatir estas enfermedades, pero en cambio, se dispone de nuevas herramientas moleculares, muy sensibles y específicas, para el diagnóstico de las mismas. Además, el conocimiento detallado de los procesos de patogénesis y de interacción bacteria-planta debería permitir identificar nuevas dianas que hagan posible el diseño de compuestos útiles para el control de estas enfermedades, bien por su eficacia frente al patógeno, o para incrementar la respuesta de defensa de la planta.

Los bacteriólogos de la SEF, que pertenecen a muchos organismos distintos, de casi todas las CCAA, reflejan el carácter transversal de nuestra sociedad y su múltiple proyección a distintos problemas y ámbitos. Nuestra tarea tiene cada vez más relevancia pública, lo que tiene sus pros y sus contras, ya que los avances, siempre serán considerados escasos para lograr el control de estas enfermedades. Lo que ocurra en el futuro próximo con la Bacteriología en la SEF y en España, dependerá en buena parte de la capacidad que tengamos sus miembros para detectar problemas no resueltos, imaginar nuevos objetivos y propuestas y diseñar instrumentos para lograrlos. Lo que se ha conseguido en estos 30 años es pasar de una presencia prácticamente inexistente a nivel nacional e internacional, a estar muy dignamente representados y ser visibles y claves en distintos temas bacterianos. Pero la realidad en muchos casos, es que el gran avance científico y la cantidad de conocimientos logrados, se debe más al esfuerzo y al entusiasmo de los grupos de investigadores, profesores, Laboratorios de Diagnóstico, técnicos, etc., que al apoyo recibido de las respectivas instituciones. Por eso, quisiera ser optimista y no pensar que con la excusa de la crisis económica nos podemos encontrar en el final de un ciclo de crecimiento exponencial, al que podría seguir un declive de la producción científica y técnica en el campo de las bacterias fitopatógenas, debido a la falta de financiación. Pero como decía el político italiano A. Gramsci, "*anteponemos el optimismo de la voluntad al pesimismo de la razón*".

BIBLIOGRAFÍA*

- URQUIJO P., SARDIÑA J.R., SANTAOLALLA G. 1971. *Patología Vegetal Agrícola*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- MELGAREJO P., GARCÍA-JIMÉNEZ J., JORDÁ M.C., LÓPEZ M.M.; ANDRÉS M.F., DURÁN-VILA M. 2010. *Patógenos de plantas descritos en España*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2ª edición), Madrid.
- DE ANDRÉS M.F., GARCÍA-ARENAL F., LÓPEZ M.M., MELGAREJO P. 2000. *Patógenos de plantas descritos en España*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- LLÁGER G., LÓPEZ M.M., TRAPERO A., BELLO A. 1996. *Patología Vegetal* vol.1, 695 pp. Ed. Sociedad Española de Fitopatología y PHYTOMA España S.L.

* Se indican sólo las referencias de las publicaciones generales, no de todas las citadas, dada la limitación de espacio.