

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
• <b>RESUMEN</b>	1
• <b>CAPÍTULO 1: Introducción, objetivos y justificación</b>	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
• <b>CAPÍTULO 2: <i>Erwinia amylovora</i> strains from outbreaks of fire blight in     Spain: phenotypic characteristics</b>	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
• <b>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</b>	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
• <b>CAPÍTULO 4: Polyphasic analyses of Spanish strains of <i>Erwinia amylovora</i> from eight regions</b>	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
• <b>CAPÍTULO 5: A fully virulent <i>Erwinia amylovora</i> strain carrying no plasmid pEA29 isolated in nature</b>	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

---

• <b>CAPÍTULO 6: Discusión general y conclusiones</b>	177
6.1. Discusión general	179
6.2. Conclusiones	191
• <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	193
• <b>ANEJOS: Publicaciones relacionadas</b>	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

