

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
Departamento de Biotecnología



Tesis Doctoral

**SUPERVIVENCIA DE *Erwinia amylovora* EN
CONDICIONES DE ESTRÉS: INFLUENCIA DE LA
PRESENCIA DE COBRE Y LA LIMITACIÓN DE
NUTRIENTES**

**Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias
y Universidad de Valencia**



Memoria presentada por: **MÓNICA ORDAX IBÁÑEZ**

Para optar al grado de:

DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Directoras:

Dra. MARÍA MILAGROS LÓPEZ GONZÁLEZ

Dra. ESTER MARCO NOALES

Dra. ELENA GONZÁLEZ BIOSCA

Valencia, 2008

D^ª María Milagros López González, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesora de Investigación del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), D^ª Ester Marco Noales, Doctora en Ciencias Biológicas, Colaborador Científico Adjunto del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del IVIA, y D^ª Elena González Biosca, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que D^ª Mónica Ordax Ibáñez ha realizado bajo su dirección, en el Laboratorio de Bacteriología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del IVIA, el trabajo que, con el título "Supervivencia de *Erwinia amylovora* en condiciones de estrés: influencia de la presencia de cobre y la limitación de nutrientes", 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 7 de enero de 2008.

Dra. María Milagros López González

Dra. Ester Marco Noales

Dra. Elena González Biosca

*“Si he visto más lejos es porque
estoy a hombros de gigantes”
("If I have seen further it is by standing
upon the shoulders of giants")*

[Isaac Newton, 1976]

A mis padres, mis gigantes

Agradecimientos

Alguien dijo una vez que “el agradecimiento es la memoria del corazón”... Quiero pues recordar a aquellas personas que, de una manera u otra, me han transmitido su aliento durante esta travesía.

A mis tres directoras por su extraordinaria labor que me ha permitido llegar hasta aquí. A la Dra. M^a Milagros López, por sus enseñanzas y buen hacer, su trato amable y apoyo incondicional, y su dedicación realmente incansable. A la Dra. Elena G. Biosca, por su profesionalidad tanto como por su amistad, por contagiarme su entusiasmo infatigable, por alentarme siempre y creer en mí. A la Dra. Ester Marco Noales, por su constancia y gran esfuerzo, por entenderme y ayudarme, por ser tan grande como directora y amiga. También por sumergirme (nunca mejor dicho!), en el mundo de la microbiología marina y la *Posidonia* que tanto me ha fascinado. A las tres agradecerles, además, su lucha por un contrato una vez que finalizó mi beca, depositando su confianza en mí para seguir creciendo como investigadora. Chiqui, Elena, Ester, GRACIAS POR TODO!!!

Al, Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de una beca predoctoral FPI, que aunque me alejó de mi “tierrina”, me acercó un sueño que me ha hecho crecer profesional y personalmente.

A mis compañeros de laboratorio. A Javi, por tantos secuestros y “adicciones”, porque siempre seremos y sobran las palabras... porque adoro su casa... También por abrirme su “reino” (gracias a toda su familia, por acercarme ese calor que tanto añoro, y a esa “mamina” a la que venero; gracias también a todos sus amig@s, en especial a mi “Amparín” y mi “Greca”). A Ramón, un gran amigo, por su entusiasmo que contagia, por nuestros conciertos y juegas, por la terraza, los “vuelta y vuelta”, las cañas y... hasta por los Risk! Gracias por seguir ahí aunque estés lejos. A Clara, porque la cuarentena no sería lo mismo sin ella!, pero también por demostrarme su apoyo y cariño en mi etapa más difícil... A Carmina, por

sus miminos, por ayudarme siempre y por ese corazón tan grande! A JM, compañero por excelencia, siempre amable y dispuesto, una gozada de niño que he tenido la suerte de disfrutar cada mañana! A Raquel, tan necesaria! A las últimas incorporaciones. A Morteza, todo un personaje que ha traído nueva "vidilla" al laboratorio (y a los congresos!) contagiándonos su alegría. A mi Ana, ese pedaaaso de torbellino, por su risa, confianza y complicidad; por ser en poco tiempo un gran apoyo para mí. A Begoña, última chica "Posi", por sus "momentazos" que tanto me han hecho reír.

Gracias también a algunos de los que no están, pero que nunca olvido. Paola, mi primera amiga aquí, por su confianza y por abrirme su casa desde mi llegada. Sin ella el aterrizaje habría sido duro. A Victoria, por su amistad en mis inicios, su sinceridad y su ayuda en mis comienzos "amylovorianos". A mi querida Heléne, dulce y cariñosa, que trajo consigo unos meses que nunca olvidaré. A Neus, que apareció un buen día con sus Posidonias y confió en mí. A Leandro, por ser una persona genial con la que merece la pena estar... sobre todo en los congresos! A Silvia, un encanto de niña con la que fue (y será!) todo un gusto el trabajar. A Montse, mi compañera de migrañas y nervios, por su cariño siempre que coincidimos. Gracias a todos los demás que han pasado por el laboratorio y con los que he compartido jornadas inolvidables!

A los queridos vecinos de enfrente. A Mariano, derrochando siempre simpatía, por acercarme la "tierrina" con su bable (mejor que el mío!) y con sus dichos que "prestáronme" siempre! Cuquín, que a ver si celebramos "esti xareu" luego con unos "culinos" y que... Puxa Axturies! A Edson, mi panterín, por tantas risas y confidencias compartidas, y porque es tan genial trabajar con él como ir de "fiestuki"! (pero... sin cantar eh?). A Arancha, por venir, por su amistad y por ser como es, una fía genial! (como ella diría, ele, ele, ele!). A Mari Carmen (esa guapísima mamá!) por su dulzura y cariño, a Nieves (otra guapísima Supermamá) por esa alegría andaluza que contagia por donde va, a Antonio por su humor tan

peculiar, a Eduardo por su apoyo (... y por cortarse el pelo!), a Maite por ayudarme siempre, a Consuelo por su simpatía, a Tere, por sus ánimos, y a Jaime, porque aunque coincidimos poco tiempo, sigue siendo un amigo.

A otros compañeros del IVIA. A Reme, gran amiga, por nuestras charlas y risas en el "camarote", por apoyarme, ayudarme y escucharme siempre que lo he necesitado (gracias también a su cuñada filóloga Eva, por sus correcciones en el resumen en valenciano de la tesis). A Mari, por su cariño y empuje, a Marta, siempre amable, a Carmen, por su energía y vitalidad, y a Pata, por su risa y buen humor! A Santi, por ser como es, por demostrarme sin él saberlo tantas cosas, por su alegría y bondad. A Emilio y Jordi, por su paciencia con la estadística, sus enseñanzas y su confianza. Gracias también a todos los demás (conserjería, biblioteca, informática, administración, cafetería, etc) que en algún momento me hayan ayudado (¡pido perdón por ser imposible nombrarlos a todos!).

A todos los colegas que me he ido encontrado en congresos y/o reuniones, y con los que he cargado pilas siempre que nos juntamos! A Emilio y Cayo con toda su gente, a Jesús, a mis queridos cuquinos zaragozanos Ana y mi solín Miguel, a Jose Luis Palomo y un largo etc... gracias también a Pep Gasol, Carlos Duarte y Nuria Marbá, con los que he tenido el gusto de colaborar. Agradecerles a todos el compartir no sólo el trabajo, sino también ¡tantos buenos momentos!

Nunca olvidaré mi pasado científico. Gracias a mi primera maestra Ana (SERIDA, Asturias), por la primera oportunidad y la más importante, por sus enseñanzas y sus ganas, por creer en mí. A Mati, su técnico, por su ayuda. A M. Carmen Mendoza (Microbiología, Universidad de Oviedo), por sus inolvidables clases y por su apoyo, junto con Ana, en mi Tesina.

También quiero hacer mención a mi presente. Agradecer a la empresa "Apple and Pear Australia Ltd." (APAL) y a la organización "Horticulture Australia Ltd." (HAL) su apoyo y confianza en mi trabajo, lo que me ha permitido seguir avanzando en la supervivencia de *E. amylovora* que tanto

me gusta. Gracias muy especialmente al Dr. Satish Wimalajeewa, mi ángel de la guarda y propulsor incansable de esta colaboración, por su fiel apoyo a todos los niveles! Para él con todo mi cariño, "with Metta".

A mis amigos que tanto echo de menos... Teresa y Eva, Kike y Belinda, Rober, Mario, Chus, Fran, Andrea y Alessandra, Julio y Ramón con su "Antigua" y toda su gente (imposible nombrar aquí a todos!)... GRACIAS por vuestro fiel apoyo y por tantos momentos de risas, confianzas, culinos, vinos y horas sin dormir! GRACIAS sobre todo por parar el reloj estos años, porque parezca que no me he ido... por hacerme sentir EN CASA.

A Iván, por aparecer, por seguirme y quedarse, por escucharme y entenderme, por acompañarme, por apoyarme y ser mis ojos... GRACIAS por demostrarme que a tu lado puedo enfermar... por "tu otra tesis", por cada 14 y por cada instante... por este sueño...

A Begoña, MariFe, Pili, Mari Carmen, Jorge, Tonín y demás familia de Iván, por su apoyo y cariño, ¡por ser tan grande!, y no por todos los que son, sino por cómo son... GRACIAS porque no podáis ser mejores.

A mis pilares, mi familia. A mis "papinos", por su ternura en la distancia y su energía en los momentos difíciles, por demostrarme que si se quiere se puede, por transmitirme sus ganas y su coraje ante la adversidad, por ser mis gigantes. A mi hermanín, por sus mimos y ánimos... por esforzarse ahora que todo es más difícil. A mi güelina Domi, por su energía y alegría. A mi güeli Maruja, por su fuerza y empuje, a mi tía Mari por su cariño y por seguir sonriendo, a mi tío Paco por haber luchado, y a Desiré y Alejandro porque cada día me demuestran su valentía con sus risas. Mi cariño especial a mi güelín y mi tío, que no han llegado al final, pero que siempre me apoyaron.

A TODOS, IVÁN, AMIGOS, FAMILIAS... ¡GRACIAS POR QUERERME Y POR HACER LA DISTANCIA PEQUEÑA! ESTA TESIS TAMBIÉN ES VUESTRA...

Finalmente, gracias al Tribunal por aceptar la evaluación de esta memoria.

“Absence of evidence is not evidence of absence”

[E. Billing, 10th International Workshop of

Fire Blight, Bologna, Italy, 2004]

ÍNDICE

Pág.

❖ Resúmenes	1-6
❖ <u>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS</u>	
1.1. El fuego bacteriano	9-18
1.1.1. Sintomatología y rango de hospedadores	
1.1.2. Distribución mundial	
1.1.3. Distribución en España	
1.2. <i>Erwinia amylovora</i> , el agente causal	18-28
1.2.1. Taxonomía y características generales	
1.2.2. Factores de virulencia: los exopolisacáridos	
1.3. Epidemiología: ciclo biológico de <i>E. amylovora</i>	29-33
1.4. Diagnóstico de fuego bacteriano	33-46
1.4.1. Aislamiento de <i>E. amylovora</i>	
1.4.2. Detección serológica	
1.4.3. Detección molecular	
1.4.4. Identificación	
1.4.5. Protocolo de diagnóstico (PM7/20, EPPO)	

1.5. Una estrategia de supervivencia bacteriana: 47-63
el estado viable no cultivable (VNC)

- 1.5.1. Supervivencia, viabilidad y muerte celular
- 1.5.2. El estado VNC: determinación y características
- 1.5.3. Reversión del estado VNC: recuperación o resucitación
- 1.5.4. Mantenimiento del poder patógeno en las células VNC
- 1.5.5. El estado VNC en la naturaleza: implicaciones epidemiológicas
- 1.5.6. El estado VNC en bacterias asociadas a plantas

1.5. Control del fuego bacteriano 64-76

- 1.6.1. Medidas preventivas
- 1.6.2. Control químico: cobre, antibióticos y otros
- 1.6.3. Control biológico
- 1.6.4. Control genético

1.7. Justificación y Objetivos 77-78

❖ **CAPÍTULO 2: “Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state” (2006, Appl. Environ. Microbiol. 72: 3482-3488)**

2.1. Abstract	81
2.2. Introduction	82-84
2.3. Materials and Methods	84-88
2.3.1. Inoculation of <i>E. amylovora</i> cells in mineral medium with copper	
2.3.2. Bacterial cell counts	
2.3.3. Culturability restoration or resuscitation of copper-induced VBNC cells	
2.3.4. SEM of <i>E. amylovora</i> cells in the presence of copper	
2.3.5. Pathogenicity assays of VBNC and resuscitated <i>E. amylovora</i> cells	
2.3.6. Statistical analysis	
2.4. Results	89-95
2.4.1. Copper induces the VBNC state in <i>E. amylovora</i>	
2.4.2. Resuscitation of copper-induced VBNC <i>E. amylovora</i> cells	
2.4.3. SEM of copper-induced VBNC <i>E. amylovora</i> cells	
2.4.4. Pathogenicity of copper-induced VBNC and resuscitated <i>E. amylovora</i> cells	
2.5. Discussion	96-101
2.6. Acknowledgements	102

❖ **CAPÍTULO 3: “Survival of *Erwinia amylovora* in water”**

3.A. Long-term starvation-survival of *Erwinia amylovora* in sterile irrigation water. (2006, Acta Hort. 704: 107-112)

3.A.1. Abstract	105-106
3.A.2. Introduction	106-107
3.A.3. Materials and Methods	108-109
3.A.3.1. Bacterial strains and water microcosms	
3.A.3.2. <i>E. amylovora</i> cell counts	
3.A.3.3. Infectivity assays in green pears	
3.A.4. Results	109-112
3.A.4.1. Survival of <i>E. amylovora</i> in water	
3.A.4.2. Pathogenicity assays	
3.A.5. Discussion	113-115

3.B. *Erwinia amylovora* survives in natural water. (Acta Hort. *in press*)

3.B.1. Abstract	116-117
3.B.2. Introduction	117-118
3.B.3. Materials and Methods	118-119
3.B.3.1. Bacterial strains and preparation of water microcosms	
3.B.3.2. <i>E. amylovora</i> cell counts	
3.B.3.3. Pathogenicity of <i>E. amylovora</i> in natural water	

3.B.4. Results	119-122
3.B.4.1. Fate of <i>E. amylovora</i> in natural water microcosms	
3.A.4.2. Pathogenicity of <i>E. amylovora</i> in natural water microcosms	
3.B.5. Discussion	122-124
3.B.6. Acknowledgements	124

❖ **CAPÍTULO 4: “Improvement of the recovery of *Erwinia amylovora* stressed cells on RESC, a simple, rapid, and differential culture medium” (Int. Microbiol., to be submitted)**

4.1. Abstract	127
4.2. Introduction	128-130
4.3. Materials and Methods	131-138
4.3.1. Bacterial strains	
4.3.2. Selection of the copper sulphate concentration for adding to KB medium	
4.3.3. Copper complexing measurements of KB broth	
4.3.4. Growth media and incubation conditions	

- 4.3.5. Evaluation of RESC medium *in vitro*: enumeration of *E. amylovora* cells from mixed cultures with epiphytic plant bacteria
- 4.3.6. Evaluation of RESC medium *in vivo*: isolation of *E. amylovora* from field samples
- 4.3.7. Evaluation of RESC medium for the enumeration of *E. amylovora* stressed cells
- 4.3.8. Statistical analysis

4.4. Results 138-148

- 4.4.1. Copper complexing ability of KB broth
- 4.4.2. Selection of copper sulphate concentration: the RESC medium
- 4.4.3. Colonial morphology of *E. amylovora* on RESC medium
- 4.4.4. Recovery efficiency of *E. amylovora* on RESC medium *in vitro*
- 4.4.5. Recovery efficiency of *E. amylovora* on RESC medium *in vivo*
- 4.4.6. Recovery efficiency of stressed *E. amylovora* cells on RESC medium

4.5. Discussion 148-153

4.6. Acknowledgements 154

❖ **CAPÍTULO 5: “Role of amylovoran and levan on the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress and starvation” (Appl. Environ. Microbiol., to be submitted)**

5.1. Abstract	157
5.2. Introduction	158-160
5.3. Materials and Methods	160-165
5.3.1. Bacterial strains and inoculation conditions	
5.3.2. Bacterial cell counts	
5.3.3. Direct and indirect EPS measurements	
5.3.4. Staining of EPS and bacterial morphology	
5.3.5. Quantification of copper-complexing ability of EPSs	
5.3.6. Effect of EPS extracts under copper and starvation stress conditions	
5.3.7. Statistical analysis	
5.4. Results	165-176
5.4.1. Influence of EPSs in the survival of <i>E. amylovora</i>	
5.4.2. Morphological changes in <i>E. amylovora</i> cells under stress conditions	
5.4.3. Copper complexing ability of <i>E. amylovora</i> cells and EPS extracts	
5.4.4. EPS extracts prolong the culturability of <i>E. amylovora</i> under stress conditions	
5.5. Discussion	176-182
5.6. Acknowledgements	183

❖ **CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES**

6.1. Discusión general 187-195

6.2. Conclusiones generales 195-197

❖ **CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA GENERAL** 199-226

RESUMEN GENERAL

La bacteria *Erwinia amylovora* es el agente causal del fuego bacteriano de las rosáceas, responsable de importantes daños en varios frutales de pepita y plantas ornamentales. Debido a su fácil diseminación y difícil control, está considerada como una enfermedad de cuarentena en la Unión Europea. A pesar de los numerosos estudios realizados sobre *E. amylovora*, aún no se conoce su ciclo biológico completo, y la información sobre su posible supervivencia en condiciones de estrés y/o en hábitats fuera de hospedadores susceptibles es aún muy escasa. Por ello, en esta memoria se ha planteado estudiar la supervivencia de *E. amylovora* en un medio mineral con cobre, metal ampliamente usado para el control de bacteriosis de plantas, así como en condiciones de oligotrofia de ambientes naturales como el agua. Los resultados han demostrado que *E. amylovora* es capaz de sobrevivir frente a dichas situaciones de estrés mediante su entrada en el estado denominado Viable No Cultivable (VNC). Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, *E. amylovora* recupera su cultivabilidad y su poder patógeno, por lo que el estado VNC puede ser considerado como una estrategia de supervivencia para la bacteria. Al observar que *E. amylovora* en condiciones adversas perdía su capacidad de formar colonias en un medio de cultivo sólido, pero mantenía su viabilidad y patogenicidad, se planteó aumentar la eficiencia de su recuperación en placa. Dado que el cobre es un micronutriente esencial que puede favorecer el crecimiento bacteriano en medios ricos, se optimizó uno de los medios de cultivo más empleados para el aislamiento de *E.*

amylovora añadiendo sulfato de cobre. Así, se consiguió potenciar el crecimiento de este patógeno en condiciones de estrés y retrasar la pérdida de cultivabilidad. También se comprobó que la presencia de cobre en el medio de cultivo producía un incremento acusado en la mucosidad de las colonias de *E. amylovora*. Este hecho, junto con la observación mediante microscopía electrónica de barrido de una cubierta engrosada sólo en las células expuestas a cobre, llevó a estudiar el papel de los exopolisacáridos (EPSs) en la supervivencia de *E. amylovora*. Se ha demostrado que tanto el amilovorano como el levano juegan un papel relevante en la supervivencia de este patógeno. Por un lado, ambos EPSs fueron capaces de quelar los iones cobre libres disminuyendo su toxicidad; por otro, parece que pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes. Con todo ello, los trabajos que forman parte de esta memoria aportan nueva información sobre las estrategias de supervivencia de *E. amylovora* ante ciertas condiciones desfavorables frecuentes en la naturaleza. Continuar avanzando en el conocimiento del ciclo biológico y la epidemiología de este patógeno contribuirá tanto a la optimización de su detección en el laboratorio como al control de la enfermedad en el campo.

RESUM GENERAL

El bacteri *Erwinia amylovora* és l'agent causal del foc bacterià de les rosàcies, responsable de grans perjudicis en diverses fruiters de llavor i plantes ornamentals. A causa de la seua fàcil disseminació i el seu difícil control, és considerada com a una malaltia de quarantena a la Unió Europea. Malgrat els nombrosos estudis que s'han realitzat sobre *E. amylovora*, encara no es coneix el seu cicle biològic complet, i la informació sobre la seua possible supervivència en condicions d'estrés i/o en hàbitats fora de l'hoste susceptible és encara molt escassa. Per aquestes raons, en aquesta memòria ens hem plantejat la supervivència de *E. amylovora* en un medi mineral amb coure, metall àmpliament utilitzat per al control de les malalties bacterianes de plantes, així com en condicions d'oligotrofia, limitació molt comú d'ambients naturals com ara l'aigua. Els resultats obtinguts han demostrat que *E. amylovora* és capaç de sobreviure davant d'aquestes situacions d'estrés mitjançant l'adopció de l'estat anomenat «viable no cultivable». Quan les condicions tornen a ser favorables, el patògen recupera la seua cultivabilitat i patogenicitat, per la qual cosa l'estat VNC pot ser considerat com a una estratègia de supervivència per al bacteri. Quan es va observar que *E. amylovora* en condicions adverses va perdre la seua capacitat de formar colònies en un medi de cultiu sòlid, però va mantenir la seua viabilitat i patogenicitat, ens van plantejar augmentar l'eficiència de la seua recuperació en placa. Atès que el coure és un micronutrient essencial que pot afavorir el creixement bacterià en medis rics, es va optimitzar un dels medis de cultiu més usats per a l'aïllament de *E. amylovora* mitjançant l'addició de sulfat de coure. D'aquesta

manera es va potenciar el seu creixement en condicions d'estrés i es va retardar la pèrdua de cultivabilitat. També es va comprovar que la presència de coure al medi de cultiu produïa un increment acusat de la mucositat de les colònies de *E. amylovora*. Aquest fet, amb l'observació per microscòpia electrònica d'exploració d'una coberta engruixida només en les cèl·lules amb coure, ens va conduir a estudiar el paper dels exopolisacàrids en la supervivència de *E. amylovora*. Es va demostrar que tant l'amilovorà com el levà tenen un paper rellevant en la supervivència d'aquest patogen. Així, mentre que d'una banda, ambdós foren capaços de quelar els ions lliures de coure y reduir, en conseqüència, la seua toxicitat, d'altra banda poden ser utilitzats com a font de carbó i energia en condicions d'escassetat de nutrients. Per tot allò, els treballs que formen part d'aquesta memòria aporten nova informació sobre les estratègies de supervivència de *E. amylovora* en certes condicions desfavorables en la natura. Avançar en el coneixement del cicle biològic i l'epidemiologia d'aquest patogen contribuirà tant a l'optimització de la seua detecció al laboratori como al control de la malaltia al camp.

GENERAL SUMMARY

The bacterium *Erwinia amylovora* is the causal agent of fire blight in the Rosaceae family, responsible of serious damages in several pome fruits and ornamental plants. Due to the easy dissemination and difficult control of fire blight, it is considered as a quarantine disease by the European Union. In spite of the numerous studies reported on *E. amylovora*, the knowledge of its life cycle is still incomplete, and the available information about its survival under stress conditions and/or out of its susceptible hosts is still scarce. Therefore, the objective for this thesis was to study the survival of *E. amylovora* in a mineral medium with copper, widely used for the control of bacterial plant diseases, as well as under starvation, common limitation in natural environments such as water. The results have proved that *E. amylovora* is able to survive under both stressful conditions adopting the viable but non-culturable (VBNC) state. When the environmental conditions turned favourable, the pathogen recovered its culturability and pathogenicity, so that the VBNC state can be considered as a survival strategy for this bacterium. Since it was observed that *E. amylovora* lost its culturability under adverse conditions, but maintaining its viability and pathogenicity, we proposed to increase its recovery efficiency on plates. Due to that copper is an essential micronutrient that can favour the bacterial growth in rich-nutrient media, we optimized one of the most employed culture media for the isolation of *E. amylovora* by adding copper sulphate. Thus, the growth of this pathogen under stress conditions was enhanced, and its loss of culturability was delayed. It was also observed that the presence of copper in the culture medium produced a notable increase in the

mucus of the *E. amylovora* colonies. This fact, together with the observation by scanning electron microscopy of an increase in the thickness of the external layer only in the cells exposed to copper, led to study the role of exopolysaccharides (EPSs) in the survival of *E. amylovora*. We demonstrated that amylovoran and levan played a relevant role in the survival of this pathogen. Thus, both EPSs were able to bind free copper ions, decreasing consequently their toxicity, and in addition, it seemed that they could be used as carbon and energy sources under nutrient deprivation conditions. Overall, the studies collected in this thesis give new information on the survival strategies of *E. amylovora* under certain adverse conditions in the nature. A deeper knowledge on the life cycle and epidemiology of this plant pathogen will contribute to a better detection and an optimized control of the disease in the nature.

1. Introducción general

1.1. EL FUEGO BACTERIANO

1.1.1. Rango de hospedadores y sintomatología

El fuego bacteriano es una de las enfermedades más graves que pueden sufrir los frutales de pepita y algunas plantas ornamentales de la familia de las rosáceas. Su nombre responde a su síntoma más característico, el aspecto quemado de las partes de la planta afectadas, como consumidas por el fuego (Fig. 1A). Desde su primera observación en Nueva York en 1780 en pomáceas [Burrill, 1883; Winslow y col., 1920], 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]. Sin embargo, la mayor parte de las especies afectadas pertenecen a la subfamilia *Maloidae*, y a ella pertenecen los géneros de frutales más frecuentemente afectados: *Pyrus* (peral), *Malus* (manzano), *Cydonia* (membrillero) y *Eriobotrya* (níspero). En cuanto a las plantas ornamentales y silvestres destacan a su vez, *Crataegus* (espino albar), *Chaenomeles*, *Cotoneaster*, *Photinia*, *Pyracantha* (espino de fuego), *Sorbus* (serbal) y *Stranvaesia* [Balduque y col., 1996; van der Zwet y Beer, 1995]. Dentro de otra subfamilia, *Rosoideae*, cabe señalar a *Rubus* como otro género de ornamentales bastante afectado. Además, esta enfermedad también se ha descrito hace poco más de una década en ciruelo japonés (*Prunus salicina*), especie perteneciente a la subfamilia *Amygdaloideae* [Mohan y Thomsom, 1996]. En la subfamilia *Spiraeoideae*, también se han descrito algunas especies sensibles,

pero únicamente en base a inoculaciones experimentales [van der Zwet y Keil, 1979].

Los primeros síntomas del fuego bacteriano suelen observarse en las flores o en frutos jóvenes necrosados en el corimbo [Balduque y col., 1998; Cambra y col., 2002]. Posteriormente, el avance de la infección por el pedúnculo es muy rápido (Fig. 1B), alcanzando la base de las ramas y pudiendo así llegar a otras nuevas [van der Zwet y Beer, 1995; Montesinos y López, 2000] (Fig. 1C). Los brotes jóvenes en crecimiento activo también son muy susceptibles a esta enfermedad, y en este caso, el marchitamiento provoca una pérdida de su rigidez, curvándose de forma característica, a modo de “cayado de pastor” (Fig. 1D) [Cambra y col., 2002]. En las hojas, el síntoma inicial es una necrosis del nervio principal, que puede ir acompañada de manchas necróticas distribuidas irregularmente por su superficie. Si la marchitez alcanza la base de una rama, ésta se extiende rápidamente a las demás hojas [van der Zwet y Beer, 1995]. Cuando el tiempo es templado y húmedo, se producen además exudados mucilaginosos en forma de gotas que contienen gran número de células bacterianas (Fig. 1E) [van der Zwet y Beer, 1995; Montesinos y López, 2000]. La edad de la planta no parece tener gran influencia en la sensibilidad del material vegetal, de forma que pueden encontrarse plantas afectadas ya desde el vivero cuando se trata de patrones o variedades muy sensibles [van der Zwet y Walter, 1996; Montesinos y López, 2000]. En ocasiones, si la necrosis continúa progresando puede llegar a afectar también a las ramas gruesas y al tronco formando chancros (Fig.1F) [Cambra y col., 2002]. Una vez la

enfermedad está muy avanzada, se puede observar la marchitez

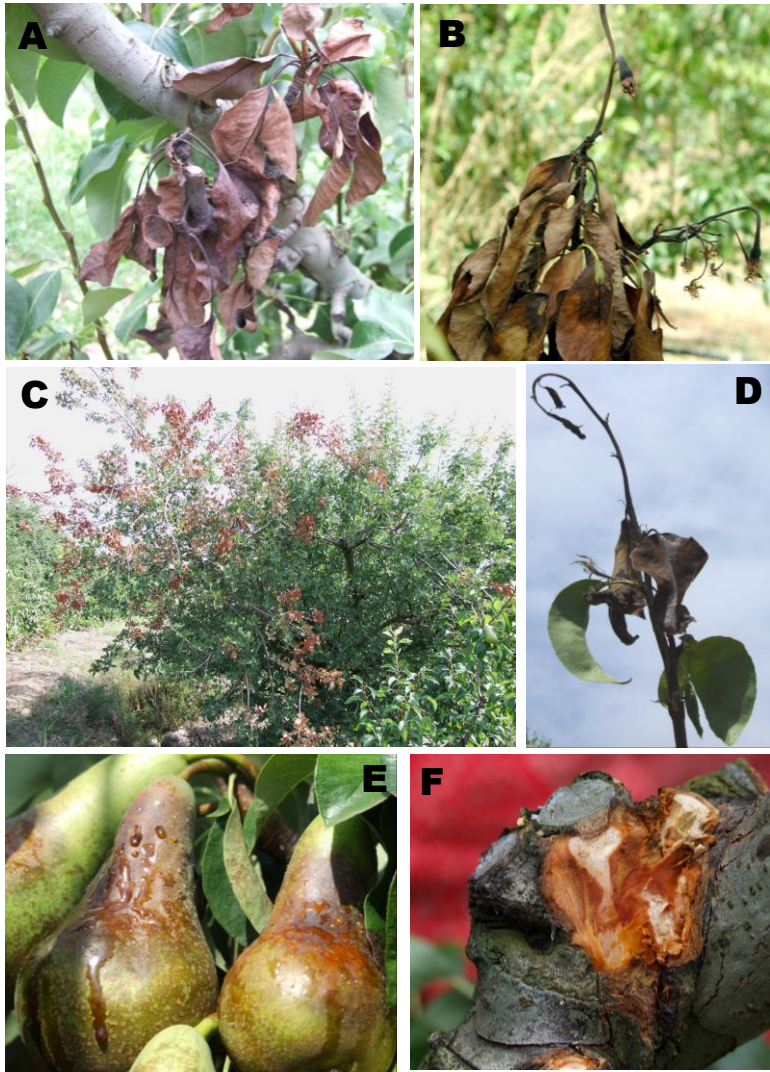


FIG. 1. Distintos síntomas de fuego bacteriano. A) rama de peral con aspecto “quemado”; B) infección desde la flor a la rama; C) acerolo con varias ramas afectadas; D) cayado de pastor en peral; E) exudados en peras; F) chancro en tronco de peral. (Fotografías: A, C-E. Marco-Noales y M. Ordax; B: M.A. Cambra; F: E. Marco-Noales, M. Ordax y M.T. Gorris).

de brotes y ramas, y el secado de inflorescencias, frutos y yemas que, a pesar de ello, permanecen en la planta y quedan como momificados [Balduque y col., 1996]. Tanto en la zona de avance de la enfermedad, como en el interior de la planta, los tejidos adquieren una coloración marrón-rojiza característica (Fig. 1D) [Balduque y col., 1996; 1998].

Otras partes de la planta, como el cuello y las raíces, rara vez se ven afectadas por esta infección, pero cuando así ocurre, se produce rápidamente la muerte de la planta [van der Zwet y Beer, 1995]. Generalmente, la especie hospedadora que presenta la sintomatología más llamativa es el peral (*Pyrus communis*) por ser la que tiene más cultivares de elevada susceptibilidad [van der Zwet y Beer, 1995].

La manifestación y velocidad de los síntomas depende en líneas generales de tres factores [Cambra y col., 2002]:

- Sensibilidad y receptividad de la planta: existen diferencias notables tanto entre variedades como entre los distintos estados vegetativos. Por ejemplo, los cultivares de peral suelen ser más sensibles que los de el manzano, y las flores son los órganos más susceptibles seguidos de los brotes en su fase de crecimiento activo y los frutos.
- Clima: se considera favorable si es húmedo y con temperaturas suaves superiores a los 18°C, como sucede en primavera.
- Cantidad de inóculo: a mayor severidad de daños, mayor producción de inóculo infectivo, y si, además, hay

producción de exudados, las cantidades de bacteria son máximas.

Los efectos del fuego bacteriano se consideran devastadores debido a su rápida migración en la planta, su alta capacidad de transmisión y las dificultades para su control, ocasionando considerables pérdidas de producción, y pudiendo provocar hasta la muerte de un porcentaje elevado de árboles en muy poco tiempo [Vanneste, 2000; Cambra y col., 2002]. Puesto que los daños se localizan preferentemente en las ramas de fructificación, las pérdidas económicas pueden llegar a ser muy importantes en zonas con cultivares muy sensibles a esta enfermedad. Así ocurrió por ejemplo en el noroeste de Estados Unidos en el año 1998, en el que las pérdidas alcanzaron los 68 millones de dólares [Bonn, 1999]. Además, el fuego bacteriano puede afectar no sólo a la cosecha de ese año, sino también a la de años posteriores. En Egipto se alcanzaron pérdidas en producción de hasta un 95% en el año 1985, en perales que habían sufrido la enfermedad los tres años anteriores [van der Zwet y Beer, 1995]. Los grandes daños que puede ocasionar esta enfermedad, han llevado incluso a abandonar el cultivo de plantas hospedadoras muy sensibles como el peral, en algunas zonas de Estados Unidos y Europa [van der Zwet y Keil, 1979]

Dentro de los frutales de pepita existe, como ya se ha apuntado, una clara sensibilidad varietal diferencial al fuego bacteriano [Thibault y Le Lezec, 1990; van der Zwet y Beer, 1995]. En peral, la mayoría de las variedades comerciales son muy sensibles (Alexandrine, Williams, Mantecosa Hardy, Passa Crassana, Abate

Fetel, Blanquilla, Guyot, Comice, General Leclerc, Limonera y Santa María) o medianamente sensibles (Conferencia), y además todos los portainjertos son sensibles [Thibault y Le Lezec, 1990; van der Zwet y Beer, 1995]. En manzano, las variedades de consumo en fresco son muy sensibles (Fuji, Reina de Reinetas y Verde Doncella). Como medianamente sensibles destaca Granny Smith, y como poco sensibles Golden Delicious, Royal Gala y Starking [Montesinos y López, 1998]. En manzano de sidra, la sensibilidad es alta en la variedad Avrolles, mediana en Peau de Chien y baja en Judor. En cuanto al níspero, la mayoría de variedades se han mostrado como muy sensibles, excepto algunas no bien identificadas [Tsiantos y Psallidas, 2004].

1.1.2. Distribución mundial

El fuego bacteriano se describió por primera vez en 1780 en Nueva York (Estados Unidos) [Burrill, 1883; Winslow y col., 1920], extendiéndose después a otras zonas de la costa atlántica norteamericana. A principios del siglo XX ya se había detectado en Japón y Nueva Zelanda, y en 1957 se detectó el primer foco en Europa, en el sur de Inglaterra [van der Zwet y Beer, 1995]. Posteriormente, se identificó en el norte de África (Egipto, 1960), y de nuevo en Europa en los Países Bajos (1966). Desde los primeros foco europeos la enfermedad ha ido avanzando por un lado hacia los demás países del noroeste europeo, y por otro al sureste europeo, llegando además a Israel y Turquía [van der Zwet y Beer, 1995]. Así, actualmente, el fuego bacteriano se distribuye en distintas zonas de los 5 continentes (Fig. 2), y se ha citado hasta

ahora en un total de 44 países. Sin embargo, esta enfermedad aún no ha sido descrita en importantes zonas frutícolas del hemisferio sur como Sudáfrica, Chile, Argentina o Brasil, a pesar de ser grandes exportadores de fruta de pepita [van der Zwet, 2000].

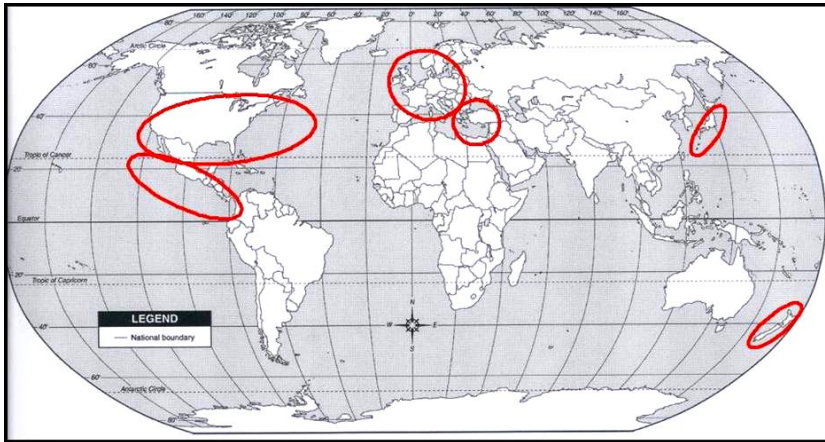


FIG. 2. Distribución mundial del fuego bacteriano (Donat, 2004)

1.1.3. Distribución en España

En nuestro país, el fuego bacteriano ha constituido una amenaza permanente desde el año 1978, cuando la enfermedad se detectó en el sur de Francia, cerca de la frontera española. Además, existía un riesgo añadido por la gran cantidad de importaciones de plantones de frutales y planta ornamental procedentes de países europeos donde estaba presente la enfermedad [López y col., 1988]. Por ello, desde entonces, en España se ha trabajado activamente con el fin de evitar su introducción, tomando tanto medidas legislativas, como informando de los riesgos a los agricultores y

analizando el material vegetal importado [López y col., 1988; López y col., 2002]. Así, desde 1993 el territorio nacional se ha considerado, y continúa siendo así en la actualidad, Zona Protegida (ZP) del fuego bacteriano de acuerdo con la legislación de la Unión Europea (UE). Así, según las directivas europeas 2000/29 y su modificación 2003/116, la enfermedad está considerada de cuarentena en la UE, estableciéndose medidas para evitar su introducción y propagación en las ZP. Además, con el Real Decreto (R.D. 2071/1993) [Anónimo, 1993] que sigue la legislación de la Unión Europea (UE), y con la Orden del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del 31.1.94, se creó el Programa Oficial de Reconocimiento y Mantenimiento de España como ZP.

Pese a todo lo expuesto, en el año 1995 se detectó el primer foco de fuego bacteriano en España, en concreto en Guipúzcoa (País Vasco), en una plantación de manzano de sidra a 10 km de la frontera francesa [Balduque y col., 1996]. Al año siguiente se detectó en zonas próximas a Navarra, afectando mayoritariamente a *Pyracantha* y a frutales. También se detectó la enfermedad en un vivero de Segovia en plantas de *Crataegus monogyna* importadas de Bélgica el año anterior, y a partir de este material vegetal se localizaron en años posteriores nuevos focos en Guadalajara y Segovia [Donat y col., 2005; 2007], así como en Burgos, Palencia y Valladolid, y más recientemente en León, alcanzando el presente año la zona de plantaciones de perales del Bierzo [Palomo, 2007]. En los años 1998-2000, la enfermedad fue detectada en plantas ornamentales en Jaca (Huesca) [Balduque y col., 1998], y en

frutales tanto cerca de Zaragoza [Cambra y col., 2004] como en La Rioja [López y col., 2002]. También se detectó la enfermedad en el año 1998 en perales de Lérida (Cataluña) [Montesinos y col., 1999] y en el 2003 un nuevo foco en Puigcerdá, muy cerca de la frontera francesa. En Cantabria, se detectó un único foco en el año 2004 en peral Nashi.

Se han tomado medidas estrictas de erradicación siguiendo tanto la legislación de la UE como la española, y hasta ahora, se he demostrado su efectividad. Por ello, a pesar de todos estos focos, el cumplimiento de las medidas de erradicación exigidas en el Programa Nacional de Erradicación y Control del Fuego Bacteriano (R.D. 1190/1998, R.D. 1201/1999 y R.D. 1512/2005) [Anónimo, 1998, 1999, 2005], mediante la destrucción de las plantas infectadas e incluso las sanas cuando están dentro de un radio de seguridad de cómo mínimo 10 m, seguidas de prospecciones y análisis periódicos en un círculo de 1 km, han hecho que la UE siga considerando a España como ZP. Así, en nuestro país todavía no se han sufrido las graves pérdidas económicas ni la reconversión varietal que esta enfermedad ha causado en otros países europeos como Italia y Francia. Gracias a la aplicación rápida y rigurosa de los programas de erradicación, se ha evitado el avance de la enfermedad en Comunidades Autónomas como Aragón, y se ha retrasado en otras como Cataluña y Castilla-La Mancha. Sin embargo, en regiones como Castilla-León [Palomo, 2007] y La Rioja, han continuado detectándose nuevos focos hasta el año 2007. Esta aparición de focos esporádicos de forma más o menos continua, junto con la

proximidad de España con países que ya tienen la enfermedad extendida, lleva a pensar que en un futuro próximo el fuego bacteriano podría extenderse a nuevas zonas de nuestro país.

1.2. *Erwinia amylovora*, EL AGENTE CAUSAL

1.2.1. Taxonomía y características generales de *E. amylovora*

El género *Erwinia*, que debe su nombre a la memoria del fitopatólogo Erwin F. Smith, se creó inicialmente para agrupar a las enterobacterias asociadas a las plantas, Gram negativas, bacilares, no formadoras de esporas y móviles [Brenner, 1984]. Además, se incluyeron miembros que en casos muy concretos pueden estar asociados también al hombre y a los animales. Esta definición llevó a una agrupación artificial de los microorganismos de este género en 4 grupos [Dye, 1968; 1969a,b,c]: “*amylovora*” para los patógenos causantes de marchitez y necrosis, “*carotovora*” para los que causan podredumbres blandas, “*herbicola*” para las bacterias saprófitas, y un último grupo con las erwinias atípicas. Conforme avanzaron las técnicas moleculares, los estudios taxonómicos posteriores no estuvieron de acuerdo con esta agrupación, y surgieron diversas reclasificaciones, hasta que en el año 1998 se establecieron cuatro grupos filogenéticos en base a la

comparación de secuencias del ADN ribosómico 16S [Hauben y col., 1998]:

- Género *Erwinia*: representa a las verdaderas erwinias y comprende a las especies *E. amylovora*, *E. persicinus*, *E. psidii*, *E. rhapontici*, *Pantoea agglomerans* (antes *E. herbicola*) y *E. tracheiphila*. Producen necrosis o marchitamientos en plantas, o bien pueden ser epífitas.
- Género *Pectobacterium*: incluye las especies *P. cactidium*, *P. carotovorum*, *P. chrysanthemi* y *P. cypripedii*. Ocasionalmente producen podredumbres blandas en una gran variedad de plantas debido a su gran actividad pectolítica. Este grupo ha sido revisado recientemente, y *P. chrysanthemi* ha pasado a ser *Dickeya chrysanthemi* [Samson y col., 2005].
- Género *Brenneria*: agrupa a las especies *B. alni*, *B. nigrifluens*, *B. paradisiaca*, *B. quercina*, *B. rubrifaciens* y *B. salicis*, que afectan a varias especies leñosas produciendo generalmente chancros con exudados. La especie *B. paradisiaca* ha pasado a denominarse actualmente *Dickeya paradisiaca* [Samson y col., 2005].
- Género *Pantoea*: contiene las especies *P. ananatis* y *P. stewartii*, patógenos oportunistas de plantas, animales y del hombre.

Además, se decidió que *E. amylovora* fuera la especie tipo del género *Erwinia*.

E. amylovora fue la primera bacteria que se demostró que causaba una enfermedad en plantas [Burrill, 1883]. Es un bacilo,

Gram negativo, anaerobio facultativo, de flagelación peritrica y con material capsular [Paulin, 2000].

La caracterización bioquímica de *E. amylovora* contempla una serie de características básicas, tanto culturales como fisiológicas, que permiten diferenciarla de otras erwinias [Holt y col., 1994; Paulin, 2000]:

- crecimiento anaeróbico débil
- formación de colonias levaniformes en agar nutritivo sacarosa
- ausencia de crecimiento a 36°C
- no producción de sulfhídrico a partir de cisteína
- licuefacción de la gelatina
- reducción de los nitratos a nitritos
- producción de sustancias reductoras de sacarosa
- requerimiento de ácido nicotínico en medio mínimo (única auxotrofia)
- producción de ácido a partir de compuestos orgánicos: ribosa, trehalosa, arabinosa, sorbitol, fructosa, glucosa, galactosa y sacarosa
- utilización de citrato, formato y lactato como fuentes de carbono y energía, pero no de tartrato, galacturonato ni malonato.

Existen excepciones recientes a esta caracterización, describiéndose otras erwinias fitopatógenas que presentan una gran similitud con *E. amylovora*, como *E. pyrifoliae* [Kim y col., 1999] y una nueva especie de *Erwinia* aislada en España propuesta como *E. piriflorinigrans* [Roselló y col., 2007].

La morfología colonial de *E. amylovora* depende, como en todo microorganismo, tanto de la composición química del medio de cultivo como de las condiciones de crecimiento (Tabla 1).

TABLA 1. Características coloniales de *E. amylovora* en los medios de cultivo más habituales para su aislamiento (modificado de Paulin, 2000).

Medio	Tipo	Morfología colonial	Referencia
KB	No selectivo	Circular, mucosa y de color blanquecino	King y col, 1954
SNA	No selectivo	Circular, mucosa, convexa y de color crema	Billing y col., 1961
MS	Semiselectivo	Circular, convexa y de color rojo-anaranjado	Miller y Schroth, 1972
CCT	Semiselectivo	Circular, convexa con borde brillante y de color violeta claro	Ishimaru y Klos, 1984
MM ₂ Cu	Semiselectivo	Circular, mucosa y amarilla	Bereswill y col., 1997

KB: King B; SNA: Sucrose Nutrient Agar; MS: Miller y Schroth; MM₂Cu: Minimal Medium 2 with Copper.

En cuanto a las envolturas celulares, destacar que *E. amylovora* tiene una cápsula polisacáridica implicada en patogenicidad [Bennet y Billing, 1978], y de la que hablaremos en detalle más adelante. Por otra parte, se ha demostrado una inusual y elevada susceptibilidad de su pared celular a los agentes surfactantes a bajas concentraciones, con una liberación de enzimas del espacio periplásmico al medio externo [Chatterjee y col., 1977]. La fracción lipídica de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de *E. amylovora* es la que comúnmente se ha descrito para las enterobacterias [Ray y col., 1986]. No ocurre así con su fracción de carbohidratos, que contiene algún componente inusual

dentro de esta familia, observándose incluso pequeñas diferencias entre las cepas patógenas y las que no lo son [Ray y col., 1986].

Como propiedades serológicas se ha demostrado que *E. amylovora* posee varios determinantes antigénicos [Slade y Tiffin, 1984]: el LPS, rugoso o liso, con y sin cadena lateral, respectivamente; el antígeno termoestable GAI, polisacárido común en todos los miembros del grupo "*amylovora*"; el antígeno TV, probablemente perteneciente a los exopolisacáridos capsulares y presente sólo en cepas patógenas; y el antígeno GAJ detectado en el material mucoso extracelular en cultivos puros.

Es importante señalar que no se ha encontrado relación entre las características serológicas y la patogenicidad, y que en estudios posteriores con anticuerpos monoclonales se ha demostrado la elevada homogeneidad serológica de *E. amylovora* [Gorris y col., 1996a,b]. En diversos trabajos [Paulin, 2000] se han obtenido anticuerpos monoclonales que han mostrado ser específicos para esta bacteria, lo cual resulta útil para su detección [Gorris y col., 1996a,b], como veremos después.

1.2.2. Factores de virulencia de *E. amylovora*

Se han realizado numerosos estudios sobre la patogenicidad de *E. amylovora*, lo que ha llevado a la identificación de cuatro factores esenciales para su patogénesis:

- los genes *hrp* ("hypersensitive response and pathogenicity"), que intervienen en el desarrollo de la reacción de hipersensibilidad (HR) en plantas no hospedadoras y/o en la patogénesis en las que sí lo son [Kim y Beer, 2000]

- los genes *dsp* ("disease specific") situados en una región contigua a la de los *hrp*, que se requieren para el desarrollo de los síntomas, pero no para la HR, y están regulados por uno de ellos [Bogdanove y col., 2000].

- los sideróforos, pertenecientes a la clase de las desferrioxaminas (DFOs), que funcionan no sólo como sistemas de adquisición de hierro de alta afinidad, sino también como agentes protectores, formando complejos con este metal e interrumpiendo la reacción de estrés oxidativo generada por la planta en las fases iniciales de la infección [Expert y col., 2000]

- los polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPSs), que forman una cápsula alrededor de la célula bacteriana, protegiéndola de las reacciones defensivas de la planta y jugando un papel crucial en la patogenicidad [Geider, 2000].

Tanto los genes *hrp* como los EPSs son considerados como los factores de patogenicidad clave [Eastgate, 2000]. Nos centraremos en los EPSs puesto que constituyen el objeto de uno de los trabajos descritos en esta memoria.

1.2.2.1. Los exopolisacáridos

E. amylovora produce tres tipos de EPSs: amilovorano, levano y glucano, éste último minoritario y poco estudiado en esta bacteria [Bugert y Geider, 1995]. El amilovorano es un heteropolímero complejo, de elevado peso molecular (10^6 Da) y con aproximadamente 1000 unidades de azúcar por molécula [Jumel y col., 1997]. Está constituido básicamente por un residuo de ácido glucurónico y cuatro de galactosa con unidades repetitivas de piruvato y grupos acetato (Fig. 3) [Nimtz y col., 1996].

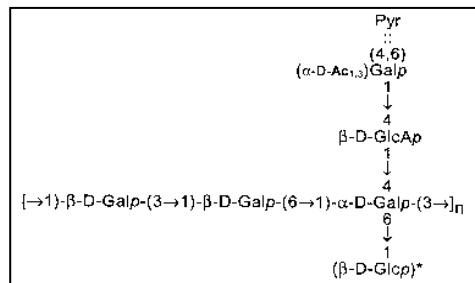


FIG. 3. Estructura química del amilovorano (Geider, 2000)

Su biosíntesis está codificada por el operon cromosómico *ams* ("amylovoran synthesis") (Fig. 4), constituido por 12 genes (desde *amsA* a *amsL*) [Bugert y Geider, 1995; Bereswill y Geider, 1997; Bugert y Geider, 1997], que cooperan realizando distintas funciones:

- *amsA* y *amsL*, como componentes de un transportador de membrana
- *amsB*, *amsD* y *amsE*, con actividades transferasa de azúcares
- *amsG*, homólogo de una transferasa de lípidos, lo que sugiere que la biosíntesis del amilovorano puede estar ligada a la membrana externa
- *amsF*, una polisacárido polimerasa
- *amsH*, implicado en la translocación del amilovorano a través de la membrana externa
- *amsI*, una ácido fosfatasa
- *amsM* y *galE*, se han descrito recientemente y se cree que codifican una UDP-glucosa fosforilasa y epimerasa respectivamente y que hay una interacción entre ellos [Geider, 2006].

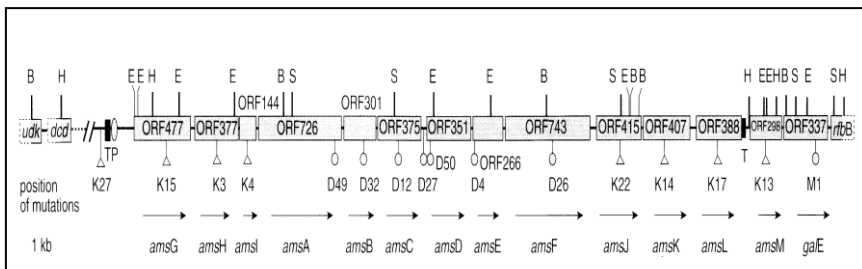


FIG. 4. Mapa genético del operón cromosómico *ams* que codifica para la síntesis de amilovorano en *E. amylovora*. P: promotor; T: terminador; B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; H: *Hind*III; S: *Sal*I (Geider, 2000).

El levano, por el contrario, es un homopolímero de fructosa (Fig. 5), de bajo peso molecular (46.592 Da) y de síntesis sencilla, polimerizándose el azúcar extracelularmente mediante el enzima levanosacarasa [Gross y col., 1992]. El enzima está

codificado por el gen *lsc* [Geier y Geider, 93], y además de su actividad hidrolizando la sacarosa y polimerizando la fructosa (Fig. 5), cataliza otras dos reacciones: la hidrólisis de levano a monosacáridos de fructosa, y el intercambio de [^{14}C]glucosa por fructosa-2,1-[^{14}C]glucosa + glucosa [Hettwer y col. 1995].

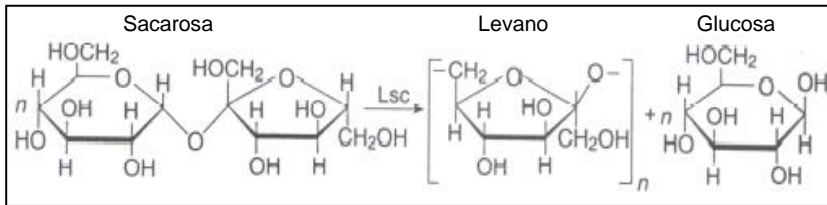


FIG. 5. Síntesis de levano (β -2,6-fructofuranan) a partir de sacarosa mediante el enzima levanosacarasa (Lsc) (Geider, 2000).

La biosíntesis del amilovorano está regulada por los genes *rca* ("regulation of capsular synthesis") mediante un sistema análogo al del ácido colánico en *E. coli*. Básicamente (Fig. 6), la proteína RcsC que actúa como un sensor ambiental fosforila a RcsB que se une entonces a la proteína potenciadora RcsA, o a una muy similar a ella, RcsV. La función de esta última en *E. amylovora* aún no se conoce bien ya que esta bacteria la produce a niveles mínimos [Geider, 2000]. Lo que sí se sabe es que es el heterodímero RcsA/RcsB el que se une al promotor del operón *ams* activando su transcripción [Kelm y col., 1997; Wehland y col., 1999]. Por lo tanto, la síntesis del amilovorano está influenciada principalmente por estos dos reguladores positivos [Bereswill y Geider, 1997; Geider, 2000], muy conservados en las enterobacterias. Una mutación en *rcaA* o *rcaB* causa una importante reducción en la síntesis de amilovorano y la consecuente disminución en la virulencia [Bernhard y col., 1990;

Bereswill y Geider, 1997]. También se ha apuntado que AmsA y AmsI podrían actuar como tirosin-quinazas transductoras de señales, regulando la síntesis del amilovorano en respuesta a estímulos ambientales [Bugert y Geider, 1997; Ilan y col., 1999].

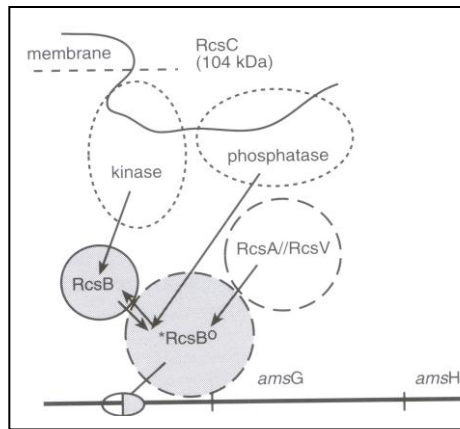


FIG. 6. Modelo de regulación de la síntesis de amilovorano (Geider, 2000).

Aunque, como ya mencionamos anteriormente, la expresión del enzima levanosacarasa es independiente de la presencia de sacarosa, la producción de levano en *E. amylovora* está regulada por los genes *rls* ("regulation of levansucrase synthesis"): *rlsA* [Zhang y Geider, 1999], *rlsB* [Du y Geider, 2002] and *rlsC* [Du y col., 2004], todos ellos activadores de la expresión del gen de la levanosacarasa (*lsc*). Los dos últimos se sitúan "aguas arriba" del gen *lsc*, mientras que *rlsA* se encuentra en una región adyacente a la *hrp*. Según estudios recientes las proteínas Rls no afectan directamente a la transcripción del gen *lsc* y además están débilmente relacionadas entre ellas [Geider y col., 2006]. Recientemente, también se ha demostrado una regulación global de ambos

EPS, amylovorano y levano, por una proteína de unión al ADN denominada H-NS, que se une preferentemente a la región *Isc* y también, aunque de forma más débil, al promotor del gen *rlsB* [Hildebrand y col., 2006]. Se ha sugerido que esta proteína podría estar relacionada con la "sensibilidad" de *E. amylovora* a las condiciones ambientales que la rodean y con un ajuste del metabolismo celular de acuerdo a ellas [Geider y col., 2006; Hildebrand y col., 2006].

Los EPSs de *E. amylovora*, en su condición de factores esenciales para la patogenicidad, realizan una serie de funciones clave tanto para el inicio como para el avance, desarrollo y diseminación de la enfermedad. Así, estos EPSs tienen la capacidad de enmascarar componentes de la superficie bacteriana que pueden activar los mecanismos defensivos de la planta; retienen agua y nutrientes; promueven la invasión de los tejidos aumentando su volumen por hidratación y aumentando la presión, y provocan la maceración y el colapso de éstos [Vanneste, 1995]. El papel fundamental de los EPSs en la patogénesis de *E. amylovora* se ha confirmado con la creación de mutantes, ya sea en genes implicados en su biosíntesis o en su regulación [Geider, 2000]. Se ha observado que los mutantes que no son capaces de sintetizar amylovorano no son patógenos, mientras que los que no producen levano sólo tienen afectada su virulencia. Además, los EPSs juegan un papel importante en la transmisión del patógeno, constituyendo los exudados en las plantas infectadas y protegiendo de la desecación a las células bacterianas que hay en ellos [Bennet y Billing, 1980].

1.3. EPIDEMIOLOGÍA: CICLO BIOLÓGICO DE *E. amylovora*

Para que la bacteria *Erwinia amylovora*, desarrolle los síntomas de esta enfermedad es necesario que existan tanto un hospedador susceptible como unas condiciones climáticas favorables. Las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de esta enfermedad comprenden temperaturas de entre 18 a 29°C y la presencia de una elevada humedad relativa por lluvias o rocío [van der Zwet y Beer, 1995].

Desde la década de los 70 hasta ahora, el ciclo del fuego bacteriano ha sido descrito en varias ocasiones [Beer, 1976; van der Zwet and Keil, 1979; Jones y Aldwinckle, 1990; van der Zwet y Beer, 1995; Thomsom, 2000]. Sin embargo, aún existen aspectos poco estudiados. Se considera que se inicia en primavera (Fig. 7), ya que las infecciones primarias se producen generalmente en esta época, ya sea a partir del inóculo de la propia planta (la bacteria puede invernar en los chancros o permanecer como epífita y/o endófito en los tejidos [van der Zwet y col., 1988]) o del proveniente de otras áreas (mediante insectos, lluvia, viento, etc) [Sobiczewski y col., 1997; Thomsom, 2000]. Los chancros, que se forman generalmente en otoño sobre el tronco o las ramas más viejas, están considerados como la principal fuente de inóculo. Se ha determinado que el lugar de hibernación de *E. amylovora* en los chancros, no son los tejidos muertos, sino los adyacentes aparentemente sanos [van der

Zwet and Keil, 1979]. El aumento de estos chancros durante el invierno puede causar graves pérdidas en la primera etapa de la estación de crecimiento del árbol [van der Zwet and Keil, 1979]. Es el denominado "inóculo no controlado" [Balduque y col., 1998; Cambra y col., 2002], ya que es esta fase inicial del ciclo de *E. amylovora* la que más incógnitas presenta debido a que el patógeno se puede diseminar por distintas vías y de diversas maneras [Sobiczewski y col., 1997; Thomsom, 2000]. Así por ejemplo, el inóculo del patógeno en estos chancros, aunque a veces forma visibles gotas de exudado en la superficie, se ha observado que en otras ocasiones no es así y puede pasar inadvertido [van der Zwet and Keil, 1979]. Del mismo modo, *E. amylovora* puede sobrevivir durante largos períodos tanto en la superficie como en el interior de otros tejidos vegetales sin mostrar síntomas [van der Zwet y col., 1988].

Posteriormente, en primavera, cuando las condiciones climáticas son favorables, la bacteria se multiplica constituyendo el llamado "inóculo primario", que sirve para iniciar las primeras infecciones del período vegetativo. El patógeno puede ser diseminado tanto a corta distancia (lluvia, viento, insectos, maquinaria y herramientas agrícolas, poda...), como a larga distancia (transporte de material vegetal infectado, aves migratorias...). Una vez que llega a las flores, o a los brotes en crecimiento, *E. amylovora* es capaz de entrar en ellos por sus aberturas naturales, o por posibles heridas producidas por agentes externos como granizadas, picaduras de insectos, poda, etc. Después, el patógeno avanza rápidamente en sentido descendente al pedúnculo floral,

ramas, brotes y/o frutos inmaduros [López y col., 1988; van der Zwet y Beer, 1995; Thomsom, 2000]. Los tejidos afectados aparecen inicialmente humedecidos, para después tornarse pardos o rojizos y acabar por necrosarse.

Una vez se ha producido la infección primaria y el patógeno ha avanzado por los tejidos haciendo progresar la infección, se suelen producir, en los tejidos con síntomas, los característicos exudados, que contienen gran cantidad de bacterias. Estos exudados, que se pueden producir en brotes, hojas, frutos y/o ramas, pueden actuar como "inóculo secundario" y ser diseminados, causando entonces nuevas infecciones o infecciones secundarias [Beer, 1976; López y col., 1988; Thomsom, 2000]. Generalmente, las infecciones secundarias son más peligrosas que las primarias por varias razones: son más numerosas, causan daños más graves en los árboles y existen mayores posibilidades de diseminación (con la aparición de los frutos son más los órganos vegetales que pueden producir inóculo, y al mismo tiempo hay un mayor número de órganos susceptibles y de insectos que pueden ayudar en la dispersión).

Además, durante la primavera y el verano pueden tener lugar numerosos ciclos de infección dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad, y que durarán hasta el final del período vegetativo del hospedador [López y col., 1988]. En este sentido cabe destacar las floraciones secundarias, ya que las flores son muy sensibles a esta enfermedad.

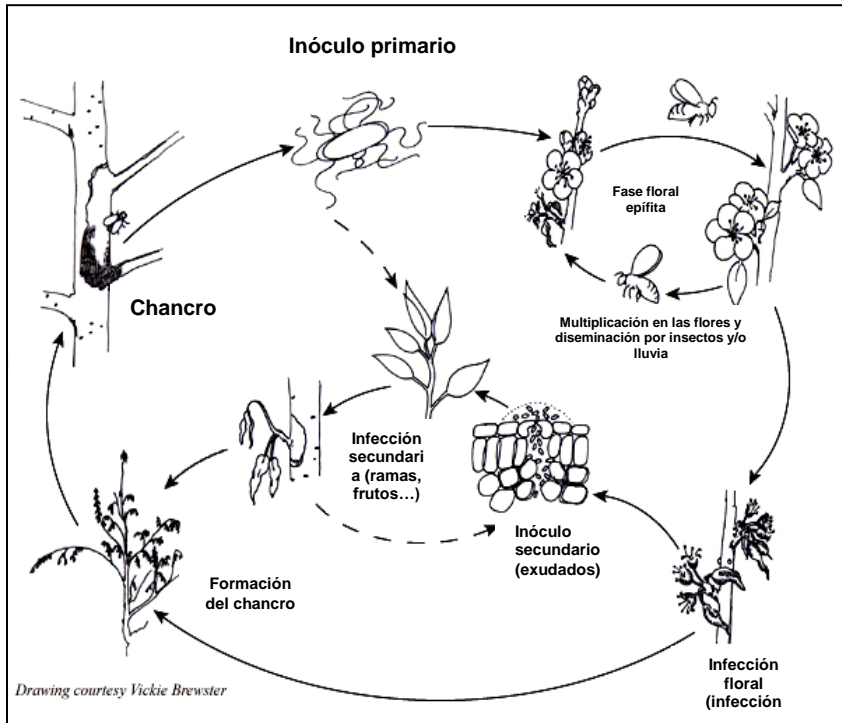


FIG. 7. Ciclo biológico del fuego bacteriano (modificación ciclo APS en <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/FireBlight/discycle.htm>.)

Con la llegada de nuevo del otoño y el invierno, al final del período vegetativo de la planta se forman en ramas, troncos y a veces en brotes, los chancros que ayudan a la bacteria a sobrevivir durante el invierno. También se ha observado que *E. amylovora* puede persistir en otras partes del huésped como brotes necrosados, hojas, frutos momificados e incluso en el suelo y en restos de vegetales infectados [López y col., 1988]. Además, como se ha mencionado anteriormente, la bacteria parece que es capaz de sobrevivir en órganos asintomáticos o aparentemente sanos [Baldwin y Goodman, 1963]. La parada

en el crecimiento de la bacteria en las plantas, coincide con el descenso de las temperaturas y la consecuente parada vegetativa de la planta [López y col., 1988; Vanneste y Eden-Green, 2000]. Cuando vuelva la primavera, unas condiciones climáticas favorables permitirán de nuevo la multiplicación de la bacteria.

Es bien sabido que el conocimiento del ciclo de una enfermedad es esencial para el control eficaz de la misma. Sin embargo, aunque se ha reconocido la gran capacidad de diseminación y supervivencia, tanto epífita como endófito, de *E. amylovora* [van der Zwet and Beer, 1995; Thomsom, 2000], la información acerca de su ciclo de vida fuera de huéspedes susceptibles es aún muy escasa, desconociéndose la importancia real de otros posibles reservorios y vehículos de transmisión de la enfermedad como el agua, las herramientas agrícolas, plantas no hospedadoras, etc., que podrían explicar, en algunos casos, la inesperada aparición de focos de fuego bacteriano y la dificultad en su control.

1.4. DIAGNÓSTICO DEL FUEGO BACTERIANO

El diagnóstico del fuego bacteriano implica tanto el reconocimiento de los síntomas característicos de la enfermedad, ya descritos previamente en otro apartado, como el aislamiento e identificación de *E. amylovora*, su agente

causal. Los síntomas del fuego bacteriano pueden confundirse con los ocasionados por otra bacteria fitopatógena, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, e incluso en ocasiones, por los causados por insectos como *Janus compressus* o larvas como las de *Zeuzera pyrina* [Balduque y col., 1998], o por meras alteraciones fisiológicas en la planta hospedadora [Balduque y col., 1996]. Además, el hecho de que *E. amylovora* esté considerada como un patógeno de cuarentena en la UE hace que se exijan toda una serie de medidas fitosanitarias para evitar la propagación de la enfermedad [Anónimo 2000, 2003], entre las que obviamente se incluye también el análisis de material vegetal asintomático. Por todo ello, resulta imprescindible confirmar la presencia de *E. amylovora* en este tipo de material vegetal mediante técnicas de detección, que debido a la posibilidad de infecciones latentes y la presencia del patógeno en números bajos, cada vez se requiere que sean más sensibles, además de rápidas, específicas y fiables [López y col., 2003; 2006]. Además, la distribución de la bacteria en la planta no es homogénea, por lo que los análisis, principalmente en el caso de plantas asintomáticas, pueden dar falsos resultados negativos.

Las técnicas de diagnóstico del fuego bacteriano y de detección de la bacteria en plantas sin síntomas se basan en el aislamiento de la bacteria y su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas, serológicas, moleculares y ensayos de patogenicidad. Además, como pruebas rápidas de detección se utilizan también las técnicas serológicas y moleculares

directamente del extracto vegetal de la muestra, con o sin enriquecimiento previo.

1.4.1. Aislamiento

Los métodos de aislamiento y la obtención de cultivos puros de *E. amylovora*, aunque requieren varios días, permiten la posterior identificación bioquímica y verificación del poder patógeno, por lo que deben ser utilizados siempre que las muestras requieran una confirmación de la presencia de células patógenas de esta bacteria. Además, de acuerdo a la norma PM7/20 publicada por la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), única recomendación existente en cuanto a protocolos de diagnóstico de *E. amylovora*, el aislamiento es la única prueba definitiva y concluyente que confirma la presencia del patógeno en la muestra [EPPO, 2004]. Según esta norma, para el aislamiento directo de este patógeno las muestras vegetales con síntomas (flores, brotes, yemas, hojas, frutos y/o tejido subcortical procedente de chancros) se maceran en un tampón antioxidante [Gorris y col., 1996a], tampón fosfato salino o agua destilada estéril. En el caso de muestras asintomáticas, como la bacteria puede estar presente en números muy bajos, se recomienda un paso intermedio de enriquecimiento en medio líquido no selectivo y semiselectivo para favorecer su multiplicación.

Los medios de cultivo recomendados, tanto en forma líquida para los enriquecimientos como sólida para los aislamientos, son los medios no selectivos KB [King y col., 1954] y SNA [Billing y col., 1961], y el semiselectivo CCT [Ishimaru y Klos,

1984]. En KB, el crecimiento de *E. amylovora* es rápido y sus colonias son blancas, circulares, mucosas y con un diámetro de 2-5 mm a las 24-48 h (Fig. 8A) [Paulin y Samson, 1973]. Este medio permite diferenciar las colonias de *E. amylovora* de las de *Pseudomonas syringae*, ya que estas últimas producen un pigmento fluorescente visible bajo luz ultravioleta. En el medio SNA con un 5 % de sacarosa [Lelliot, 1967; Hildebrand y col, 1988] *E. amylovora* muestra unas colonias blancas, circulares y mucosas, típicamente abombadas y de 3-7 mm de diámetro en 2 días (Fig. 8B) [Billing y col., 1961]. El aspecto abombado se debe a la producción de levano a partir de la sacarosa presente en el medio. El medio semiselectivo CCT contiene como fuentes de carbono sacarosa al 10% y sorbitol al 1%, y como ingredientes para conseguir la selectividad tergitol aniónico, nitrato de talio, cicloheximida y cristal violeta [Ishimaru y Klos, 1984]. En consecuencia, el crecimiento de *E. amylovora* es algo más lento (2-3 días), pero la morfología que muestran sus colonias es muy característica: circulares, abombadas y mucosas, algo más grandes (4-10 mm de diámetro), color violáceo pálido, superficie lisa y borde brillante (Fig. 8C). El medio CCT muestra un buen nivel de selectividad, si bien otras bacterias comunes asociadas a las plantas como *P. agglomerans* y *Pseudomonas* sp. también pueden crecer en él, aunque su crecimiento se ve ligeramente inhibido y muestran una morfología colonial diferente [Ishimaru y Klos, 1984].

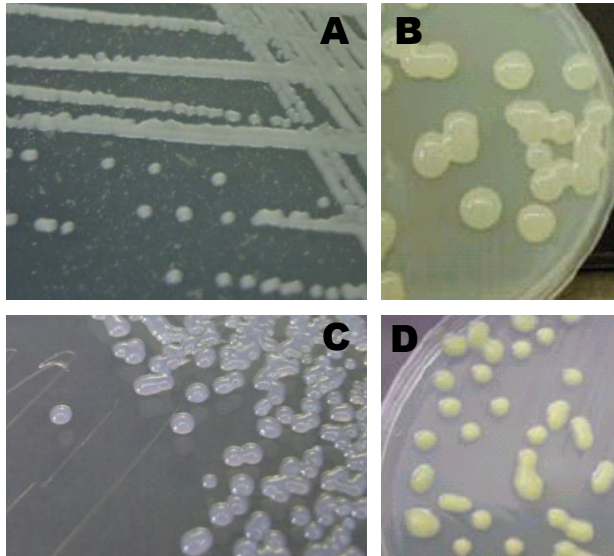


FIG. 8. Morfología colonial de *E. amylovora* en diferentes medios de cultivo. A) KB; B) SNA; C) CCT; D) MM₂Cu. (Fotografías: A y C, M. Ordax; B y D, V. Donat)

Existen otros medios semiselectivos que, aunque no recomendados por la EPPO, son usados en algunos laboratorios. Uno de ellos es el medio MS [Miller y Schroth, 1972], en el que las colonias de *E. amylovora* son rojo-anaranjadas debido a la fermentación del sorbitol en presencia del indicador de pH azul de bromotimol, mientras que las de *Pseudomonas* sp. son azules [Jones y Geider, 2001]. Sin embargo, la morfología de *P. agglomerans* es muy similar [Jones y Geider, 2001], y además es un medio caro, laborioso en cuanto a su preparación y de corta duración de almacenamiento. Más recientemente se publicó el medio semiselectivo MM₂Cu [Bereswill y col., 1998], en el que *E. amylovora* crece formando colonias muy mucosas y

de un amarillo característico (Fig. 8D) debido a la presencia de cobre, lo que permite su diferenciación de otras bacterias. Aunque lleva asparagina para compensar la inhibición de crecimiento por el metal, las colonias no muestran claramente el aspecto típico de *E. amylovora* hasta como mínimo 3-4 días.

1.4.2. Detección serológica

En cuanto a la detección serológica de *E. amylovora*, la técnica ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") con sus variantes son las que se utiliza rutinariamente [Sobiczewski y col., 1997], aunque también puede emplearse la inmunofluorescencia. Cuando se usan anticuerpos policlonales son frecuentes las reacciones cruzadas con otras bacterias presentes en la muestra. Sin embargo, con el uso de anticuerpos monoclonales, se evitan estos problemas y además se pueden emplear directamente con material vegetal, permitiendo un procesamiento rápido y automatizado de un gran número de muestras. Así, empleando este tipo de anticuerpos se alcanzan sensibilidades de 10^6 ufc/ml mediante ELISA-DAS (Double Antibody Sandwich ELISA) [McLaughlin y col., 1989] o de hasta 10^5 por ELISA-DASI (Double Antibody Sandwich Indirect ELISA) [Gorris y col., 1996a,b]. No obstante, el método serológico más sensible y específico para *E. amylovora* se ha desarrollado en los Laboratorios de Bacteriología y de Virología e Inmunología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA): el método ELISA-DASI-Enriquecimiento permite la detección de hasta 10-100 ufc/ml en extractos de material vegetal [Gorris y col., 1996a,b]. Como su propio nombre indica

se basa en una fase previa de enriquecimiento en los medios de cultivo líquidos KB o CCT seguida de una inmunodetección por ELISA-DASI utilizando anticuerpos monoclonales específicos [Gorris y col., 1996a,b]. Este sistema ha sido comercializado en un estuche de diagnóstico por la empresa Plant Print Diagnostics, tras un convenio con el IVIA.

Los mismos laboratorios han desarrollado también la técnica de inmunopresión-ELISA para *E. amylovora* [Cambra y col., 1996]. Se trata de realizar una impresión de la muestra en una membrana de nitrocelulosa seguida de un análisis serológico con anticuerpos monoclonales específicos. Tiene la ventaja de que no es necesaria la preparación de extractos, ya que el material vegetal fresco se inmoviliza directamente en las membranas de nitrocelulosa, y que además, se pueden almacenar hasta su revelado. Sin embargo, esta técnica se recomienda sólo en casos de plantas con síntomas como confirmación del diagnóstico, ya que pueden aparecer interferencias con el color que presentan las impresiones de algunos tipos de material vegetal.

Otra técnica serológica es la inmunofluorescencia, aunque en el caso de *E. amylovora* ha sido menos empleada que las técnicas ELISA, especialmente porque la escasez de anticuerpos comerciales de aceptable especificidad favorece los falsos positivos debido a las reacciones cruzadas. Sin embargo, algunos laboratorios la prefieren como técnica rápida para un primer análisis, ya que su sensibilidad es relativamente elevada (10^3 - 10^4 ufc/ml).

1.4.3. Detección molecular

Los métodos que más se han empleado para la detección de *E. amylovora* mediante amplificación génica, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se basan en secuencias del plásmido pEA29. Para alcanzar una mayor sensibilidad, se desarrolló una variante de la PCR denominada nested-PCR, que utiliza dos pares de iniciadores, uno externo y otro interno [McManus y Jones, 1995], y que puede detectar hasta 20 ufc/ml en extractos vegetales o incluso 1 ufc/ml si se trata de cultivo puro. Sin embargo, para evitar los frecuentes inconvenientes de contaminaciones debidas a las dos etapas de amplificación, en el Laboratorio de Bacteriología del IVIA se puso a punto una variación que consiste en realizar dos amplificaciones en un solo tubo utilizando iniciadores con distintas temperaturas de anillado, obteniéndose así una sensibilidad cercana a 1 ufc/ml en cultivo puro [Llop y col., 2000].

Recientemente, se ha desarrollado la PCR-Real Time o PCR "a tiempo real", también basada en secuencias del plásmido pEA29, y cuya principal ventaja es su gran rapidez en la obtención de resultados al mismo tiempo que ocurre la amplificación, sin necesidad de electroforesis y con una sensibilidad de 50 ufc/ml [Salm y Geider, 2004].

Todas estas reacciones de PCR basadas en secuencias del plásmido pEA29 tienen como inconveniente que aunque se creía que este plásmido era ubicuo en *E. amylovora*, recientemente se ha demostrado la existencia de cepas de *E.*

amylovora que no lo tienen [Llop y col., 2006]. Para solventar este problema se está desarrollando actualmente otra PCR “a tiempo real” a partir de secuencias cromosómicas del operon *ams* [Geider y col., 2007]. Además, existen otras PCR convencionales que amplifican fragmentos cromosómicos, como el gen *amsB* implicado en la síntesis del amilovorano [Bereswill y col., 1995], secuencias ribosómicas del RNAr16S [Bereswill y col., 1995] y RNAr23S [Maes y col., 1996] u otras [Guilford y col., 1996]. Sin embargo, en estos protocolos la sensibilidad, incluso en las mejores condiciones, es más baja (100-1000 ufc/ml). Por ello, en general estas amplificaciones resultan menos apropiadas que la nested-PCR para la detección de la bacteria en plantas asintomáticas o en muestras en las que sea esperable la presencia de la bacteria en niveles poblacionales bajos.

Un problema que presenta cualquier técnica de PCR está relacionado con la presencia de compuestos inhibidores de la Taq polimerasa en el material vegetal, por lo que se requieren protocolos de extracción del ADN para el análisis de este tipo de muestras [Llop y col., 1999]. Además, cabe señalar el hecho de que estas técnicas pueden amplificar secuencias de ADN procedentes de células de *E. amylovora* que estén lisadas o muertas.

1.4.4. Identificación

Una vez se han obtenido cultivos puros de colonias con morfología tipo *E. amylovora*, se realizan una serie de pruebas

bioquímicas y fisiológicas, así como serológicas, moleculares y de poder patógeno, para su identificación [EPPO, 2004].

El perfil bioquímico y fisiológico de *E. amylovora* es el siguiente:

- metabolismo oxidativo/fermentativo (O+/F+)
- oxidasa (-)
- reducción de nitratos (-)
- utilización de citrato (+)
- crecimiento a 39°C (-)
- licuefacción de gelatina (+)
- producción de ureasa (-)
- producción de indol (-)
- reducción de sacarosa (+)
- producción de acetoina (+)

Esta identificación bioquímica se puede completar con las galerías comerciales API (bioMérieux, Francia) [Donat y col., 2005; 2007] (Fig. 9). Se trata de sistemas miniaturizados que permiten evaluar 20 reacciones bioquímicas (API 20E), la utilización de 50 carbohidratos y derivados (API 50CH) o la producción de 19 enzimas (API-ZYM). Otro sistema miniaturizado es el BIOLOG (Biolog Inc., USA), que permite examinar la utilización de hasta 95 fuentes de carbono en un único análisis mediante una sola microplaca [Donat y col., 2005] (Fig. 9).



FIG. 9 . Sistemas miniaturizados para la identificación bioquímica de *E. amylovora*: API-ZYM (izqda.), API 20E (centro) y BIOLOG (dcha.). (Fotografías: V. Donat).

El perfil de ácidos grasos también puede ser utilizado para la identificación, dada la homogeneidad observada en los perfiles de distintas cepas de *E. amylovora* [Paulin, 2000]. Además, las técnicas serológicas y moleculares descritas como métodos de detección, pueden también servir para la identificación de cultivos puros de la bacteria. Así, partiendo de cultivos puros, tanto la técnica ELISA-DASI con anticuerpos monoclonales, como la inmunofluorescencia con antisueros específicos o la aglutinación en membrana, como los diversos protocolos de PCR descritos, pueden ser aplicados para su identificación. Por otro lado, también los cultivos puros de la bacteria se pueden infiltrar en hojas de planta de tabaco para determinar su capacidad de producir la reacción de hipersensibilidad (HR). La prueba definitiva tras una HR positiva es la de la inoculación en peras inmaduras (Fig. 10), o en brotes de especies hospedadoras susceptibles, con el fin de reproducir los síntomas del fuego bacteriano y verificar el poder patógeno de los aislados. Además de las peras inmaduras, se ha demostrado que otros frutos inmaduros de plantas

hospedadoras como el níspero, o frutales de hueso como el albaricoquero, también reproducen los síntomas de fuego bacteriano (necrosis y exudado) cuando son inoculados con esta bacteria, por lo que pueden ser igualmente utilizados [Donat, 2004]. En todos los casos, para obtener los mejores resultados los frutos deben ser inoculados en el período desde que tienen un diámetro superior a 1cm hasta que alcanzan las $\frac{3}{4}$ partes de su diámetro definitivo. Asimismo, los brotes han de ser muy jóvenes, ya que en la mayoría de casos con la edad del órgano se incrementa la resistencia a la infección.



FIG. 10. Inoculaciones de *E. amylovora* en níspero (izqda) y pera (dcha) inmaduros. (Fotografías: M. Ordax)

1.4.5. Protocolo de diagnóstico (PM7/20, EPPO)

Recientemente, en el laboratorio de Bacteriología del IVIA se ha estandarizado un protocolo de diagnóstico para *E. amylovora* gracias a un proyecto denominado DIAGPRO (Diagnostic Protocols) (2000-2002) financiado por la UE. El protocolo, que recoge el procedimiento a seguir desde la toma de muestras de material vegetal hasta su diagnóstico final (Fig. 11), se ha validado mediante ensayos inter-laboratorios, y ha sido publicado como norma (Phytosanitary Measures PM7/20) por la EPPO [EPPO, 2004].

Tanto el desarrollo como la optimización de métodos de detección para *E. amylovora* con el fin de alcanzar una mayor sensibilidad sin la pérdida de fiabilidad, suponen un importante avance en el esclarecimiento de cuáles son las fuentes de inóculo, los reservorios y las vías de transmisión de la enfermedad, aspectos aún poco conocidos y que continúan siendo motivo de especulación [Montesinos y López, 1998; López y col., 2003].

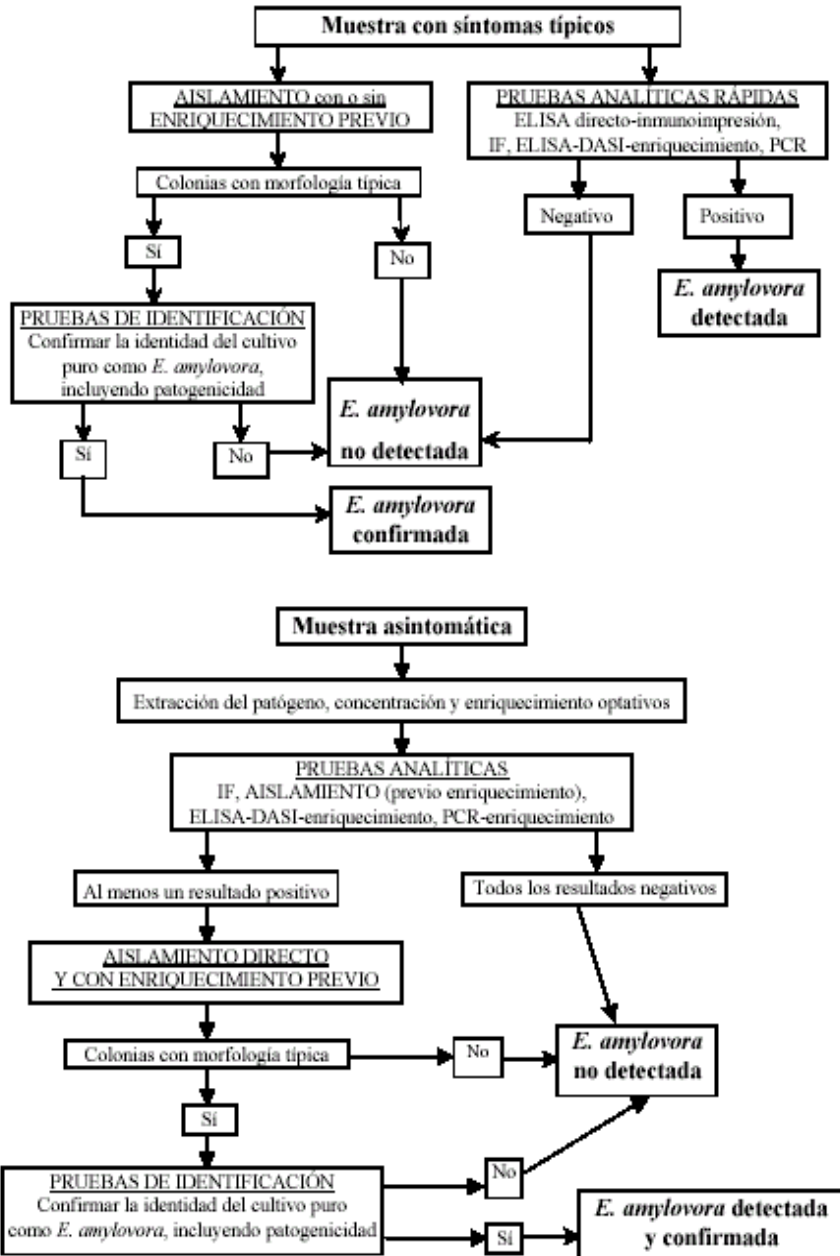


FIG. 11. Diagrama de flujo que representa el protocolo de diagnóstico a seguir para *E. amylovora* de acuerdo a la norma PM7/20 de la EPPO [EPPO, 2004; V. Donat, 2004].

1.5. UNA ESTRATEGIA DE SUPERVIVENCIA: EL ESTADO “VIABLE NO CULTIVABLE” (VNC),

1.5.1. Supervivencia, viabilidad y muerte celular

Se entiende por supervivencia bacteriana al mantenimiento de la viabilidad celular ante circunstancias adversas [Roszak y Colwell, 1987; Morita, 1997]. Sin embargo, en Microbiología a veces resulta difícil definir viabilidad y condiciones adversas.

En muchas ocasiones se desconoce cuáles son las condiciones óptimas para un microorganismo [Postgate, 1969; Morita, 1997]. Además, con frecuencia no se tiene en cuenta que los microorganismos pueden proceder de ambientes oligotróficos, cultivándose de forma rutinaria en el laboratorio en medios ricos en nutrientes [Jannash, 1979; Morita, 1997; Colwell y Grimes, 2000]. De hecho, lo más común en la naturaleza son los ambientes oligotróficos, de modo que los medios de cultivo de laboratorio difieren bastante de las condiciones en las que se encuentra en microorganismo en su medio natural [Morita, 1997]. Es más, un aporte repentino de nutrientes a microorganismos que proceden de ambientes en donde éstos escasean puede suponer incluso la muerte de los mismos [Morita, 1997]. Esto es debido a que los microorganismos pueden estar adaptados a las condiciones oligotróficas y

sobrevivir mediante distintos mecanismos, como la formación de estructuras de resistencia tipo esporas o células vegetativas, la disminución de la tasa de división celular, la reducción de las actividades metabólica y/o respiratoria, el uso de reservas endógenas como fuente de energía o la reducción del tamaño celular [Morita, 1997]. Todas estas respuestas ante la falta de nutrientes forman parte de un estado de supervivencia bacteriana ("starvation state" en inglés), que tal y como Morita expone [1997], es predominante en la naturaleza, a pesar de que frecuentemente no se tiene en cuenta en los laboratorios. Por ello, el término condiciones óptimas debe asociarse al microorganismo en su ambiente natural y no al trabajo en el laboratorio.

Respecto al término viabilidad, cabe destacar que, en Microbiología, la distinción entre viabilidad (vida) y no viabilidad (muerte) varía en función de la metodología aplicada. Generalmente, se consideran bacterias vivas o viables aquellas capaces de multiplicarse y formar una progenie en condiciones óptimas, determinándose normalmente por unidades formadoras de colonia (UFC), es decir, mediante su crecimiento en medio sólido [Postgate, 1967; 1969]. Por lo tanto, en Microbiología se identifica el concepto viabilidad con multiplicación en un medio de cultivo, lo que implica que cuando no se forman colonias, se considere que el microorganismo está muerto. Esta idea, que aún permanece en la actualidad, ya empezó a ser cuestionada por Gay, en el año 1936, sugiriendo que era posible que las células fueran incapaces de multiplicarse y en cambio, seguir desempeñando

funciones metabólicas. Años después, Valentine y Bradfield [1954] proponen el término viabilidad para describir las células capaces de multiplicarse y formar colonias, pero sugirieron el calificativo de vivas para referirse a las células que, aunque incapaces de dividirse, muestran otras señales de viabilidad celular como la respiración. Sin embargo, esto llevaba a considerar las células viables como no vivas, lo cual resultaba claramente contradictorio.

Debido a la necesidad, cada vez más apremiante, de estimar de una forma lo más fiable y exacta posible el número total de bacterias vivas en muestras ambientales [Roszak y Colwell, 1987], en la década de los 70 comenzaron a desarrollarse métodos microbiológicos independientes del cultivo [Hoppe, 1976; Zimmerman y col., 1978; Kogure y col., 1979], demostrándose que puede haber células no cultivables que sin embargo son viables y metabólicamente activas. Por lo tanto, se deduce que aquellas células que no son cultivables y, además, son metabólicamente inactivas, están muertas.

1.5.2. El estado “viable no cultivable” (VNC): determinación y características

A partir del desarrollo de metodologías independientes del cultivo celular, se ha demostrado que algunas especies bacterianas, en respuesta a ciertos tipos de estrés medioambiental, pueden perder su capacidad de crecer en

medios de cultivo en los que habitualmente crecen, pero permanecer viables [Oliver, 1993]. Así, surge el concepto de “Viable No Cultivable” (VNC). La primera evidencia experimental clara del estado VNC se encuentra en el trabajo de Xu y col., en el año 1982, con los patógenos *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. A partir de este momento, son muchos los estudios publicados, más de 400, acerca de la inducción de este estado en diversas especies bacterianas, patógenas y no patógenas, pertenecientes a todo tipo de ambientes: acuáticos, terrestres, atmosféricos, subterráneos, así como en humanos, animales, plantas, alimentos, etc. Los factores responsables de la inducción del estado VNC son también muy variables. Gran parte de los estudios realizados hasta el año 2000, se encuentran recogidos en el libro “Nonculturable microorganisms in the environment” editado por Colwell y Grimes, y se actualizaron en una posterior revisión [Oliver, 2005]. Aunque el número de bacterias en las que se ha demostrado la inducción del estado VNC continúa creciendo actualmente, son escasos los trabajos que exploran las bases fisiológicas, metabólicas o genéticas de este fenómeno [Oliver, 1993]. Puesto que el estado VNC se induce ante condiciones de estrés, está considerado como una estrategia de supervivencia para la bacteria en ambientes adversos [Roszak y Colwell, 1987; Oliver, 1993]. Además, como se ha descrito en bacterias Gram negativas, podría relacionarse, en cierto modo, con la esporulación de bacterias Gram positivas [Colwell y Grimes, 2000]. Pero si realmente el estado VNC es una estrategia de supervivencia desarrollada por la bacteria de forma activa ante uno o más factores desfavorables, debería ser un proceso

reversible, tal y como apuntaban estos mismos autores. A la reversión de la bacteria del estado VNC se le ha denominado comúnmente resucitación, y de ella hablaremos más adelante.

Existen toda una variedad de técnicas para determinar la proporción de células VNC de una población, que se caracterizan por determinar la viabilidad celular sin requerir el cultivo. Los métodos más empleados se clasifican, básicamente, a) en la respuesta a un estímulo externo, ya sea nutrientes [Kogure y col., 1979], sustratos marcados radiactivamente [Roszak y Colwell, 1987], o un sustrato enzimático [Manafi y col., 1991; Diaper y Edwards, 1994; Nwoguh y col., 1995]; b) en la detección de actividad respiratoria mediante el uso de aceptores de electrones como el INT (del inglés "p-iodonitrotetrazolium violet") [Zimmerman y col., 1978] o el CTC (del inglés "5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride") [Dufour y Colon, 1992], y c) en el mantenimiento de la integridad celular mediante la exclusión de fluorocromos como el ioduro de propidio, en el que se basa por ejemplo el kit comercial Live&Dead [Boulos y col., 1999], ampliamente usado. En paralelo, o incluso al mismo tiempo como ocurre en los métodos Kogure y Live&Dead, se realizan recuentos de células totales mediante técnicas rutinarias de microscopía de fluorescencia. Así, si al recuento clásico de células cultivables, añadimos los recuentos de células totales y viables, se puede determinar la fracción de la población bacteriana que se encuentra en estado VNC (Fig. 12). La relación entre los recuentos de células totales y viables con los números de colonias en un medio de cultivo, pasa por tres fases que según

Kell y col., [1998], se podrían denominar: correspondencia, discrepancia relativa y discrepancia absoluta (períodos A, B y C, respectivamente en Fig. 12). En la última fase, el número de colonias cae por debajo del límite de detección, de forma que la población no es cultivable, aunque sí viable de acuerdo a alguno de los criterios de viabilidad indicados anteriormente.

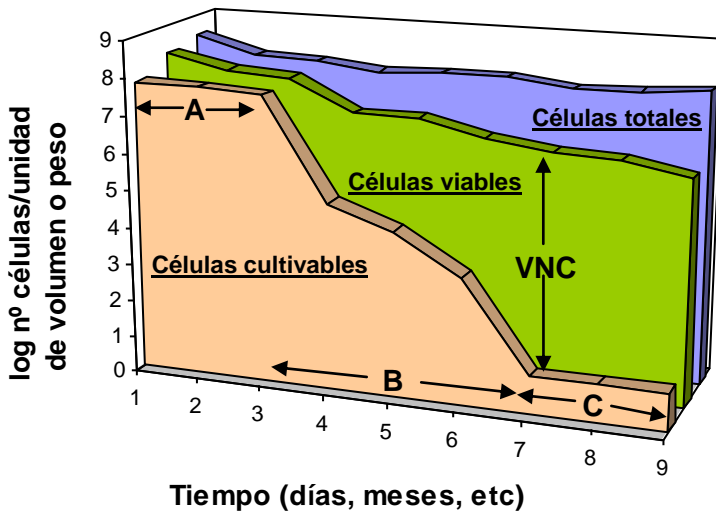


FIG. 12. Patrón clásico de recuentos de células totales, viables y cultivables en una población bacteriana sometida a una o más situaciones de estrés (la escala de tiempo y el número de células varían dependiendo del microorganismo y de la naturaleza del estrés). Los períodos denominados A, B y C, indican diferentes fases en la relación entre los recuentos de células totales y viables con los de cultivables: A) fase de correspondencia, B) fase de relativa discrepancia, y C) fase de absoluta discrepancia, correspondiendo a células viables aunque no cultivables (VNC). (Esquema basado en el de Kell y col. [1998]).

Junto con la pérdida de cultivabilidad en un medio de cultivo no selectivo, las células VNC pueden mostrar cambios de carácter morfológico, fisiológico o bioquímico. Así, ante un estrés por escasez de nutrientes es relativamente frecuente una reducción del

tamaño celular. Esta estrategia permite minimizar las necesidades para el mantenimiento celular y aumentar la captación de nutrientes por un incremento de la relación superficie / volumen [Morita, 1997]. Además, en bacterias marinas se han descrito una serie de cambios metabólicos que incluyen reducciones en el transporte de nutrientes y en la síntesis de macromoléculas, lo que podría suponer un mecanismo de protección para evitar que las células continúen consumiendo energía cuando no hay más nutrientes disponibles [Oliver 1993, 2005]. Otros cambios que se han descrito hacen referencia a la composición en lípidos y ácidos grasos de la membrana citoplasmática, disminuyendo su proporción en el estado VNC en bacterias como *Vibrio vulnificus* [Linder y Oliver, 1989; Day y Oliver, 2004], *Escherichia coli* [Oliver, 1993], *Aeromonas hydrophila* [Morgan y col., 1991] y *Campylobacter jejuni* [Tholozan y col., 1999]. Según estos trabajos, los cambios lipídicos observados podrían permitir a las células mantener la fluidez y el potencial continuo característicos de la membrana durante la entrada y permanencia de las células en el estado VNC. Estas células también pueden mostrar cambios bioquímicos en su pared celular, como se ha visto en *Vibrio* sp. y *Escherichia coli*, incrementando la síntesis de peptidoglicano [Nyström y Kjelleberg, 1989] o aumentando sus enlaces cruzados [Signoretto y col., 2002]. Presumiblemente, estas alteraciones podrían hacer que las células VNC fueran más resistentes, favoreciendo así la supervivencia de la bacteria [Oliver, 1993]. A nivel genético, se ha observado la pérdida de plásmidos en algunas especies de *Pseudomonas* [McDougald y col., 1995], aunque, sin embargo, se ha demostrado su permanencia en otras como *E. coli* y *Klebsiella* spp. [Oliver, 1993; Porter y col., 1995].

Además, la ausencia, en algunos casos, de amplificación por PCR, parece indicar que también pueden darse cambios a nivel genómico [Oliver, 1993; Bej y col., 1997; Warner y Oliver, 1998].

Por otro lado también se ha demostrado que las células VNC mantienen diversas características o funciones celulares de importancia, como la cápsula en *V. vulnificus* [Oliver, 1993], niveles de ATP elevados en *C. jejuni* [Beumer y col, 1992; Federighi y col., 1998], expresión de diversos genes en *Enterococcus faecalis* [Lleó y col., 2000] e incluso la biosíntesis de nuevas proteínas en *V. vulnificus* [Morton y Oliver, 1994; McGovern y Oliver 1995].

1.5.3. Reversión del estado VNC: recuperación o resucitación

De forma general se considera que si el estado VNC es verdaderamente una estrategia de supervivencia para la bacteria ante condiciones ambientales adversas, éste ha de ser reversible [Oliver, 1993; Kell y col., 1998; Colwell y Grimes, 2000; Bogosian y Bourneuf, 2001]. Así surge el término resucitación, también llamada recuperación, definido como "la reversión de los procesos metabólicos y fisiológicos implicados en la pérdida de la cultivabilidad, llevando a la recuperación de la capacidad de las células para crecer en el medio de cultivo en el que antes no podían hacerlo" [Oliver, 1993]. La resucitación puede deberse a distintas causas, como la reversión del factor o factores de estrés que indujeron la entrada en el estado VNC, la adición de nutrientes o la producción de señales específicas

por el hospedador de la bacteria [Kell y col., 1998]. Sin embargo, no siempre resulta tan clara, y por ello ha sido muy discutida en distintos trabajos. Los estudios de recuperación presentan el problema de que en la mayoría de casos, se apoyan en la adición de nutrientes a las células que no son cultivables. Por lo tanto, resulta difícil demostrar si la cultivabilidad que observamos es consecuencia de una verdadera resucitación de las células VNC o si, por el contrario, se debe al crecimiento de unas pocas células cultivables que permanecían por debajo del límite de detección (a lo que se le llama comúnmente recrecimiento) [Oliver, 1993; Kell y col., 1998; Bogosian y Bourneuf, 2001; Oliver, 2005]. En consecuencia, resulta imprescindible determinar y reducir, de la forma más exacta y fiable posible, la probabilidad de que una muestra contenga alguna célula cultivable antes de la resucitación. Así, se ha indicado que para demostrar que la contribución del recrecimiento está excluida se ha de establecer un límite estadístico aceptable, como por ejemplo, una $p < 0.01$ de que una célula cultivable esté presente en una muestra que después será sometida a procesos de recuperación de la cultivabilidad [Kell y col., 1998]. Existen procedimientos que permiten cumplir este criterio, como la técnica denominada “número más probable” o MPN (del inglés “most probable number”) [Koch, 1994], o el sistema de diluciones decimales seriadas propuesto por Whitesides y Oliver [1997]. Estos métodos han permitido demostrar la resucitación en especies bacterianas como *V. vulnificus*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *V. cholerae* y *C. jejuni* [Kell y col., 1998; Oliver, 2000]. Es importante tener en cuenta, que no todos

los intentos de recuperar la cultivabilidad de las células VNC resultan satisfactorios, ya que las condiciones necesarias para la resucitación dependen de la especie bacteriana, del factor/es inductor/es de la entrada en este estado, y del tiempo que hace que las células han perdido su cultivabilidad [Oliver, 2000]. Por lo tanto, la resucitación de células en estado VNC parece que es un proceso complejo, demostrado al menos en algunas especies, y bajo unas determinadas condiciones [Oliver, 2005].

1.5.4. Mantenimiento del poder patógeno en las células VNC

El saber si las células VNC de una especie bacteriana patógena son capaces de causar enfermedad constituye un aspecto esencial de este estado fisiológico por sus posibles implicaciones epidemiológicas. Dado que una de las posibles vías de resucitación de las células VNC es su paso por un hospedador susceptible, la cuestión que se plantea es si las células no cultivables pueden resucitar en él y causarle enfermedad. En cualquier caso, se ha demostrado que la inoculación de células VNC de bacterias patógenas como *V. cholerae* y *E. coli* [Colwell y col., 1985], *L. pneumophila* [Hussong y col., 1987], *C. jejuni* [Jones y col., 1991], *V. vulnificus* [Oliver y Bockian, 1995], *Shigella dysenteriae* Tipo 1 [Rahman y col., 1996], *V. shiloi* [Banin y col., 2000], *Enterococcus faecalis* [Pruzzo y col., 2002] y *Helicobacter pylori* [Oliver, 2005], desencadena la producción de síntomas en sus correspondientes hospedadores. Consecuentemente, se ha especulado con la idea de que el estado VNC podría estar implicado en infecciones bacterianas

en las que se conoce la existencia de una fase clínica durmiente o latente, como la tuberculosis [Kell y col., 1998]. También se ha apuntado un posible papel de este estado en enfermedades en las que no se conocen bien los reservorios de los patógenos o las vías de transmisión, como por ejemplo, las gastritis crónicas en humanos. Sin embargo, hay que destacar igualmente, que aún no se ha demostrado de una forma directa, que las células VNC tengan un papel en la epidemiología de estas enfermedades.

1.5.5. El estado VNC en la naturaleza: implicaciones epidemiológicas

Según Oliver [2000], para que el estado VNC tenga una implicación epidemiológica significativa se requiere que en la naturaleza las células bacterianas retengan su poder patógeno, así como que sean capaces de resucitar a un estado metabólicamente activo. No obstante, como indica Weichart [1999], incluso las células no recuperables y que hayan perdido su viabilidad pueden jugar un papel relevante en ecología y epidemiología. Se ha demostrado por ejemplo, que la síntesis de algunas toxinas continúa incluso después de que las células hayan perdido su capacidad de multiplicación [Weichart, 1999]. Además, se debe tener en cuenta que el mero hecho del mantenimiento de la estabilidad celular podría permitir la persistencia de su material genético en el ambiente, existiendo la posibilidad de su transferencia a otros microorganismos.

A pesar de los numerosos trabajos que encontramos en la literatura sobre el estado VNC, son pocos los estudios que se han hecho de células no cultivables en sistemas naturales [Bogosian y Bourneuf, 2001]. Los experimentos empleando suelo o agua de río no estériles han mostrado que las células no cultivables de *E. coli* [Bogosian y col., 1996] y *Pseudomonas fluorescens* [Mascher y col., 2000] no eran capaces de persistir. Resultados de este tipo sugieren que la conversión de un estado cultivable a uno que no lo es, podría no ser una estrategia de supervivencia para la bacteria, sino un estado previo a la muerte celular [Bogosian y Bourneuf, 2001]. Sin embargo, hay casos que inducen a pensar lo contrario: se ha visto por ejemplo, que *V. cholerae* es capaz de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el estado VNC en diferentes fuentes de agua natural, lo que se ha reconocido como un riesgo para la salud pública [Huq y col., 2000]. Resultados como éste podrían indicar una implicación significativa de los patógenos VNC en epidemiología.

La principal consecuencia de la posible existencia del estado VNC en ciertas especies bacterianas, es que muestras ambientales y clínicas no deben ser consideradas libres de patógenos por el mero hecho de dar resultados negativos en los cultivos [Huq y col., 2000]. Sin embargo, el aislamiento en medio de cultivo continúa siendo el método de diagnóstico más común en los laboratorios [Huq y col., 2000]. Además, se requiere el aislamiento del patógeno en casos extremos de susceptibilidad clínica, como ocurre en pacientes inmunodeprimidos o tratados con quimioterapia. Se podría

pensar que el uso de la tecnología de PCR podría ser la estrategia adecuada para la detección de células VNC en la naturaleza, pero es bien sabido que este tipo de técnicas amplifican el ADN de las células bacterianas independientemente de que estén viables o muertas. Además, se han observado que hay células VNC que han producido patrones de amplificación distintos e incluso en algunos casos no amplificaron [Brauns y col., 1991; Oliver, 1993; Bej y col., 1997; Warner y Oliver, 1998].

Con todo, se puede concluir que son necesarios estudios epidemiológicos más exhaustivos para determinar hasta qué punto las células VNC tienen un papel relevante en la aparición y el desarrollo de enfermedades [Oliver, 2000].

1.5.6. El estado VNC en bacterias asociadas a plantas

Las plantas están colonizadas por comunidades microbianas complejas (bacterias, levaduras, hongos...), que han recibido mucha atención debido a los efectos sobre su productividad. Así, hay microorganismos fitopatógenos que pueden resultar perjudiciales para ellas, pero también los hay que producen efectos beneficiosos. La cuantificación de poblaciones bacterianas asociadas a las plantas que se realizan para estudios epidemiológicos y ecológicos, se basan aún, en la mayoría de casos, en los recuentos en placa o en técnicas de inmunofluorescencia [Wilson y Lindow, 2000]. Puesto que la inmunofluorescencia no discrimina las células viables de las no viables, una diferencia entre sus recuentos y los recuentos

de cultivables en placa, no implicaría necesariamente la presencia de células VNC. Por lo tanto, se requiere, como ya vimos anteriormente, el uso de técnicas específicas para determinar la viabilidad celular, las cuales se han aplicado desde hace poco más de una década en las bacterias asociadas a plantas y, además, en microcosmos experimentales. Una de las razones ha sido, probablemente, la dificultad en el manejo de muestras ambientales con todo tipo de comunidades microbianas junto con la presencia de materia orgánica [Wilson y Lindow, 2000]. Por ello, son escasos, en comparación con los realizados en otras áreas, los estudios acerca de la inducción del estado VNC en especies bacterianas asociadas a plantas [Pedersen y Leser, 1992; Wilson y Lindow, 1992; Binnerup y col., 1993; Pernezny y Collins, 1997; Alexander y col., 1999; Guezzi y Steck, 1999; Grey y Steck, 2001]. Así, se han estudiado tanto especies fitopatógenas como *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomoas campestris* pv. *campestris* y pv. *vesicatoria*, como otras que no lo son, como *Pseudomonas fluorescens* y *Rhizobium leguminosarum*. Además, se ha visto que hay una disminución en la cultivabilidad de poblaciones bacterianas de especies como *Rhizobium phaseoli*, *A. tumefaciens* y *Pseudomonas* sp. recuperadas de suelo estéril cuando se cultivan en medios selectivos con presencia de antibióticos [Acea y col., 1988]. Todos estos estudios llevan a pensar que la cultivabilidad de las células bacterianas en muestras ambientales puede verse considerablemente afectada en situaciones de estrés [Wilson y Lindow, 2000].

Las bacteria epífitas, debido a que colonizan la superficie de las plantas, están sometidas de forma continua a varios tipos de estrés ambiental, como el estrés osmótico debido a fluctuaciones en la humedad relativa, las radiaciones ultravioleta, la escasez de nutrientes y la aplicación de compuestos bactericidas [Wilson y Lindow, 2000]. De hecho, podemos encontrar en la literatura muchos trabajos sobre la supervivencia de las bacterias epífitas en la filosfera, pero estos estudios se basan únicamente en la cultivabilidad de las mismas, por lo que cuando se describe un descenso del número de ufc, se desconoce si es sólo una disminución en la capacidad de formar colonias en medio sólido o si realmente las células bacterianas están muertas. Como ya hemos dicho, sólo recientemente se han abordado estudios de viabilidad, que han permitido, por ejemplo en el caso de *P. syringae*, demostrar que ante un estrés por desecación, esta bacteria inoculada en hojas de judía no entra en el estado VNC, ya que el número de células viables no fue significativamente distinto del de cultivables en placa [Wilson y Lindow, 1993]. Sin embargo, en estudios prolongados de esta misma bacteria en hojas de judía en condiciones ambientales constantes, sí que se demostró su entrada en este estado, probablemente debido a la limitación de nutrientes [Wilson y Lindow, 1992]. Los modelos que se han propuesto para describir el crecimiento y la supervivencia de las poblaciones bacterianas epífitas hablan de una transición reversible entre una fase de supervivencia y una fase de multiplicación [Henish y Basan, 1986; Knudsen, 1991; Beattie y Lindow, 1995]. Quizás entonces, como sugieren Wilson y Lindow [2000], el estado VNC en bacterias epífitas sea el

principio de la fase de supervivencia, adoptando este estado ante la limitación de nutrientes en el ambiente oligotrófico de las hojas de la planta. Además, no hay que olvidar los frecuentes tratamientos con compuestos bactericidas que se emplean para el control de las enfermedades en plantas, los cuales suponen un estrés añadido para estas bacterias en las hojas. Así, se ha demostrado en condiciones *in vitro* que ciertas concentraciones de iones cobre inducen la entrada de distintas bacterias fitopatógenas en el estado VNC [Alexander y col., 1999; Guezzi y Steck, 1999; Grey y Steck, 2001].

Las bacterias que se encuentran en la rizosfera también están sometidas a distintos tipos de estrés, como la desecación, los valores extremos de pH y temperatura y la presencia de metales pesados, entre otros [Wilson y Lindow, 2000]. Además, aunque en la rizosfera de una raíz en crecimiento activo hay suficiente carbono para permitir un crecimiento activo de las bacterias, no ocurre así en la rizosfera de raíces viejas o en suelos donde no hay plantas, que se caracterizan por ser ambientes oligotróficos [Morita, 1997]. Todos estos factores de estrés pueden potencialmente afectar a la cultivabilidad, como se ha observado en varios trabajos con muestras de suelo [Olsen y Bakken, 1987; Postma y col, 1988; Pedersen y Jacobsen, 1993; Richaume y col., 1993; Van Elsas y col., 2005]. Pero de nuevo, como ocurría con las bacterias de la filosfera, son escasos los estudios en que se da una evidencia directa del estado VNC mediante el uso de técnicas que determinen la viabilidad celular [Norton y Firestone, 1991; Binnerup y col., 1993; Heijnen y van Elsas, 1994]. Por el contrario, se han hecho varios

estudios de este tipo en una cepa en concreto, *P. fluorescens* CHAO, debido a su utilidad como agente de control biológico, y se ha demostrado que puede sobrevivir en el suelo durante largos períodos adoptando el estado VNC [Keel y col., 1994; Troxler y col., 1994; Troxler y col., 1997]. La proporción de células VNC de esta cepa dependía tanto del período de tiempo transcurrido desde la inoculación, como de la temperatura, humedad y abundancia de raíces presentes en el suelo [Troxler y col., 1994; Troxler y col., 1997].

Los trabajos en los que se ha abordado la recuperación de células VNC de bacterias asociadas a plantas son muy escasos [Alexander y col., 1999; Ghezzi y Steck, 1999; Grey and Steck, 2001]. Además, sólo en el caso de *R. solanacearum* se logró la resucitación de células VNC cuando se inoculaban en la rizosfera de plantas de tomate, hospedador susceptible de esta bacteria [Grey and Steck, 2001].

La posible existencia del estado VNC en bacterias asociadas a plantas podría tener importantes implicaciones en sanidad vegetal, ecología microbiana y fitoremediación [Wilson y Lindow, 2000]. De acuerdo con la literatura disponible, aunque hay evidencias de que la adopción del estado VNC ocurre en bacterias asociadas a plantas, es cierto también que son insuficientes los datos acerca de la magnitud y la relevancia de este fenómeno en el ciclo biológico de estos microorganismos.

1.6. CONTROL DEL FUEGO BACTERIANO

El control eficaz del fuego bacteriano debería ser de carácter integrado, comprendiendo no sólo medidas encaminadas a reducir el inóculo inicial, sino también a evitar el establecimiento del patógeno en el hospedador así como a disminuir la susceptibilidad de éste a la infección [van der Zwet and Beer, 1995; Norelli y col., 2003]. Sin embargo, se puede afirmar, en líneas generales, que a pesar de los esfuerzos realizados en los diversos países afectados, el control del fuego bacteriano no ha resultado satisfactorio [López y col., 1988; Johnson y Stockwell, 1998; Norelli y col., 2003]. La mayoría de estrategias de control desarrolladas frente a esta enfermedad han ido dirigidas a los tratamientos antimicrobianos o cúpricos en un intento de prevenir la infección o de reducir el inóculo primario [Norelli y col., 2003]. No obstante, en los últimos años se están realizando estudios para incrementar la resistencia del hospedador a la enfermedad, ya sea por medios químicos o genéticos [Norelli y col., 2003].

Los denominados "sistemas de predicción de riesgo de fuego bacteriano" contribuyen a realizar los tratamientos en los momentos de mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad. Dado que la gravedad de esta enfermedad varía en función de las condiciones climáticas (según la zona geográfica, la estación y el año), la sensibilidad del hospedador y la cantidad de inóculo, resulta obvio que el riesgo de infección no es

uniforme durante todo el ciclo vegetativo de la planta [Montesinos y López, 1998]. Los sistemas de predicción más empleados son los europeos BRS [Billing, 1992] y PARAFEU del INRA-MeteoFrance [Paulin y col., 1994], y el sistema americano MARYBLTY [Steiner, 1989]. Estos sistemas se basan principalmente en la inferencia de los niveles poblacionales de la bacteria y del riesgo de infección mediante dos aproximaciones [Montesinos y López, 1998]:

- El umbral térmico: se tiene en cuenta la superación de unas temperaturas críticas que conllevan el desarrollo de la enfermedad de acuerdo a observaciones empíricas de campo. Es el caso del MARYBLTY.

- Los índices de riesgo. Se utilizan en los sistemas europeos y contemplan más factores como las temperaturas mínima y media y la pluviometría, e incluso, como en el sistema francés, la sensibilidad varietal, el tipo de portainjertos, el estado fenológico de la planta y el historial de afectación de la finca.

La utilización de estos sistemas de predicción ha permitido un ahorro medio de un 22-62% en el número de aplicaciones de los tratamientos químicos, lo que supone una reducción de la contaminación medioambiental y de otros efectos secundarios como consecuencia de su uso excesivo [Billing, 1992; Paulin y col., 1994; López y Cambra, 1996].

A pesar de los avances en el control del fuego bacteriano, una vez introducido en una zona, resulta necesaria la aplicación de medidas de convivencia que llevan, en último término, a la transformación de los sectores productivos de peral, manzano y níspero. Por ello, las medidas preventivas

dirigidas a evitar la introducción de la enfermedad en un país o región son, sin duda, las medidas de control más eficaces [López y col., 1988; Montesinos y López, 1998; Montesinos y col., 1999; Cambra y col., 2002].

1.6.1. Medidas preventivas

El objeto de estas medidas consiste en evitar tanto la entrada, como el establecimiento del fuego bacteriano, empleando material vegetal sano (no portador de la bacteria) y detectando de forma precoz los posibles focos iniciales para permitir adoptar medidas inmediatas de erradicación que eviten el avance de la enfermedad [Montesinos y López, 1998; Cambra y col., 2002]. Por ello, constituyen un complemento de los tratamientos químicos que veremos en el siguiente apartado. Las medidas preventivas de carácter agronómico que se han de adoptar son las siguientes [Jones y Aldwinckle, 1990; van der Zwet y Beer, 1995; Montesinos y col., 1999; Cambra y col., 2002]:

- No utilizar variedades sensibles o muy sensibles en nuevas plantaciones de frutales
- Controlar las floraciones primaverales así como las refluoraciones de otoño a las que son propensas algunas variedades
- Hacer poda sanitaria en verde o durante la parada vegetativa invernal
- Evitar un excesivo vigor de las plantas hospedadoras limitando el abono nitrogenado

- No plantar hospedadores ornamentales en zonas de producción frutal
- Realizar inspecciones sistemáticas, que permitan un diagnóstico precoz de cualquier síntoma sospechoso y una erradicación rápida
- No introducir bajo ningún concepto varetas o cualquier tipo de material vegetal (frutal u ornamental) procedente de zonas o países con la enfermedad, a no ser que se disponga de todas las garantías sanitarias. La adquisición de plantas hospedadoras debe efectuarse sólo en viveros autorizados, y exigiendo siempre el preceptivo pasaporte fitosanitario con distintivo ZP.

En España, tanto las medidas preventivas y la erradicación rápida de los focos detectados, como las prospecciones sistemáticas que se vienen realizando en distintas zonas del país, han resultado eficaces para retrasar el avance del fuego bacteriano en el territorio nacional desde su introducción hace poco más de una década. Hasta ahora, nuestro país, junto con Australia, constituyen los únicos casos en los que la erradicación de esta enfermedad ha tenido éxito hasta la fecha. Por otro lado, es necesario señalar que el uso del pasaporte fitosanitario, necesario para la comercialización en la UE del material vegetal sensible al fuego bacteriano, aunque minimiza el riesgo de introducción de la enfermedad, no constituye una garantía total [Montesinos y López, 1998; Montesinos y col., 1999]. El pasaporte ZP se otorga exclusivamente en base a la ausencia de síntomas y, además, ante casos dudosos únicamente se suelen realizar análisis mediante aislamiento en medio de

cultivo que presentan el inconveniente de su baja sensibilidad [Montesinos y col., 1999]. Por esta razón, cabe la posibilidad de que se distribuya planta asintomática portadora de la bacteria, que aunque en niveles poblacionales bajos, podría constituir un inóculo suficiente para iniciar infecciones en una ZP [Montesinos y López, 1998; Montesinos y col., 1999]. De hecho, se ha demostrado que la dosis infectiva mediana (DI_{50}) para *E. amylovora* en órganos sensibles es tan sólo de 10-100 células bacterianas cultivables [Mazzucchi, 1992; Cabrefiga, 2004].

1.6.2. Control químico: cobre, antibióticos y otros

La lucha química como medida de contención frente al fuego bacteriano comprende la aplicación de productos de carácter bacteriostático o bactericida (derivados de cobre y antibióticos) y de otros que actúan estimulando los mecanismos de defensa de la planta. Hasta hoy, ninguno de los productos químicos desarrollados presenta una eficacia total contra el fuego bacteriano, pero sí que en algunos casos pueden proporcionar un control relativo de la bacteria que, en ocasiones, puede ser suficiente para una convivencia con la enfermedad que limite sus pérdidas económicas [López y col., 1988; Cambra y col., 2002]. Todos los tratamientos químicos están encaminados principalmente a disminuir la supervivencia del inóculo bacteriano o inhibir su multiplicación [Montesinos y López, 1998]. Sin embargo, presentan como principal inconveniente su débil penetración en el tejido vegetal, por lo que no actúan de forma sistémica, evitando solamente la

instauración y penetración de la bacteria en la planta [Montesinos y López, 1998]. A esto hay que añadir su inconsistencia en el campo debido a toda una serie de factores que influyen en su efectividad: el momento, las dosis y los métodos empleados para la aplicación del tratamiento, el nivel de inóculo del patógeno, las condiciones climáticas y la susceptibilidad del hospedador (especie, variedad, estado vegetativo) [López y col., 1988; Psallidas y Tsiantos, 2000]. En muchos países, independientemente del carácter del compuesto químico, se realizan de tres a cuatro tratamientos durante la prefloración y floración, uno o dos durante el crecimiento vegetativo de los brotes, otro en otoño tras la caída de la hoja y otro final en invierno tras la poda [Montesinos y López, 1998].

En cuanto a los productos cúpricos en concreto, se han desarrollado diversas formulaciones químicas, si bien todas ellas tienen en común como ingrediente activo el catión de cobre solubilizado. Se llevan usando en la lucha contra el fuego bacteriano desde el año 1900 [van der Zwet y Keil, 1979]. Los exudados bacterianos contienen compuestos capaces de solubilizar el cobre, causando la muerte celular, o al menos la inhibición de algunas actividades biológicas en la bacteria [Psallidas y Tsiantos, 2000]. También hay compuestos en la planta capaces de solubilizar estos cationes, por lo que uno de los inconvenientes añadidos de este tipo de compuestos químicos es su fitotoxicidad, dañando hojas y frutos [Psallidas y Tsiantos, 2000]. Además, presentan una baja persistencia y una escasa penetración en la planta [Montesinos y López, 1998];

Psallidas y Tsiantos, 2000]. Otro problema es la posible aparición de resistencia frente a dichos compuestos, que aunque aún no se ha descrito en campo para *E. amylovora*, sí se ha demostrado en otras bacterias fitopatógenas [Psallidas y Tsiantos, 2000]. Asimismo, se ha observado que algunas bacterias fitopatógenas [Alexander y col., 1999; Guezzi y Steck, 1999; Grey y Steck, 2001] adoptan el denominado estado "viable no cultivable" (VNC) como una estrategia de supervivencia frente al cobre.

Los antibióticos son los productos que mejores resultados han proporcionado en el control químico del fuego bacteriano desde que se inició su uso en la década de los 50 [Psallidas y Tsiantos, 2000; Psallidas y Tsiantos, 2000]. Sin embargo, su utilización está prohibida en la UE [Anónimo, 1999b] debido a la posible transferencia de resistencias a bacterias patógenas del hombre o de los animales [Psallidas y Tsiantos, 2000]. Aunque muchos antibióticos han mostrado su eficacia para inhibir el crecimiento de *E. amylovora in vitro*, sólo unos pocos pueden emplearse contra el fuego bacteriano en campo, debido a su toxicidad tanto para plantas como para mamíferos, y/o a su falta de actividad sistémica y/o a su baja persistencia en las superficies vegetales [Psallidas y Tsiantos, 2000]. De todos los antibióticos ensayados, el más eficaz y el más ampliamente utilizado es la estreptomycin. Sólo en casos de baja eficacia de este antibiótico o debido a la aparición de resistencias, se emplean otros como la oxitetraciclina (sola o en combinación con estreptomycin, en México y algunos estados de EEUU), kasugamicina (en ornamentales en Holanda), gentamicina

(México) y ácido oxolínico (Israel) [Psallidas y Tsiantos, 2000; McManus y col., 2002].

Existen otro tipo de compuestos químicos empleados frente al fuego bacteriano y que en algunos casos han resultado eficaces. El fungicida fosfonato fosetil-aluminio ha mostrado buenos resultados, similares a los de la estreptomicina, a ciertas concentraciones y en determinadas condiciones, pero se ha observado que sus efectos son bastante irregulares en campo [Montesinos y López, 1998; Psallidas y Tsiantos, 2000]. La flumequina, una quinolona de síntesis autorizada en Francia, Bélgica y Chipre, también presentó una eficacia comparable a la de la estreptomicina pero resulta mucho más cara [Montesinos y López, 1998; Psallidas y Tsiantos, 2000]. El ácido S-acilbenzolar, benzotiadiazol que estimula las defensas de la planta, ha mostrado resultados aceptables, pero sólo en un corto plazo tras su aplicación y cuando ésta es de naturaleza preventiva [McManus y col., 2002; Norelli y col., 2003]. Lo mismo ocurre con otros activadores de las defensas de las plantas como las harpinas [Momol y col., 1999]. La prohexadiona-calcio, regulador del crecimiento de la planta que frena el desarrollo de los brotes, ha resultado eficaz en árboles maduros [Norelli y col., 2003]. Sin embargo, puede ser contraproducente en árboles jóvenes, donde es necesario controlar el fuego bacteriano permitiendo al mismo tiempo el crecimiento y establecimiento de la planta [Norelli y Miller, 2006].

1.6.3. Control biológico

Este tipo de control está siendo considerado como una alternativa complementaria de interés debido a la necesidad de reducir el uso de compuestos químicos, la prioridad cada vez mayor de protección del medio ambiente y la carencia de bactericidas eficaces [Baldwin y Rathmell, 1988; Andrews, 1992]. Consiste en utilizar microorganismos de bajo impacto ambiental que sean capaces de controlar el crecimiento del patógeno, en base a principios de competencia, antagonismo y/o inducción de resistencia [López y Peñalver, 2005]. Sin embargo, el control biológico puede presentar diversos inconvenientes en la práctica: desarrollo más largo, complicado y costoso debido a que en él están implicados tres sistemas vivos (bacteria patógena, agente de biocontrol y planta hospedadora) a la vez que se requieren los mismos estudios de evaluación que cualquier producto químico; posibilidad de transferencia de genes entre el patógeno y el agente de biocontrol, e interferencias con los productos fitosanitarios [López y Peñalver, 2005].

En el caso de *E. amylovora* los principales criterios de selección de agentes de biocontrol eficaces han sido el crecimiento, la colonización y la persistencia en estigmas y pistilos, por su relevante papel en el ciclo biológico de la enfermedad [Johnson y Stockwell, 2000; Cabrefiga y col., 2002]. Así, las especies bacterianas que más se están estudiando como agentes de biocontrol contra *E. amylovora* son las bacterias epífitas *E. herbicola* (*Pantoea agglomerans*) y *Pseudomonas fluorescens* [Montesinos y col., 1999], empleando

determinadas cepas tanto por su producción de antibióticos como por su gran capacidad colonizadora. De acuerdo a diversos trabajos recogidos por Cabrefiga y col., [2002] y López y Peñalver [2005], la eficacia media de varios agentes de biocontrol contra el fuego bacteriano oscila entre el 40 y el 83%, lo que sugiere que, en el caso de esta enfermedad, el control biológico debe ser complementario a otro tipo de medidas (profilácticas, químicas y culturales...) para alcanzar una mayor eficacia en el control de la enfermedad.

En Estados Unidos se han comercializado dos cepas que ya se están utilizando en el control del fuego bacteriano desde hace casi una década. Una de ellas es la cepa de *P. fluorescens PfA506* [Lindow y col., 1996], y la otra es la *E. herbicola EhC9-1S*, mutante espontáneo resistente a la estreptomicina [Stockwell y col., 1996]. Los mejores resultados (50-70%) se han obtenido mediante la combinación de ambas cepas y su aplicación en las flores al menos dos veces [Johnson y Stockwell, 2000], o mediante la aplicación también de al menos dos veces en las flores de únicamente la cepa *PfA506*, seguido de un tratamiento con antibiótico [Lindow y col., 1996]. Si el antibiótico es estreptomicina, como ambos agentes de biocontrol son resistentes a ella, se pueden mezclar y aplicar en un mismo tratamiento, pero si se usa oxitetraciclina, su aplicación debe retrasarse 6-7 días a la del agente de biocontrol para no interferir en su colonización y niveles poblacionales en la planta hospedadora [Stockwell y col., 1996].

1.6.4. Control genético

La mejora genética frente al fuego bacteriano está dirigida a conseguir la resistencia a la enfermedad ya sea mediante métodos clásicos o ingeniería genética. Se comenzó con la búsqueda de fuentes naturales de resistencia, es decir, de plantas hospedadoras que de forma natural fueran resistentes al fuego bacteriano. Se encontraron diversos casos de cultivares calificados como resistentes o moderadamente resistentes [recogidos en van der Zwet y Beer, 1995; Sobiczewski y col., 1997], pero se observó que no sólo el genotipo de la planta influía en su grado de susceptibilidad a la enfermedad, sino también los factores ambientales y las prácticas agronómicas. A pesar de ello, estos estudios constituyen una fuente de información válida como punto de partida para programas de mejora genética clásica [Aldwinckle y Beer, 1978]. Sin embargo, desde hace aproximadamente quince años, se tiende más a la ingeniería genética, ya que nos ofrece una obtención más rápida de resultados, y un mayor abanico de posibilidades. Mediante ingeniería genética se pueden modificar tanto la expresión de genes nativos del hospedador, como introducir genes de resistencia, pero se han de mantener las características deseables de la variedad transformada [Norelli y col., 2003]. Para conseguir una resistencia al fuego bacteriano mediante ingeniería genética, se transfirieron, inicialmente, genes que codificaban para péptidos y proteínas antimicrobianas con baja toxicidad para células eucariotas. En este sentido, los resultados con mayor éxito se obtuvieron con proteínas de carácter bactericida procedentes de distintos organismos, como la atacina (insectos), la cecropina (gusano

de la seda) y la lisozima (lágrimas, saliva), en condiciones de invernadero [Norelli y col., 1994] y de campo [Ko y col., 2000]. Otro enfoque alternativo fue la expresión de proteínas antimicrobianas en los espacios intercelulares de los órganos del hospedador potencialmente susceptibles de una infección primaria de fuego bacteriano [Düring, 1996]. Aunque la hipótesis en principio auguraba buenos resultados debido a la multiplicación de *E. amylovora* en los espacios intercelulares antes de causar una infección, surgieron problemas debido a que las proteínas introducidas quedaban expuestas a las proteasas extracelulares de las plantas [Ko y col., 2000]. El mismo grupo de investigadores realizó un estudio comparativo con las tres proteínas antimicrobianas citadas anteriormente, y se demostró que las líneas transformadas con atacina eran las que mostraban una menor susceptibilidad al fuego bacteriano [Ko y col., 2000], que además resultó ser estable, manteniéndose desde el año 1998 [Norelli y col., 2003]. No obstante, las últimas tendencias en la ingeniería genética van dirigidas a potenciar la respuesta defensiva de la planta contra *E. amylovora*, más que a la introducción de péptidos antimicrobianos, que aunque actúen directamente contra la bacteria, no están presentes de forma natural en el hospedador. En este sentido, se han conseguido líneas transformadas con harpina, efector de *E. amylovora* que induce resistencia al fuego bacteriano cuando se aplica en flores [Bhaskara Reddy y col., 2000], y otras líneas transgénicas en las que se impide la unión de quinasas de la planta con la proteína DspE, producida por la bacteria y esencial para el desarrollo de la enfermedad [Meng y col., 2003]. A pesar del

éxito de los resultados obtenidos con diversas líneas transgénicas, todas están aún en fase de experimentación, y es de esperar que su comercialización sea complicada, especialmente en la UE, debido a los estrictos requisitos legales para demostrar su seguridad tanto para la agricultura y el medio ambiente como para los consumidores [Norelli y col., 2003].

1.7. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La historia del avance del fuego bacteriano en Europa, y la continua aparición de focos en España desde su primera detección en el año 1995, sugieren que la amenaza del establecimiento de la enfermedad en nuestro país es real. Pese a los numerosos estudios epidemiológicos sobre *E. amylovora* que se han realizado en distintos países, los conocimientos acerca de su supervivencia ante condiciones ambientales adversas son aún muy escasos. Esto podría estar relacionado con la problemática que suponen las infecciones latentes en el control del fuego bacteriano. Así, la bacteria podría sobrevivir en las plantas en condiciones ambientales desfavorables en números poblacionales bajos y/o en estados fisiológicos particulares, escapando a su detección mediante aislamiento.

Un inconveniente al que se enfrentan frecuentemente los laboratorios de diagnóstico es que, en muchos casos, se detecta el patógeno por técnicas moleculares muy sensibles, pero no se consigue aislarlo en los medios de cultivo convencionales. Sin embargo, según la legislación vigente, para confirmar un diagnóstico se considera imprescindible el aislamiento del patógeno, sobre todo cuando se trata de un patógeno de cuarentena. Por tanto, es también importante la optimización de los medios de cultivo existentes con el fin de incrementar al máximo las posibilidades de recuperación de *E. amylovora*, favoreciendo su crecimiento incluso cuando la bacteria se encuentra en condiciones adversas. Además, para

retrasar el avance del fuego bacteriano y optimizar las estrategias de control, resulta de máxima importancia conocer la denominada “vida oculta” del patógeno, es decir, la posible existencia de reservorios desconocidos y/o vías de diseminación no consideradas hasta ahora.

Por todo lo anterior, en esta memoria nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar la supervivencia de *E. amylovora* frente al cobre, determinando la estrategia adoptada y las implicaciones en su poder patógeno.
2. Determinar si *E. amylovora* es capaz de sobrevivir en condiciones de limitación de nutrientes, tanto en distintas fuentes de agua natural estériles como en agua natural no estéril, donde además tendrá que competir con la microbiota presente.
3. Optimizar un medio de cultivo para la recuperación de células estresadas de *E. amylovora* empleando cobre, por su carácter de micronutriente esencial y activador de la síntesis de EPSs en esta bacteria.
4. Evaluar el papel del amilovorano y el levano, los principales EPSs de *E. amylovora*, en la supervivencia de la bacteria frente a condiciones de estrés como la presencia de cobre y la escasez de nutrientes.

**2. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against
copper: induction of the viable-but-nonculturable
(VBNC) state**

**Mónica Ordax, Ester Marco-Noales,
María M. López, and Elena G. Biosca.**

Applied and Environmental Microbiology, (2006),

Vol. 72, No5, 3482-3488

2.1. Abstract

Copper compounds, widely used to control plant pathogenic bacteria, have traditionally been employed against fire blight, caused by *Erwinia amylovora*. However, recent studies have shown that some phytopathogenic bacteria enter into the viable but nonculturable (VBNC) state in the presence of copper. To determine whether copper kills *E. amylovora* or induces the VBNC state, a mineral medium without copper or supplemented with 0.005, 0.01 or 0.05 mM Cu^{2+} was inoculated with 10^7 cfu/ml of this bacterium and monitored over 9 months. Total and viable cell counts were determined by epifluorescence microscopy using the Live/Dead kit and by flow cytometry with 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) and SYTO13. Culturable cells were counted on King's B nonselective solid medium. Changes in the bacterial morphology in the presence of copper were observed by scanning electron microscopy. *E. amylovora* entered into the VBNC state in all three copper concentrations assayed, much faster when the copper concentration increased. The addition of different agents which complex copper allowed the resuscitation (restoration of culturability) of copper-induced VBNC cells. Finally, copper-induced VBNC cells were only virulent for the first five days, while resuscitated cells always regained their pathogenicity on immature fruits over 9 months. These results have shown, for the first time, the induction of the VBNC state in *E. amylovora* as a survival strategy against copper.

2.2. INTRODUCTION

Fire blight, caused by the bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* [1920], and reported in more than forty countries around the world, is a very serious and destructive disease of pome fruits and many ornamental plants from the *Rosaceae* family [Van der Zwet and Beer, 1995]. Copper compounds, widely utilized against fire blight from the beginning of the last century [Van der Zwet and Keil, 1979], are still employed in many countries, especially in the European Union, where antibiotic utilization is restricted [Anonymous, 1999b]. Their use is one of the most common methods for controlling bacterial plant diseases, but it has led many bacteria to develop different strategies against copper ions [Saxena *et al.*, 2002]. Until now, very little information on the interaction between *E. amylovora* and Cu^{2+} ions is available [Bereswill *et al.*, 1998; Geider, 1999; Zhang *et al.*, 2000].

Copper treatments have traditionally been considered as bactericides in agriculture [Psallidas and Tsiantos, 2000; Van der Zwet and Beer, 1995; Van der Zwet and Keil, 1979], their effectiveness often being measured by the absence of bacterial growth on a solid medium [European Norm 1040; European Norm 1276]. However, recent studies have shown the induction of the viable but nonculturable (VBNC) state by copper in several plant pathogenic bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens* [Alexander *et al.*, 1999], *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [Ghezzi and Steck, 1999] and *Ralstonia solanacearum* [Grey and Steck, 2001]. This state, in which cells progressively lose their culturability on nonselective solid media but still remain viable, is

considered to be a bacterial survival strategy under adverse environmental conditions [Roszak and Colwell, 1987]. Therefore, the failure to produce a visible colony may not necessarily mean that the bacterial cell is dead. Furthermore, it has been reported that the VBNC cells can maintain the pathogenicity [Grey and Steck, 2001, Kell *et al.*, 1998]. In this respect, it has been suggested that copper-induced VBNC cells of some phytopathogenic bacteria could be related with the persistent nature of infections in copper-treated fields [Grey and Steck, 2001]. A similar situation could occur with *E. amylovora*, since fire blight remains as a disease difficult to control [Norelli *et al.*, 2003], which has been related to the ability of this bacterium to survive and spread in different ways [Thomson, 2000]. Moreover, some bacteria, under favourable environmental conditions, can revert from the VBNC state to a culturable one, in a process usually called resuscitation. This reversion is considered a confirmation that the VBNC state is a bacterial survival strategy [Kell *et al.*, 1998; Oliver, 1993]. The nature of the VBNC state, however, is still the topic of an intense debate in literature and some authors argue that this condition may be a physiological state prior to cell death [Bogosian and Bourneuf, 2001].

In spite of previous work concerning the toxic effect of copper ions for *E. amylovora* [Geider, 1999], many questions on the survival of this bacterium in the presence of this metal remain unanswered. Thus, the aim of this work has been to determine whether copper kills or induces the VBNC state of *E. amylovora* cells and if such VBNC cells retain their pathogenicity. Furthermore, the possible reversion of this bacterium from the nonculturable state has been

studied as well whether resuscitated cells could regain their pathogenic potential.

2.3. MATERIAL AND METHODS

2.3.1. Inoculation of *E. amylovora* cells in mineral medium with copper

Containers with 150 ml of sterile mineral medium AB [Alexander *et al.*, 1999] supplemented with CuSO₄ (Sigma-Aldrich Chemie, Germany) at different concentrations below the minimal inhibitory concentration (MIC) of *E. amylovora* (see Results section): 0.005, 0.01 and 0.05 mM Cu²⁺, and without this metal, as a negative control, were separately inoculated with 10⁷ cfu/ml of two *E. amylovora* strains. The French reference strain from the Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (CFBP1430) and a Spanish strain from the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias collection (IVIA1892-1) were assayed. The AB medium was chosen because of its very low copper complexing ability. The containers were kept at 26°C for 9 months and all the assays were performed at least in duplicate in two independent experiments.

2.3.2. Bacterial cell counts

Aliquots of 1 ml were taken regularly from all the containers at various times after inoculation (time zero) and bacterial numbers were then determined. Culturable *E. amylovora* cells were counted by plating on King's B (KB) nonselective solid medium [King *et al.*,

1954]. To discard any growth inhibition effect of copper on this medium, the MIC of copper sulfate for the *E. amylovora* assayed strains was determined as follows. Forty-eight-hour-old bacterial cultures from KB liquid medium were plated on KB solid medium supplemented with increasing copper concentrations from 0 to 6 mM CuSO₄ (at intervals of 0.5). After 48h at 26°C, the absence of growth was evaluated.

Total and viable cell counts were determined with a Nikon ECLIPSE E800 epifluorescence microscope using the bacterial viability kit BacLight LIVE/DEAD (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg., USA), based on the permeability of the bacterial cell membrane [Boulos *et al.*, 1999]. Manufacturer's instructions were optimized, progressively increasing the incubation time from 15 up to 45 minutes according to the period that bacterial cells had been in contact with copper.

To check the total and viable counts obtained with the LIVE/DEAD kit, *E. amylovora* cells were stained with 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (CTC) (Polysciences Europe, Eppelheim, Germany) and SYTO 13 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg., USA), and counted in a flow cytometer (Becton-Dickinson FACScalibur bench cytometer) with a laser emitting at 488nm. CTC, an indicator of bacterial respiratory activity [Dufour and Colon, 1992], was used at a final concentration of 4 mM with a gradual increase in incubation time as described by Créach *et al.* [2003], and stained samples were processed according to Gasol *et al.* [1999]. SYTO13 was used following the manufacturer's instructions.

2.3.3. Culturability restoration or resuscitation of copper-induced VBNC cells

Before resuscitation assays, the ability to bind free copper ions by EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) [Zevenhuizen *et al.*, 1979], citric acid [Geider, 1999], asparagine [Bereswill *et al.*, 1998; Geider, 1999], KB broth, and fresh immature pear juice [Zevenhuizen *et al.*, 1979; Menkissoglu and Lindow, 1991a] was quantified by the Microquant Copper Test (Merck, Darmstadt, Germany), widely used to determine the Cu^{2+} ions concentration in aqueous solutions. The different compounds were added to AB medium at the three copper concentrations studied but without bacteria. EDTA, citric acid and asparagine were added in stoichiometric amount in relation to copper while KB broth and pear juice were diluted 1/10. The samples for measurements of copper bound by the Microquant test were taken after 48h of shaking incubation at 26°C in liquid medium. The same conditions were used later for assaying the resuscitation of nonculturable cells on solid medium.

To test resuscitation, and with the purpose of complexing the Cu^{2+} ions from AB medium, the above indicated compounds were added to 1 ml aliquots from containers at the intermediate copper concentration at different times over 9 months. After incubation, culturability was determined on KB solid medium. The most efficient copper complexing agents were chosen to assay the restoration of culturability at the other two copper concentrations assayed, as described above.

To demonstrate that the resuscitation was not the result of a regrowth from a few undetected culturable cells, dilution studies

were performed according to Whitesides and Oliver [1997]. Briefly, aliquots of 1 ml from the containers with four month old copper-induced VBNC cells in AB medium at 0.01 mM Cu²⁺ were ten-fold serially diluted (from 10⁻¹ to 10⁻⁷) to reduce the probability (*p*) of any initial culturable cell down to < 0.0000001 cfu/ml. Then, KB broth and fresh immature pear juice were separately added to each dilution and incubated as previously described for assaying resuscitation.

2.3.4. SEM of *E. amylovora* cells in the presence of copper

Possible changes in bacterial morphology in the presence of copper were analysed by scanning electron microscopy (SEM). Thus, *E. amylovora* cells from the copper-free AB medium and AB with 0.05 mM Cu²⁺ were harvested by filtration through 0.2- μ m-pore-size polycarbonate filters, fixed, washed, and dehydrated as described by Marco-Noales *et al.* [1999]. Then, the bacterial cells were examined with a Hitachi H-4100 scanning electron FE microscope.

2.3.5. Pathogenicity assays of VBNC and resuscitated *E. amylovora* cells

Copper-induced VBNC and resuscitated cells of *E. amylovora* were inoculated at different times over 9 months on immature pear fruits (2 to 3 cm diameter, *Pyrus communis* cv. Blanquilla, cv. Williams and cv. Passe Crassane) and immature loquat fruits (2 cm diameter, *Eriobotrya japonica* cv. Tanaka) as previously described [Anonymous, 2004; Donat *et al.*, 2005]. Thus, for the two assayed strains, aliquots of 50 μ l from each container with *E. amylovora* cells

under different copper concentrations were inoculated in three pears and four loquats in duplicate in two independent experiments. KB grown bacterial cells and AB medium with copper were used as positive and negative controls, respectively, in all the inoculation assays. After incubation at 26°C the production of symptoms was examined daily for two weeks.

2.3.6. Statistical analysis

The data (total, viable, and culturable *E. amylovora* cell counts) are expressed as the mean of four determinations (after log-transformation) from two independent experiments performed in duplicate (see Fig. 1 from Results section). Statistical significance of differences between means was determined by using a three-way factorial ANOVA analysis (experiment, strain and copper treatment). Similarly, for each strain, three factors were considered for the analysis: day, experiment and copper treatment. A *p* value below 0.05 was considered significant. When no culturable cells were obtained by plating on KB solid medium, these null data were not used for the variance analysis. Trends in the population dynamics between the two *E. amylovora* strains assayed were also statistically analysed by ANOVA.

2.4. RESULTS

2.4.1. Copper induces the VBNC state in *E. amylovora*

The MIC of copper sulfate for the *E. amylovora* assayed strains in KB solid medium was 3.5 mM Cu²⁺, that is, 70 times higher than the highest copper concentration used in the survival experiments, 0.05 mM Cu²⁺. Survival curves of *E. amylovora* over 9 months in the absence and the presence of copper at different concentrations in mineral medium are shown in Figure 1.

As the results were similar for the two assayed strains, and there were no significant differences between their trends at any time, only the reference strain CFBP1430 is represented in the graphs. Total and viable cell counts remained at high levels (10^9 - 10^7 and 10^8 - 10^6 cells/ml, respectively) in all the containers, irrespective of the copper presence, the copper concentration or the strain assayed (Figs. 1A and 1B). However, the culturable cell counts decreased at different rates depending on the copper concentration (Fig. 1C). In copper-free AB control medium, the culturability decreased over one month from 10^7 to 10^4 cfu/ml and remained at this level until the end of the experimental period (Fig. 1C). In contrast, in the presence of copper, the culturability of *E. amylovora* dropped below the detection limit (1 cfu/ml) and cells became nonculturable on KB plates at the three copper concentrations assayed, the time of entry being much faster when the concentration of this metal was higher: days 36, 1 and 0 for each concentration, respectively (Fig 1C). This loss of culturability, despite

the high numbers of viable cells (Figs. 1B), indicates that a considerable fraction of total cells at day 270 (94.5%, 87% and 80%

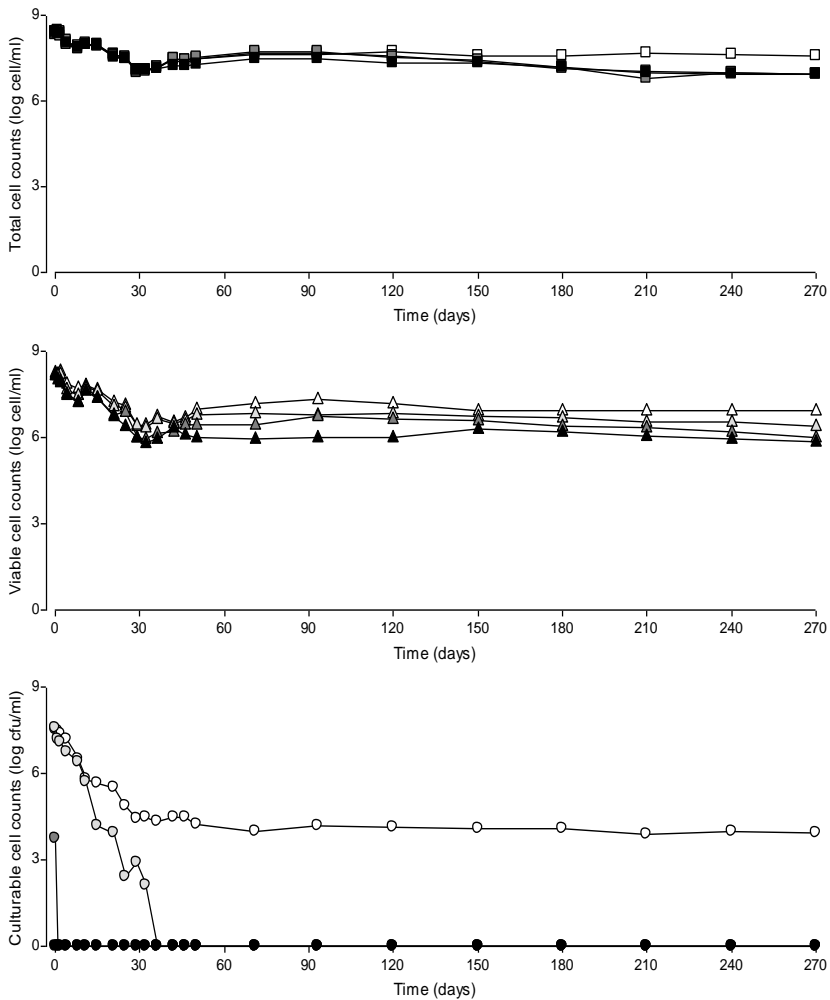


FIG. 1. Survival curves of *E. amylovora* strain CFBP1430 over 9 months in AB mineral medium without copper (white) or with different copper concentrations: 0.005 mM Cu^{2+} (light gray), 0.01 mM Cu^{2+} (dark gray) and 0.05 mM Cu^{2+} (black). (A) total cell counts (squares); B) viable cell counts (triangles); C) culturable cell counts (circles). Total and viable cell counts were determined by epifluorescence using the LIVE/DEAD kit (Molecular Probes), and culturable cell counts were determined by plating on King's B nonselective solid medium. The minimum standard deviation was 0.014, and the maximum 0.789.

at 0.005, 0.01 and 0.05 mM Cu^{2+} , respectively) was in the VBNC state. Therefore, most of the bacterial population of the two *E. amylovora* strains entered into the VBNC state. Significant differences among copper treatments were only found in culturable cell counts, but not in the total and viable counts.

The comparison of microscopic counts using the LIVE/DEAD kit with those obtained by flow cytometry using CTC and SYTO13 showed that total counts by SYTO 13 were half a logarithmic order higher than those by LIVE/DEAD, while viable cell numbers by CTC varied between half and one logarithmic order lower than those determined by LIVE/DEAD.

2.4.2. Resuscitation of copper-induced VBNC *E. amylovora* cells

The addition of several compounds was assayed in order to decrease or remove the Cu^{2+} ions present in the AB medium. The culturability of copper-induced VBNC cells was restored in all cases, but the final efficiency of the compounds in resuscitating such cells varied depending on their copper complexing ability, the time lapse after the entry of *E. amylovora* into the VBNC state, and the copper concentration assayed. Regarding copper complexing activity, KB broth and fresh immature pear juice were the most powerful complexing compounds since they bound 100% of Cu^{2+} ions irrespective of the concentration assayed (Fig. 2). They were followed by asparagine and EDTA which bound more than 80 % of copper ions at 0.01 mM, whereas the complexing ability of citric acid was the lowest (Fig. 2).

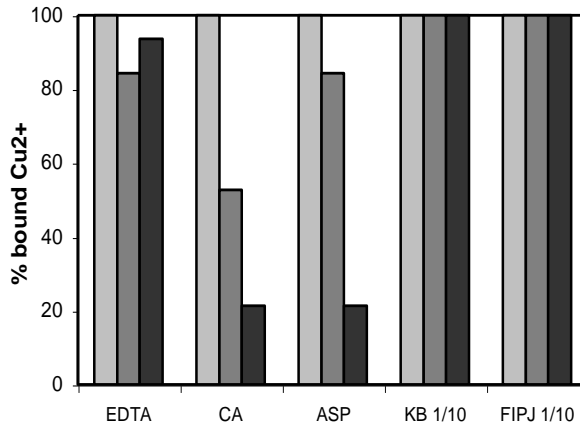


FIG. 2. Copper-complexing ability of five chelating compounds in AB medium (without bacteria) supplemented with 0.005 (light gray), 0.01 (dark gray), or 0.05 (black) mM Cu²⁺. The compounds were: EDTA, citric acid (CA), asparagine (ASP), King's B broth diluted 1/10 (KB 1/10), and fresh immature pear juice diluted 1/10 (FIPJ 1/10).

EDTA and citric acid resuscitated VBNC *E. amylovora* cells induced by 0.01 mM Cu²⁺ for 18 days after their entry into the VBNC state, while asparagine was effective for up to 75 days (Fig. 3). However, the greatest resuscitation was reached with KB liquid medium which worked for up to 9 months after the bacterial population entered into the VBNC state (Fig. 3). Results similar to KB broth were observed by adding fresh immature pear juice (data not shown).

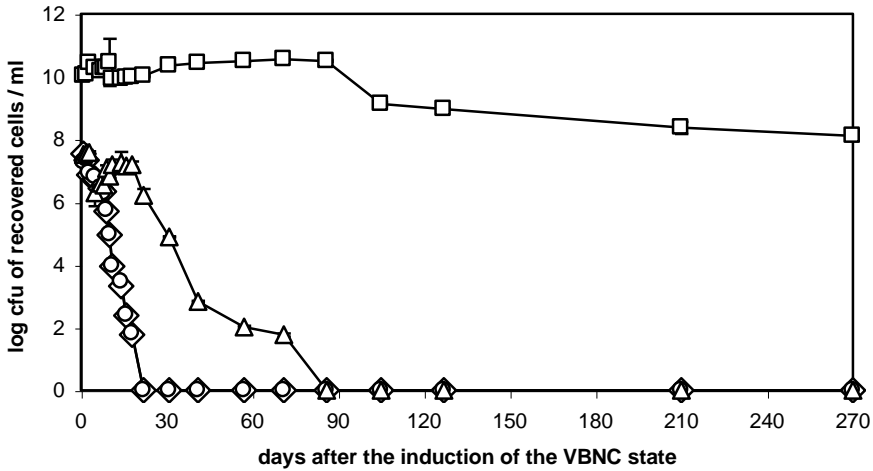


FIG. 3. Culturability restoration curves for 0- to 270-day-old VBNC *E. amylovora* cells of strain CFBP1430 induced by 0.01 mM Cu^{2+} using different copper-complexing compounds: EDTA (diamonds), citric acid (circles), asparagine (triangles) and King's B broth diluted 1/10 (squares).

Based on these results, only KB broth and pear juice were used to try to resuscitate VBNC cells induced by the lowest and the highest copper concentrations assayed. Culturable cells were also recovered on KB plates for up to 9 months from VBNC cells induced by 0.005 mM Cu^{2+} (following the same recovery kinetic than the one represented in Fig. 3 for KB broth), while the resuscitation for VBNC cells induced by 0.05 mM Cu^{2+} was only achieved for two days.

To check the possible emergence of copper-resistant mutants, the resuscitated cells were plated periodically on KB solid medium supplemented with 3.5 mM Cu^{2+} , the MIC for *E. amylovora* in this medium. In no case were the resuscitated cells able to grow on

this medium, so there was no increase in the MIC and no evidence of copper resistance.

To differentiate between resuscitation and regrowth, dilution studies were performed. Culturable cells were recovered on KB plates from all the dilutions when KB broth and pear juice were added to VBNC cells induced by 0.01 mM Cu²⁺.

2.4.3. SEM of copper-induced VBNC *E. amylovora* cells

The morphology of bacterial cells in presence versus absence of copper was compared by SEM. After one week in the copper-free AB medium, *E. amylovora* cells had the typical rod shape and a normal size (Fig. 4A), while at 0.05 mM Cu²⁺ the cells were slightly bigger in size, the morphology was altered, and a partial increase in the thickness of the external cell layer was observed (Fig. 4B).

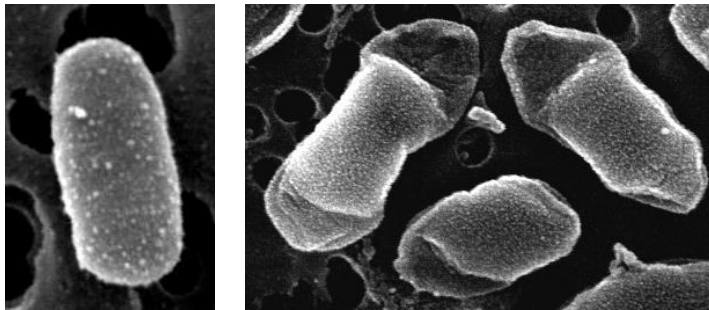


FIG. 4. *E. amylovora* cells of the strain CFBP1430 shown by scanning electron microscopy after 7 days in copper-free AB medium (left) and in AB medium with 0.05 mM Cu²⁺ (right).

2.4.4. Pathogenicity of copper-induced VBNC and resuscitated *E. amylovora* cells

About 90% of pear fruits inoculated with the two assayed strains from copper-free AB medium developed symptoms during the whole experimental period, while 40-60 % of pears inoculated with copper-induced VBNC cells exhibited symptoms only for the first five days. These results were the same for all the pear cultivars inoculated. Although the VBNC cells caused fire blight symptoms as necrosis and exudate, they were less serious (necrosis < 10 mm radius and micro-drops of exudate) and appeared one or two days later than in the case of control cells (necrosis > 10 mm radius and more than 4 drops of exudate). The inoculation assays with immature loquat fruits showed similar results.

Resuscitated cells were as pathogenic as the control cells, irrespective of the copper concentration, the time lapse after the induction of the VBNC state, the copper complexing compound used to restore the culturability, or the pear cultivar. At the two lowest copper concentrations, cells resuscitated by KB broth and fresh immature pear juice produced fire blight symptoms even after 9 months in the VBNC state. A delay of 2-3 days in symptom production was observed only with resuscitated cells from 6 months. In contrast, when the inducing copper concentration was the highest, only the cells recovered from 0 to 2 days-old VBNC cells produced symptoms, since culturable cells were only recovered within the two first days. Therefore, whenever VBNC cells regained their culturability, they also recovered their pathogenicity.

2.5. DISCUSSION

This work has shown, for the first time, that copper induces the VBNC state in *E. amylovora*, as described in other plant pathogenic bacteria [Alexander *et al.*, 1999; Ghezzi and Steck, 1999; Grey and Steck, 2001]. The aim of this work has been to study the survival strategy of this bacterium against copper as a stress factor and not as a growth inhibitor, which involved following the long-term survival of this pathogen in a mineral medium with very low copper complexing ability at different copper concentrations below its MIC.

Total and viable cell counts of *E. amylovora* remained at high levels in all the experiments, irrespective of the copper concentration or the strain assayed. Thus, copper did not produce cellular lysis and did not kill all the *E. amylovora* cells in the assayed conditions, since there was only a difference of around 1-2 logarithmic orders between total and viable cells. However, there was a decrease in the culturable cell counts (down to 10^4 cfu/ml) in the free-copper AB medium, which was probably due to nutrient starvation, as recently reported for *E. amylovora* in water by Biosca *et al.* [2006b]. At the three copper concentrations tested, the culturability of *E. amylovora* fell below 1 cfu/ml despite the high numbers of viable cells (10^8 – 10^6), indicating the presence of a high VBNC cell fraction in the bacterial population. This is in agreement with reports on other phytopathogenic bacteria, such as *R. solanacearum* [Grey and Steck, 2001] and *A. tumefaciens* [Alexander *et al.*, 1999]. However, at least at the highest copper concentration assayed, *E. amylovora* entered into the VBNC state

earlier than other plant pathogens [Alexander *et al.*, 1999; Ghezzi and Steck, 1999; Grey and Steck, 2001]. The number of VBNC cells at the end of the survival experiment (270 days) was inversely proportional to copper concentration, as described in *X. campestris* pv. *campestris* [Ghezzi and Steck, 1999]. As metal concentration increased, *E. amylovora* entered into the VBNC state more quickly and, perhaps, this sudden shift caused more cells to die, reducing the fraction of the bacterial population in the VBNC condition.

To determine the viability of nonculturable cells [McDougald *et al.*, 1998; Oliver, 1993], the LIVE/DEAD kit [Boulos *et al.*, 1999] and the CTC dye [Dufour and Colon, 1992] were chosen, and a difference of one logarithmic order between them was observed. This has been already reported for other bacteria regardless of the use of epifluorescence microscopy or flow cytometry [Oliver, 1993; Boulos *et al.*, 1999; Créach *et al.*, 2003], probably due to the fact that respiration is a more stringent criterion of viability than membrane integrity [Boulos *et al.*, 1999].

The copper concentrations assayed in the present study and in previous works [Alexander *et al.*, 1999; Ghezzi and Steck, 1999; Grey and Steck, 2001] are lower than those used in agriculture. However, the fact that Cu^{2+} ions are significantly complexed in the leaves of treated plants should be taken into account [Menkissoglu and Lindow, 1991a; Menkissoglu and Lindow, 1991b]. Moreover, inoculum levels, time and methods of application, plant species or cultivar, weather conditions, and the physiological cell state of the host plant greatly affect the soluble copper available for the bacteria in plant organs [Psallidas and Tsiantos, 2000]. All these

events can decrease the available toxic ions on treated plants. Therefore, our results provide a good base for understanding how *E. amylovora* faces copper in nature.

Once the induction of the VBNC state in *E. amylovora* by copper was demonstrated, the possibility of resuscitation by different agents which complex Cu^{2+} ions was studied. KB broth and pear juice were the most powerful copper complexing compounds, removing 100% of free ions from the AB medium, followed by EDTA, asparagine and citric acid. When these different compounds were added to copper-induced VBNC cells, KB broth and fresh immature pear juice also enabled the highest levels of resuscitated cells even from 9-month-old VBNC cells. This is probably also due to their nutrient contribution to bacterial cell multiplication. Asparagine permitted the culturability restoration of 75 day-old VBNC cells, probably due to its complexing power [Geider, 1999] and its contribution as a nitrogen source for *E. amylovora* [Tolbert, 1964]. However, EDTA and citric acid only resuscitated copper-induced VBNC cells for 18 days after entering into the nonculturable state. Although EDTA was well able to complex Cu^{2+} ions in the absence of bacterial cells, its chelating power of divalent cations destabilizes the Gram-negative outer membrane [Leive, 1965]. The high resuscitation ability of KB broth versus the non culturability on solid medium could be due to the uniform availability of nutrients and chelators in the liquid medium, in addition to the lack of growth inhibitors that can be present in agar, together with a more active metabolism under shaking conditions [Biosca *et al.*, 2005].

Regarding to the possible emergence of copper resistance as a survival mechanism in itself during the period under study at the copper concentrations assayed, resuscitated cells did not show any increase in the MIC, which is a prerequisite for evidence of resistance.

In contrast to most previous works, where resuscitation was achieved from cells that were in the VBNC state for a few days [Kell *et al.*, 1998; McDougald *et al.*, 1998], this work shows the recovery of long-term copper-induced VBNC cells (up to 9 months for the two lowest concentrations). These results seem to support the hypothesis that the VBNC state is part of the life cycle of *E. amylovora*. However, the resuscitation of VBNC cells induced at the highest copper concentration was achieved only for 2 days. Since the VBNC state can be considered as a process in which the bacterial cells progressively adapt to adverse environmental conditions [Nyström, 2001], perhaps the rapid entry of *E. amylovora* into the VBNC state at 0.05 mM Cu²⁺ could hinder successful reversion of the nonculturable state.

Resuscitation is the keystone of the VBNC state hypothesis [Bogosian and Bourneuf, 2001], so the demonstration of a true reversion was indispensable in our study. In order to differentiate resuscitation from regrowth, it was imperative to determine the probability that a given sample contains any culturable cell prior to resuscitation assays, according to Kell *et al.* [1998]. Since in our dilution experiments culturable restored cells were recovered even when $p < 0.0000001$, this must be due to resuscitation and not to

regrowth of undetectable culturable cells, according to Whitesides and Oliver [1997].

Epidemiological studies of plant pathogenic bacteria are usually only based on the results of plate counts [Wilson and Lindow, 2000] but VBNC cells could play significant roles in the life cycle of bacteria [Weichart, 1999]. Furthermore, the maintenance of the cellular integrity of nonculturable cells permits genetic material of the pathogen to persist in the environment [Weichart, 1999]. Although VBNC *E. amylovora* cells were pathogenic for only five days, they were able to regain their culturability and pathogenicity. The long-term resuscitation with immature pear juice could be related to the contact between the bacterium and some substances from its natural host and could be involved in the recurrent infections of fire blight in copper-treated crops.

Regarding bacterial morphology, the visualization by scanning electron microscopy of *E. amylovora* cells in AB medium without copper showed the typical rod shape. However, cells maintained in the presence of copper had an altered morphology with a partial increase in the thickness of the external layer. It has been reported that copper ions increase the level of amylovoran exopolysaccharide synthesis [Bereswill *et al.*, 1998], and that these ions are accumulated on the surface of *E. amylovora* cells [Zhang *et al.*, 2000]. Moreover, it is known that bacterial exopolysaccharides (EPS) have a cation-binding capacity [Gutnick and Bach, 2000]. In accordance with all these previous studies, the bacterial morphology observed by SEM could be due to EPS with bound

copper ions. Studies of the role of EPS in the survival of *E. amylovora* in copper environments are now under way.

Overall, our results demonstrate, for the first time, the induction of the VBNC state in *E. amylovora* by copper and that this state could represent a survival strategy under certain adverse environmental conditions. These VBNC cells remain undetected on KB plates and, under favourable conditions, they can be able to multiply and regain their pathogenicity, representing a hazard for the host plants. Further studies on the interaction copper - *E. amylovora* and the VBNC state are needed to improve our understanding of the life cycle of this pathogen and to optimize the fire blight control strategies.

2.6. Acknowledgements

This work was supported through projects AGL-2001-2349-C03-02 and AGL-2004-07799-C03-02 from the Spanish Ministry of Science and Technology (MCYT) and GV-04B313 and GV05/214 from Generalitat Valenciana. M. Ordax wants to thank the MCYT for being awarded with a predoctoral fellowship. Dr. E. Marco-Noales has a contract from the Ministry of Education and Science of Spain (Programa INIA/CC.AA).

We thank the Servicio de Microscopía Electrónica (Universidad de Valencia), J.M. Gasol (Centro Mediterráneo de Investigaciones Marinas y Ambientales, CMIMA, CSIC), and E. Carbonell and J. Pérez (Departamento de Biometría, IVIA) for expert technical assistance in scanning electron microscopy, flow cytometry, and statistical analysis, respectively. We also are grateful to M.A. Cambra (Centro de Protección Vegetal, Gobierno de Aragón), and E. Montesinos (Universidad de Gerona) for providing the immature pear fruits and, finally, to "Speakenglish" Valencia and F. Barraclough for revising the English text.

3. Survival of *Erwinia amylovora* in water.

3A. Long-term starvation-survival of *Erwinia amylovora* in sterile irrigation water.

Elena G. Biosca, Ester

Marco-Noales, Mónica

Ordax, María M. López.

2006. Acta Hort. 704: 107-112

3B. *Erwinia amylovora* survives in natural water.

Elena G. Biosca,

R.D. Santander, Mónica

Ordax, Ester Marco-Noales,

María M. López. Acta Hort.

(*In press*)

3A. Long-term starvation-survival of *Erwinia amylovora* in sterile irrigation water.

3A.1. Abstract

The role of irrigation water in disseminating *Erwinia amylovora* is not fully recognized and no attempt has been reported to determine the survival of this bacterium in natural water. Such risk has been underestimated since there is a general consideration that *E. amylovora* survives only for a short period in water and no reports are available on its isolation from natural water samples. The main goal of this study has been to clarify whether *E. amylovora* could be able to bear a free-living existence under nutrient starvation conditions usually found in aquatic environments and if it becomes nonculturable on solid media when recovered from microcosms of sterile natural water. Infectivity of *E. amylovora* cells in water microcosms was evaluated by using immature pear fruits. Total and viable cell counts were monitored by the Live/Dead viability kit, and culturability by plate counts on King's B medium. *E. amylovora* was able to survive in water from different sources showing a long persistence in irrigation water and maintaining its infectivity for green pears. However, a progressive loss of culturability on solid media (from 2 to 3 logarithmic units) throughout the time was observed, being the rate at which cells became nonculturable dependent on the type of water used. A significant difference in the time to nonculturability between cells maintained in irrigation water and those kept in deionized water was observed, being the nutrient content the main difference between these two types of water.

Since bacterial cells maintained their viability along the study, it seems that the oligotrophic conditions found in natural aquatic environments could allow the survival of the fireblight pathogen. Further, the maintenance of the pathogenicity of *E. amylovora* supports the possible role of fresh water as a reservoir and vehicle of transmission of this pathogen.

3A.2. INTRODUCTION

Rain and irrigation water have been reported as involved in fire blight transmission at short distances [MacManus and Jones, 1994; Thomson, 2000]. However, the role of water in the dissemination of this bacterium is not fully recognized. This threat has been overlooked because the general consideration that this pathogen survives only for short periods in distilled water [Goodman, 1983] and no reports are available on its isolation from natural water samples.

Despite the numerous studies about *E. amylovora*, the information about its secret life outside susceptible hosts is still scarce. In fact, the presence of this bacterium in aquatic and soil habitats where its survival could be negatively affected by both biotic and abiotic factors is practically unknown, as well as the importance of these possible reservoirs in the spread of this pathogen. A major limitation in soil and water ecosystems is the low nutrient availability and under these starvation conditions bacteria may slow down their growth or show a progressive loss of culturability or just die. It is widely recognized that many bacteria

species undergo a starvation-survival response under these oligotrophic conditions [Morita, 1997]. Other species can survive by entering into the viable but nonculturable (VBNC) state, in which they are unable to grow on solid media but remain viable [Roszak and Colwell, 1987]. Researchs on phytopathogenic bacteria such as other *Erwinia* spp., *Agrobacterium tumefaciens* and *Ralstonia solanacearum* have shown the importance of water and soil habitats as reservoirs and dissemination routes of these pathogens [Cappaert *et al.*, 1988; Scanferlato *et al.*, 1989; Armon, *et al.*, 1995; Manahan and Steck, 1997; van Elsas *et al.*, 2000, 2001]. Although *E. amylovora* may survive in soil microcosms for some weeks and the presence of lytic phages from soil beneath blighted trees has also been reported [Thomson, 2000, Hildebrand *et al.*, 2001] nothing is known about the survival of this pathogen in natural water.

The objective of this study has been to clarify wheter *E. amylovora* is able to survive under the starvation conditions of aquatic environments, and if it becomes nonculturable on solid media when recovered from microcosms of sterile natural water. Since the overwintering of this bacterium is still poorly understood we have also investigated the possible influence of low temperature on its survival in irrigation water. The pathogenicity of *E. amylovora* cells in water microcosms has also been evaluated.

3A.3. MATERIALS AND METHODS

3A.3.1. Bacterial strains and water microcosms

One reference and three Spanish strains of *E. amylovora* from different origins were used: strain CFBP-1430 (CFBP, Collection Francaise de Bactéries Phytopathogènes) and Spanish strains IVIA-1509, IVIA-1525-6 and IVIA-1892-1. For the starvation experiments the microcosms were prepared using four types of water (0.2 µm-filtered and sterilised): deionized water, drinking water, rain water and irrigation water. Microcosms were inoculated with 10⁷ cfu/ml of each *E. amylovora* strain, as described before [Biosca *et al.*, 2005] and maintained at 26°C up to six months. To investigate the influence of low temperature in the survival of *E. amylovora* in water, only two strains and irrigation water were used. The microcosms prepared as described above were incubated at 26 and 5°C during three months.

3A.3.2. *E. amylovora* cell counts

Culturable, viable and total cell counts from water microcosms were monitored at time zero, after 48 h and weekly, for at least six months. Plate counts were done on King's B medium [King *et al.*, 1954] while total and viable cell counts were determined by the Live/Dead viability kit (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.) using an epifluorescence microscope.

3A.3.3. Infectivity assays in green pears

The pathogenicity of starved and low temperature starved cells of *E. amylovora* from each irrigation water microcosms was assayed by inoculation on green pears (var. Williams) as described in the EPPO standard [EPPO, 2004], after three and six months of incubation. *E. amylovora* cells from each strain grown on King's B medium were used as positive controls and sterile PBS as negative control. Symptoms appearance at 26°C was monitored daily.

3A.4. RESULTS

3A.4.1. Survival of *E. amylovora* in water

The four strains of *E. amylovora* were able to survive in different types of sterile water microcosms under starvation conditions at 26°C along 21 days. The survival of strain CFBP 1430 is shown in Fig. 1. However, a decline in the culturability on King's B solid medium was observed depending on the type of water used for microcosms. In deionized water a reduction of about 4 logarithmic units was observed in the number of culturable cells after three weeks. In drinking water a dramatic decline in the culturability was observed during the first 24-48 h (from 10^7 to 10^{4-3} cfu/ml) probably due to the presence of residual chlorine, but afterwards the culturable cell numbers were recovered and maintained at about 10^5 cfu/ml. The culturability in rain water and irrigation water microcosms was the highest with only a slight decline around 1-2 logarithmic units on day 21. A significant difference in the time to nonculturability between cells maintained in natural water

microcosms and those kept in deionized water was observed, being the nutrient content the main difference between these two types of water.

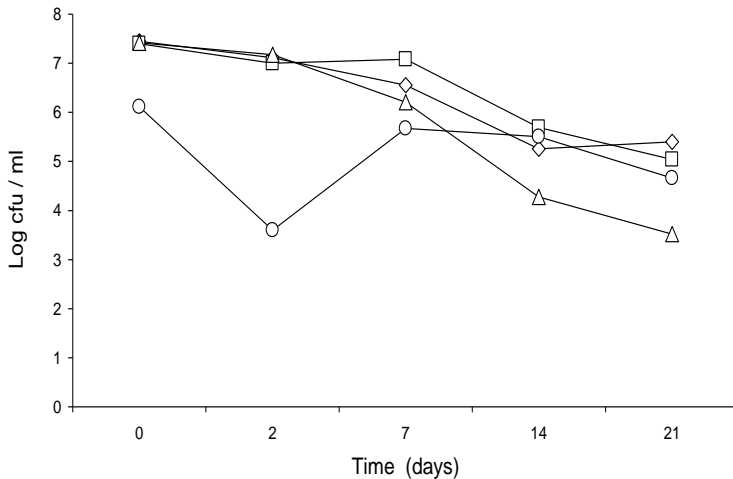


FIG. 1. Culturability of *E. amylovora* in different water microcosms at 26°C: Δ, deionized water; ○, drinking water; □, rain water and ◇, irrigation water.

The starvation-survival response of *E. amylovora* in irrigation water microcosms after six months at 26°C was similar for all the strains, demonstrating its long survival in sterilized water. The starvation-survival response of the French reference strain is represented in Fig. 2. Total and viable bacterial counts remained quite similar to those at the inoculation time, about 10^8 and 10^7 cells/ml, respectively, while culturable counts declined progressively up to 2-3 logarithmic units over the experimental period. The differences observed between the numbers of viable and culturable cells indicate that a fraction (2-3 log units) of the

viable population of *E. amylovora* in irrigation water loses its culturability on solid medium.

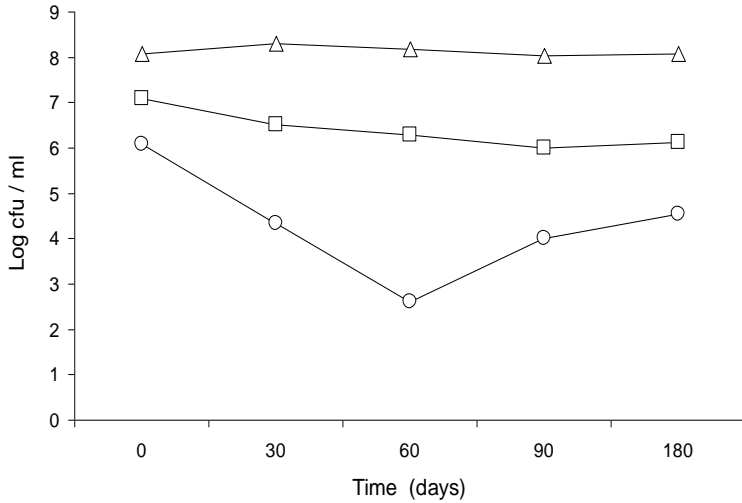


FIG.2. Starvation-survival response of *E. amylovora* in irrigation water microcosms maintained at 26°C: ○, plate counts on King's B medium; □, viable cell counts, and Δ, total cell counts.

Regarding experiments in water microcosms at 5°C, the number of culturable cells on King's B solid medium remained at the initial levels (approximately 10^7 cfu/ml) during the three months assayed, as shown in Fig. 3 for strain CFBP 1430.

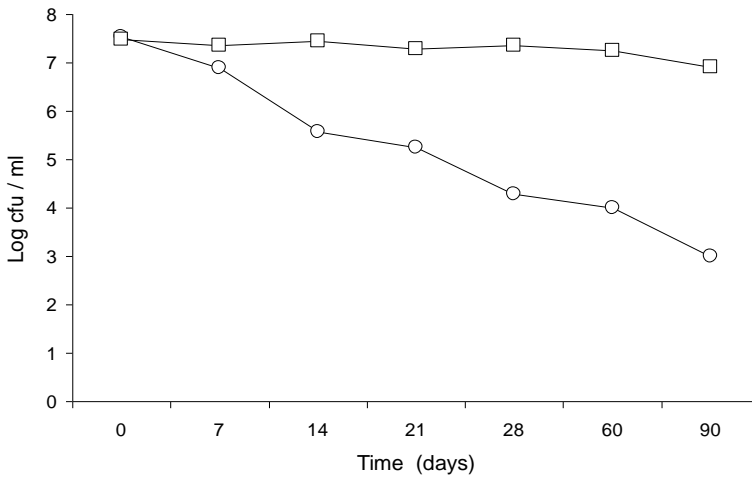


FIG. 3. Temperature effect on the culturability of *E. amylovora* in irrigation water microcosms on King's B solid medium at 26°C (○) and 5°C (□).

3A.4.2. Pathogenicity assays

E. amylovora cells starved for three and six months in irrigation water microcosms at 26°C were able to produce typical necrosis and exudates in green pears. Starved cells after three months at 5°C also developed these same disease symptoms. *E. amylovora* colonies were recovered from affected fruits.

3A.5. DISCUSSION

The role of irrigation water as inoculum source of *E. amylovora* depends on how long this bacterium survives in water, among other factors. The survival experiments in sterile water microcosms conducted in the present study have demonstrated, for the first time, that *E. amylovora* is able to survive in water from different sources including irrigation water. These results are in contrast to the short survival time previously reported for suspensions of this bacterium in distilled water [Goodman, 1983] but they are similar to those reported for other important plant pathogenic bacteria that have been shown to survive for an extended period in water [Manahan and Steck, 1997; van Elsas *et al.*, 2001, Biosca *et al.*, 2005]. However, a progressive loss of culturability on solid media (from 2 to 3 logarithmic units) was observed throughout the experimental period, being the rate at which cells became nonculturable dependent on the nutrient content and the presence of chlorine among waters. Since cells maintained their viability along the study, it seems that the inability to multiply on isolation medium of one fraction of the viable population of *E. amylovora* was due to chlorine and/or the low nutrient availability in the water microcosms. Similar results have been reported in other bacteria exposed to the starvation conditions characteristics of water ecosystems and/or other stressful factors such as chlorine [Byrd *et al.*, 1991; Manahan and Steck, 1997; Ghezzi and Steck, 1999]. The existence of such viable but nonculturable (VBNC) cells of *E. amylovora* could lead to an underestimation of the pathogen population from environmental sources when using only cultural methods. Consequently, the epidemiological significance of this

bacterial state on the life of this pathogen outside host plants and the disease cycle should be determined.

Little is known about the survival of *E. amylovora* during colder months but a negative effect of cold storage in saline solution and apple calyxes has been reported [Hale *et al.*, 1999]. In the present study, *E. amylovora* cells kept at 5°C in sterile irrigation water retained their culturability on King's B solid medium at similar levels to those of the inoculation time while a decline was observed in the microcosms incubated at 26°C within three months. Then, low temperature does not seem to affect negatively its survival in water and it has been described that this pathogen can grow at 3-5°C [Billing *et al.*, 1961]. The former suggest that the overwintering of *E. amylovora* may be more related to the lack of nutrients in the plant during host dormancy [Vanneste and Eden-Green, 2000] than to low temperatures. In fact, nutritional differences have been suggested to explain a higher survival of *E. amylovora* in nutrient broth than in saline solution at 0°C [Hale *et al.*, 1999].

Inoculation assays have shown that *E. amylovora* cells were pathogenic on green pears after being maintained for six months in sterile irrigation water. Such starved cells also were infective even when incubated at low temperature for three months. Thus, the maintenance of the pathogenicity of *E. amylovora* in water microcosms could support the possible role of water as a reservoir and dissemination route of this bacterium.

Taken together, these results have shown that *E. amylovora* is able to survive and remain infective for six months in sterile water,

suggesting that the oligotrophic conditions found in natural aquatic environments may allow the survival of the fire blight pathogen. Then, the risk of waterborne transmission of *E. amylovora* by irrigation exists, but further studies are in progress to determine the real importance of water in fire blight epidemiology and management.

3B. *Erwinia amylovora* survives in natural water

3B.1. Abstract

The role of water in the dissemination of *Erwinia amylovora* has not been demonstrated, although it has been recently shown that this pathogen can survive in sterile water and maintain its pathogenicity up to three years (Biosca *et al.*, 2006a, 2006b). However, its possible survival in nonsterile natural water has not been investigated yet. In this study, the survival of *E. amylovora* under natural oligotrophic conditions of rain water microcosms was monitored for 45 days at 26° C, using sterile water microcosms as control. Microscopic bacterial cell counts were monitored by the Live/Dead viability kit, and culturability by plate counts on non-selective King's B medium. The pathogenicity of *E. amylovora* cells from these microcosms was evaluated by using immature pear fruits. The pathogen was able to survive in rain water microcosms in the presence of water microbiota at warm temperatures along the experimental period. However, a progressive loss of culturability on solid media from 10^7 to 10^5 - 10^3 cfu/ml throughout the time was observed in *E. amylovora* populations, more pronounced in nonsterile water. This was concurrent with an increase in the numbers of native bacteria present in some rain water samples, suggesting that the survival of this pathogen was affected by nutrient limitation as well as by bacterial competition. Starved cells of *E. amylovora* in natural water retained their pathogenicity for pear fruits. These results demonstrate, for the first time, the survival of

E. amylovora in natural water and the risk of environmental waters as reservoirs and dissemination ways for this bacterium.

3B.2. INTRODUCTION

Fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, is still causing serious economic losses worldwide. Its difficult management has been associated with the ability of this pathogen to persist in different reservoirs and to disseminate by several routes. Nevertheless, very little is known about the survival of this bacterium when it is released into poor surrounding environments such as waters from diseased host plants. The survival of *E. amylovora* in aquatic habitats has received little attention until recently, since it has been considered that this bacterium was unable to survive in this medium for long periods [Goodman, 1983]. However, wind-driven rain, aerosols and agricultural water have been associated with fire blight dissemination [MacManus and Jones, 1994; Thomson, 2000]. In fact, recent data have shown that *E. amylovora* can survive in sterile water from different sources and maintain its pathogenicity in irrigation water up to three years [Biosca *et al.*, 2006a, 2006b], being nutrient deprivation one major factor influencing its survival [Biosca *et al.*, 2006a, 2006b]. It is well known that this environmental stress stimulates a starvation–survival response in many nonsporulating bacteria, allowing their survival in a culturable state [Morita, 1997]. This abiotic stress has also been involved in the activation of other survival mechanism, the viable but nonculturable (VBNC) state [Roszak and Colwell, 1987] in which

viable bacteria are unable to grow on plates. Under oligotrophic conditions common in natural waters *E. amylovora* populations display, at least, these two survival strategies: a fraction of its population undergo a starvation–survival response, while other enters into the VBNC state [Biosca *et al.*, 2006a, 2006b]. Both survival mechanisms allow long-term persistence of this pathogen in sterile natural water [Biosca *et al.*, 2006a, 2006b].

The survival of *E. amylovora* in natural water may be also influenced by water microorganisms, but no studies so far have investigated the fate of this bacterium in environmental waters despite it may have serious implications. The aim of this study has been to determine whether the fire blight pathogen is able to survive and remain infective in nonsterile natural water, in the presence of water biota, at warm temperatures, using sterile natural water as control.

3B.3. MATERIALS AND METHODS

3B.3.1. Bacterial strains and preparation of water microcosms

E. amylovora strain CFBP-1430 (CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes) was selected as representative for the present study. For the survival experiments in natural water, the microcosms were prepared using nonsterile rain water (NSW) samples freshly collected at different times, and sterile water (SW) microcosms were included as control. Both types of microcosms were inoculated with strain CFBP-1430 at a final density of 10^7 cfu/ml

and maintained at 26°C up to 45 days, as previously described [Biosca *et al.*, 2005].

3B.3.2. *E. amylovora* cell counts

The culturability and viability of the inoculated strain in NSW and SW microcosms were monitored at time zero, after 48 h and weekly along 45 days. Colony counts were routinely determined on King's B medium [King *et al.*, 1954], and on CCT [Ishimaru and Klos, 1984] for some water samples. The viability of bacterial cells was determined by epifluorescence microscopy using the Live/Dead kit (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg.).

3B.3.3. Pathogenicity of *E. amylovora* in natural water

The infectivity of starved *E. amylovora* cells from NSW and SW microcosms was evaluated by inoculation on green pears (var. Williams) as described [EPPO, 2004], after 45 days of incubation in water microcosms. A suspension of *E. amylovora* cells grown on King's B medium and sterile PBS were used as positive and negative control, respectively. Symptoms development at 26°C was monitored daily up to 2 weeks.

3B.4. RESULTS

3B.4.1. Fate of *E. amylovora* in natural water microcosms

E. amylovora was able to survive in rain water microcosms under natural nutrient limitation conditions and in the presence of

indigenous organisms at 26°C, along the 45-day period. Representative survival curves of strain CFBP 1430 in SW and NSW microcosms are shown in Fig. 1. In both types of microcosms, total and viable *E. amylovora* populations remained at similar levels than at the inoculation time, about 10^8 and 10^7 cells/ml, respectively. However, different trends in the culturability of the inoculated strain were observed depending on whether natural water was sterile or not. In SW microcosms (upper graph), *E. amylovora* culturable numbers on King's B plates declined progressively from 10^7 to 10^5 cfu/ml within the first two weeks and then maintained its numbers over the experimental period. By contrast, in NSW microcosms (lower graph) culturability fell to 10^4 cfu/ml by the second week but the decrease continued to 10^3 cfu/ml in the following weeks (then being two logarithmic units lower than in SW microcosms at the end of the experiment). Since viable populations of *E. amylovora* in rain water were similarly maintained in SW and NSW microcosms along the experimental period (Fig. 1), the observed declines in culturable numbers in both types of microcosms, implies that a fraction of the viable population entered into the VBNC state. Because the loss of culturability was more pronounced in NSW microcosms, an additional effect of water biota is also suggested, despite total numbers of *E. amylovora* did not change greatly in nonsterile water.

Initial culturable numbers of native bacteria in rain water were around 10^1 cfu/ml, reaching 10^2 cfu/ml in some water samples. Some of these native bacteria, which increased its initial numbers during survival experiments (data not shown), were fluorescent on King's B plates and grew faster than the fire blight pathogen on this nonselective medium. To prevent overgrowth of rain water bacteria,

the semiselective medium CCT was initially included for *E. amylovora* plaque counts. However, a marked decline in the culturability of the inoculated strain was observed on CCT plates during the first weeks of the experiment, being around two to three logarithmic units lower than that on King's B. Afterwards, *E. amylovora* counts on CCT plates dropped below the level of detection (10 cfu/ml) while it was still culturable on King's B medium.

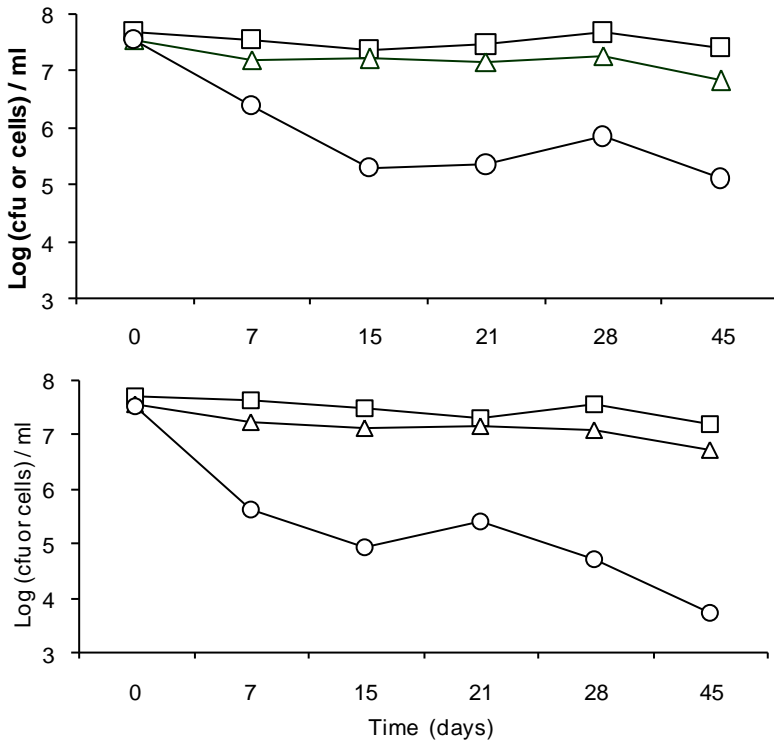


Fig.1. Survival curves of *E. amylovora* in sterile (upper graph) and nonsterile (lower graph) rain water microcosms maintained at 26°C: ○, plate counts on King's B medium; Δ, viable cell counts, and □, total cell counts.

3B.4.2. Pathogenicity of *E. amylovora* in natural water microcosms

E. amylovora cells starved for 45 days in natural water microcosms at 26°C remained infective for immature pears, causing typical symptoms, and the pathogen was isolated from diseased fruits.

3B.5. DISCUSSION

In previous work, we showed that *E. amylovora* was able to survive in sterile water from different sources [Biosca *et al.*, 2006b], suggesting that waterborne transmission of this pathogen could be possible. Bacterial survival in natural waters can also be affected by biotic factors, although to date no studies have addressed the survival of *E. amylovora* in the presence of native water microbiota. As a first approach, in the present study we used freshly collected rain water because it has been reported as responsible for dispersal of the pathogen in orchards [Thomson, 2000]. Survival results have shown that *E. amylovora* can survive in natural rain water at 26°C within the 45-day period assayed.

In sterile water microcosms, used as control, total and viable *E. amylovora* populations maintained its numbers along the experiment, while a fraction of the viable population lost its culturability in nutrient-poor rain water entering into the VBNC state. These results were consistent with those reported before in sterile water from several sources [Biosca *et al.*, 2006a, 2006b], confirming

the persistence of *E. amylovora* culturable populations under starvation conditions, but with a subpopulation of the pathogen entering into the VBNC state. They are also in agreement with previous studies in other plant bacteria when exposed to common nutrient depletion conditions of water habitats [Manahan and Steck, 1997; Ghezzi and Steck, 1999], and confirm the risk of the presence of *E. amylovora* in the environment, particularly in the VBNC state. Interestingly, the decline in culturability was more pronounced on CCT than on King's B plates (data not shown), suggesting that inhibitory compounds of this semiselective medium negatively affect the recovery of culturable cells of the pathogen, at least, under starvation conditions.

In nonsterile water microcosms, trends in total and viable populations of *E. amylovora* were similar to those in sterile water, but a greater proportion of viable cells became nonculturable, suggesting that biotic factors may also be involved. Since total and viable numbers were maintained and did not change greatly in NSW microcosms compared to SW, it seems that predation and parasitism apparently would not affect *E. amylovora* survival in the rain water used. However, the marked decline in plaque counts of the pathogen in nonsterile water was coincident with an increase in the numbers of native bacteria present in rain water, some of which grew faster on King's B plates than the inoculated strain. Thus, the survival of *E. amylovora* in rain water could also be affected by competition with indigenous bacteria for scarce nutrients, although bacterial antagonism or inhibitory substances can not be discarded. The influence of freshwater microbiota on the persistence of other important plant pathogenic bacteria in natural water has also been

described in early studies [Scanferlato *et al.*, 1989; van Elsas *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2007].

Regarding pathogenicity, starved *E. amylovora* cells for 45 days from both SW and NSW microcosms were able to cause necrosis and exudates on pear fruits, showing that natural water can act as an inoculum source of the fire blight pathogen, as described for other erwinias [Cappaert *et al.*, 1988; Scanferlato *et al.*, 1989].

Overall, the present results demonstrate, for the first time, the survival of *E. amylovora* in natural water, showing that its persistence in rain water was affected, at least, by nutrient limitation and bacterial competition and its pathogenicity is retained. These results confirm the risk of the waterborne transmission of this pathogen, raising new concerns on fire blight management.

3B.6. Acknowledgements

This work was supported by the projects AGL2004-07799-C03-02 and AGL2005-06982 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. The authors wish to thank B. Águila, J. Catalá and J. Carmona for their help in some of the assays and A. Flores (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental, Universidad de Valencia) for expert technical assistance.

4. Improvement of the recovery of *Erwinia amylovora* stressed cells on RESC, a simple, rapid and differential culture medium

**Mónica Ordax, Elena G. Biosca,
María M. López, and
Ester Marco-Noales.**

International Microbiology (to be submitted)

4.1. Abstract

The bacterium *Erwinia amylovora* causes fire blight, a serious and widespread disease of several pome fruits and ornamental plants. The use of suitable detection tools is essential for preventing further dissemination. According to the protocol of the European and Mediterranean Plant Protection Organization, the isolation and further identification of *E. amylovora* is the only conclusive test of its presence. However, bacterial growth on solid media can be hampered when the pathogen is under stressful conditions. On the other hand, it is known that copper is an essential micronutrient that furthermore, in *E. amylovora*, increases the exopolysaccharide production in a rich-nutrient medium. To improve the recovery of *E. amylovora* under unfavourable conditions, we have modified the common non-selective culture King's B (KB) medium by adding 1.5 mM CuSO₄. In this new medium named RESC (Recovery *E. amylovora* Stressed Cells), the plating efficiency of several strains of *E. amylovora in vitro* and the isolation from natural samples was higher than on other media routinely employed, particularly when the pathogen was under stressful conditions. Thus, the recovery of different types of stressed *E. amylovora* cells (by nutrient deprivation, presence of copper ions and UV irradiation) was significantly improved on RESC, extending the culturability period. Therefore, RESC turns into a useful and valuable medium for the isolation of *E. amylovora* when adverse conditions in its natural environment are expected.

4.2. INTRODUCTION

The bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* [1920] is the causal agent of fire blight, the most serious disease of several pome fruits and ornamental plants in the Rosaceae family [van der Zwet and Beer, 95]. It has been reported in more than 40 countries around the world, representing a threat to the pome fruit industry since its control is still not fully successful. Consequently, there is a specific legislation in the European Union to prevent the dissemination of *E. amylovora*, where it is considered a quarantine organism [Anonymous, 2000, 2003]. The phytosanitary measures involve the use of suitable detection tools for analysis of symptomatic and asymptomatic plants to avoid a further spread of the disease [López *et al.*, 2003 y 2006]. Moreover, the standard PM7/20 of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) [EPPO, 2004] recommends serological and PCR-based techniques for a rapid screening of the samples, but requires the isolation of the bacterium, followed by a further identification, for the definitive confirmation of the pathogen presence.

The isolation of *E. amylovora* from symptomatic plant material is relatively easy because the usually high number of culturable bacteria [EPPO, 2004]. However, under adverse conditions (old or very advanced symptoms, unfavourable weather conditions, copper-treated samples, nutrient starvation, etc.) the number of *E. amylovora* culturable cells can be very low [van der Zwet and Beer, 1995; Thomsom, 2000; Biosca *et al.*, 2006; Ordax *et al.*, 2006]. In fact, some stress conditions can alter the bacterial physiological state,

hindering their growth and isolation on laboratory media [Brewer *et al.*, 1977; Bissonnette *et al.*, 1975]. Thus, it has been demonstrated that *E. amylovora* can enter into the viable but non-culturable (VBNC) state at low copper concentrations in non copper-complexing mineral medium [Ordax *et al.*, 2006] as well as under starvation conditions in natural water [Biosca *et al.*, 2006]. The existence of such cells in the field represents a threat since this pathogen can be viable, although not detected on solid medium. Further, it can revert from this unculturable state regaining also its pathogenicity [Ordax *et al.*, 2006]. Therefore, the optimization of culture media to improve the recovery of *E. amylovora*, particularly under stressful conditions, is necessary for both diagnostic and control purposes. Three media are advised for the maximum recovery of *E. amylovora* from plant material [EPPO, 2004]: the non-selective media King's B (KB) [King *et al.*, 1954] and Sucrose Nutrient Agar (SNA) [Lelliot, 1967], and the semi-selective medium CCT [Ishimaru and Klos, 1984].

On the other hand, it is well-known the role of copper ions as an essential micronutrient for bacterial growth (due to its involvement in fundamental biological reactions), despite above certain levels they become toxic [Saxena *et al.*, 2002]. Interestingly, relatively high copper concentrations can increase the bacterial growth when they are added to rich growth media [Granger and Ward, 2003; Yamasaki *et al.*, 2004]. This is explained because the complexing of most of the copper ions to common medium components, reducing their toxic concentrations to those that promote bacterial growth [Ramamoorthy and Kushner, 1975; Zevenhuizen *et al.*, 1979; Angle *et al.*, 1992]. Copper has been used in the culture medium MM₂Cu for

E. amylovora [Bereswill *et al.*, 1998], where the metal leads to the formation of characteristic mucoid and yellow colonies. Besides, in a previous work where we determined the MIC copper concentration for *E. amylovora* on KB solid medium [Ordax *et al.*, 2006], we observed a fast colonies appearance of this bacterium when copper was at sub-MIC copper concentrations. Then, we have taken advantage of the beneficial effects of copper on *E. amylovora* in nutrient-rich media with the objective of improving the recovery of stressed cells of this pathogen. The resultant medium named RESC (Recovery *E. amylovora* Stressed Cells), was tested *in vitro* and *in vivo* for the isolation of the pathogen in the presence of the most frequent plant epiphytic bacteria found in its hosts. All the growth media mentioned above (KB, SNA, CCT and MM_2Cu) were used for comparative purposes. The RESC medium was evaluated for the recovery and enumeration of *E. amylovora* cells stressed by nutrient deprivation, presence of free Cu^{2+} ions, and UV irradiation, to mimic some adverse conditions that the pathogen usually finds in/on the plants in the nature [Vanneste and Eden-Green, 2000; Dulla *et al.*, 2005].

4.3. MATERIAL AND METHODS

4.3.1. Bacterial strains

Three bacterial strains of *E. amylovora* were initially tested on the modified RESC medium: CFBP1430, the French reference strain from the Collection Française des Bactéries Phytopathogènes; IVIA1892-1, a Spanish strain from bacterial collection of the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA); and the German strain Ea1/79 (kindly provided by K. Geider) (Table 1). Two typical epiphytic bacteria frequently found in *E. amylovora* host plants were also assayed: *Pantoea agglomerans* (named before *Erwinia herbicola*) strain EPS411, and *Pseudomonas fluorescens* strain EPS347, both isolated from *Pyrus communis* in Spain (generously provided by E. Montesinos). Once the copper concentration for being added to KB medium was determined, a selection of 20 strains of *E. amylovora* from different countries and hosts, and 3 levan-deficient strains (obtained by K. Geider and kindly provided by him) (Table 1) were also tested for their growth on RESC medium.

TABLE 1. *E. amylovora* strains assayed on RESC solid medium (in alphabetic order of origin country).

Strain	Origin	Host
Ea FG2	Bulgaria	<i>Pyrus communis</i>
NCPPB311	Canadá	<i>P. communis</i>
NCPPB1734	Egypt	<i>P. communis</i>
NCPPB595	England	<i>P. communis</i>
CFBP1430	France	<i>Crataegus sp.</i>
Ea1/79	Germany	<i>Malus sp.</i>
Ea1/79-18M*	Germany	-
Ea1/79-5M*	Germany	-
Ea7/74-LS7*	Germany	-
NCPPB3159	Holland	<i>Malus sp.</i>
OMP-BO1185	Italy	<i>Malus sp.</i>
NCPPB2080	New Zealand	<i>P. communis</i>
IVIA1777-1	Spain (Álava)	<i>Pyracantha sp.</i>
IVIA1892-1	Spain (Guadalajara)	<i>P. communis</i>
IVIA1899-21	Spain (Guadalajara)	<i>Cydonia sp.</i>
UPN538	Spain (Guipúzcoa)	<i>Cotoneaster sp.</i>
IVIA1951-6	Spain (Huesca)	<i>Sorbus sp.</i>
IVIA2311-19	Spain (La Rioja)	<i>P. communis</i>
IVIA1909-3	Spain (Lérida)	<i>P. communis</i>
IVIA1985	Spain (Madrid)	<i>Pyracantha sp.</i>
UPN528	Spain (Navarra)	<i>Malus sp.</i>
IVIA1614-2	Spain (Segovia)	<i>Pyracantha sp.</i>
IVIA2303-3	Spain (Zaragoza)	<i>P. communis</i>
NCPPB3548	Turkey	<i>Eriobotrya sp.</i>
E9	USA	<i>Malus sp.</i>
NCPPB2292	USA	<i>Rubus idaeus</i>

*Levan-deficient mutants obtained by K. Geider in the laboratory.

4.3.2. Selection of the copper sulphate concentration for adding to KB medium

The MIC of copper for *E. amylovora* in KB liquid medium was determined by adding copper as CuSO_4 (Sigma-Aldrich Chemie, Germany) at increases of 0.5 up to 5 mM.

To select the copper concentration for being added to KB medium, 20 μl from 48 h old cultures of *E. amylovora*, *P. agglomerans* or *P. fluorescens* strains in KB broth were separately inoculated at 10^5 cfu/ml in 200 μl of the same medium, but with increasing sub-MIC copper concentrations from 0.25 mM CuSO_4 . The experiments were quadrupled in the same assay and repeated independently using the Bioscreen C system (Labsystems, Finland), at 26° C and temporary shaking at intervals of 1 h. The O.D. at 600 nm was recorded along 120 h.

4.3.3. Copper complexing measurements of KB broth

Additionally, it was quantified the copper complexing ability of KB broth supplemented with sub-MIC copper concentrations, as well as its components separately (dissolving them in bidistilled water in the same proportion as they are in this medium). The Microquant Copper Test (Merck, Darmstadt, Germany) was used according to the manufacturer's instructions for the quantification of the copper ions bound by KB broth.

4.3.4. Growth media and incubation conditions

Once the optimal copper sulphate concentration to promote *E. amylovora* growth on KB medium with copper was determined, the new culture medium RESC (Recovery of *E. amylovora* Stressed Cells) was prepared by adding filter sterilized CuSO_4 to sterile KB at 1.5 mM as final concentration. Stock copper sulphate was prepared by dissolving it in distilled water at 10x concentration, sterilized by filtration and stored at 5°C in dark. For comparative purposes, we also used the advised media in the EPPO standard PM7/20 [EPPO, 2004] for the recovery of *E. amylovora*: KB, SNA and CCT, as well as the complex copper-containing medium designed for this pathogen, MM_2Cu [Bereswill *et al.*, 1998], that contains 2 mM CuSO_4 together with several salts, asparagine, sorbitol, nicotinic acid and thiamine hydrochloride. All media were incubated at 26°C, and the incubation periods were those recommended for each culture medium. Thus, KB [King *et al.*, 1954], SNA [Lelliot, 1967] and RESC [this work] plates were incubated 48 h, CCT 72 h [Ishimaru and Klos, 1984], and MM_2Cu 96 h [Bereswill *et al.*, 1998].

4.3.5. Evaluation of RESC medium *in vitro*: enumeration of *E. amylovora* cells from mixed cultures with epiphytic plant bacteria

E. amylovora, *P. agglomerans* or *P. fluorescens* strains grown in KB broth were mixed in sterile distilled water at a final ratio of 1:1, 1:10 and 1:100 for *E. amylovora* to the two epiphytic bacteria (each one separately or the two together for each ratio) at 10^8 cfu/ml.

Afterwards, these bacterial suspensions were ten-fold serially diluted in phosphate buffer and plated, in duplicate, on the five growth media mentioned above. The culturable cells were enumerated after the recommended incubation period for each medium (see above) at 26°C. The whole experiment was independently repeated twice.

4.3.6. Evaluation of RESC medium *in vivo*: isolation of *E. amylovora* from field samples

Three adjoining orchards of pear trees (*P. communis* cv. Conference and cv. Blanquilla) from the north of Spain (Logroño, La Rioja) were sampled and processed according to the EPPO standard PM7/20 [EPPO, 2004]. Several pear trees and *Crataegus azarolus* showed different fire blight symptoms (Fig. 1), being collected a wide range of both symptomatic and asymptomatic plant material samples.

As it is indicated in the EPPO standard PM7/20, symptomatic samples were processed and plated on KB, SNA and CCT, after a previous enrichment in KB and CCT broths in the cases of asymptomatic ones. The recovery medium RESC was included in all cases, as well as the MM₂Cu, the other copper-containing medium for *E. amylovora*. Colonial morphotypes appearing on each medium were registered. Colonies with *E. amylovora* like-morphology were selected and tested by ELISA-DASI [Gorris *et al.*, 1996b] and PCR [McManus and Jones, 1995].

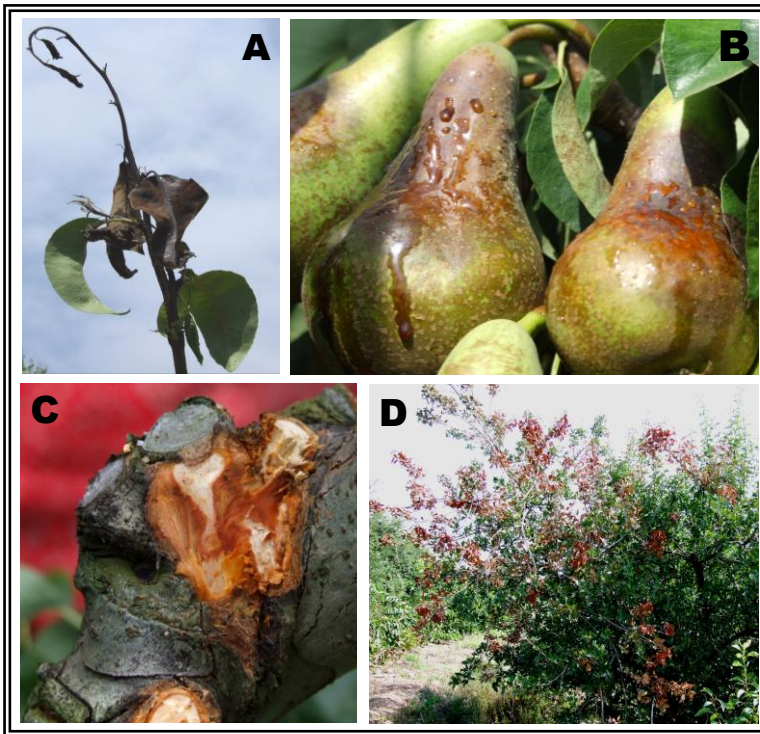


FIG. 1. Representative fire blight symptoms observed in orchards in the north of Spain (Logroño, La Rioja, 2006). A) pear shoot as “shepherd’s crook”; B) exudates on mature pear fruits; C) bark canker in pear tree; D) *Crataegus azarolus* showing several branches with brown leaves.

4.3.7. Evaluation of RESC medium for the enumeration of *E. amylovora* stressed cells

Three stress conditions were assayed for all *E. amylovora* strains: nutrient deprivation, presence of free copper ions in non copper-complexing mineral medium, and UV irradiation. For starvation and copper exposure, 10^8 cfu/ml of each *E. amylovora* strain was inoculated in containers with 150 ml of sterile mineral medium AB [Alexander *et al.*, 1999], or AB with 0.005 mM CuSO_4 , respectively. All

the containers were kept at 26°C during 8 months, and aliquots of 1 ml were taken regularly at various times after inoculation (time zero) for monitoring the culturability of the stressed *E. amylovora* cells. The UV-stressed cells were obtained after UV irradiation of bacterial suspensions at 10⁸ cfu/ml in phosphate buffer during 10 or 20 min with a lamp of 30 w situated 10 cm away. An identical bacterial suspension not exposed to UV irradiation was included as negative control. Aliquots of 1 ml from each suspension were plated after UV exposure. In all cases, ten-fold serial dilutions from the aliquot were plated in duplicate on the five growth media included in this work, and examined after the incubation period. In the case of copper stress, it was also quantified the number of viable cells by the Live&Dead kit (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg., USA) due to its nature as inductor factor of the VBNC state in *E. amylovora* [Ordax *et al.*, 2006]. All experiments were repeated in independent assays.

4.3.8. Statistical analysis

The data (culturable *E. amylovora* counts and also viable cell counts in the experiment of copper stress) were expressed as the means of two determinations (after log-transformation) from two independent experiments (see Figures 5, 6, 8 and 9 from Results section). Statistical significance of the differences among the means was determined by a three-way factorial ANOVA analysis for both *in vitro* (Fig. 5) and *in vivo* (Fig. 6) assays. In the *in vitro* assays the three factors considered for each strain were: experiment, *E. amylovora* ratio and culture medium. In the *in vivo* ones, for each vegetal sample the factors were: experiment, type of plant material and

culture medium. In the assays with stressed cells (Figs. 8 and 9), the ANOVA analysis was four-way factorial, and the four factors considered for each time point were: experiment, strain, type of stress and culture medium. A *p* value below 0.05 was considered significant. The null data corresponding to those time points in where none *E. amylovora* colony was recovered on the plates (Fig. 8B) were not included in the analysis. In addition, the trends in the population dynamics among the culturability curves on the different growth media for starved and copper stressed *E. amylovora* cells were analysed by covariance analysis to test the quality of the slopes throughout the experimental period.

4.4. RESULTS

4.4.1. Copper complexing ability of KB broth

The KB broth showed a great ability to bound Cu^{2+} ions, reaching even 50% at 2.5 mM CuSO_4 , the MIC of copper for *E. amylovora* in this medium (Fig. 2). When each component of KB broth was assayed separately, the peptone showed the highest percentage of cations complexed (Fig. 2).

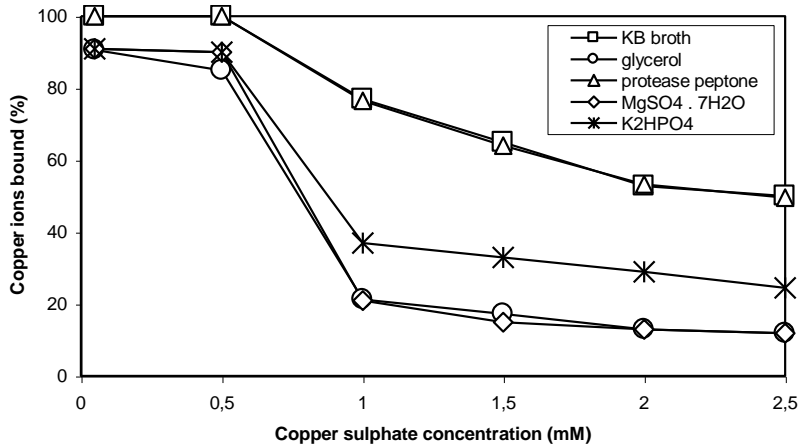


FIG. 2. Copper complexing ability of KB broth and its components separately (dissolved in bidistilled water in the same proportion as in KB) measured by Microquant Copper Test (Merck, Darmstadt, Germany). Copper was added as CuSO_4 at sub-MIC concentrations.

4.4.2. Selection of copper sulphate concentration: the RESC medium

The MIC of copper in KB broth for *E. amylovora* was 2.5 mM CuSO_4 . The growth curves obtained with *E. amylovora*, *P. agglomerans* and *P. fluorescens* strains in KB broth with sub-MIC CuSO_4 concentrations were analyzed to select the optimal one for the recovery of *E. amylovora* in the presence of the most-common epiphytic bacteria in its host plants. Representative growth curves are shown in Fig. 3. Since the results obtained with three selected strains of *E. amylovora* were similar, only the strain CFBP1430 is represented. It was observed that at copper concentrations below 1.5 mM CuSO_4 (Fig. 3A, B), growth of the epiphytic bacteria was significantly higher ($p < 0.05$) than that of

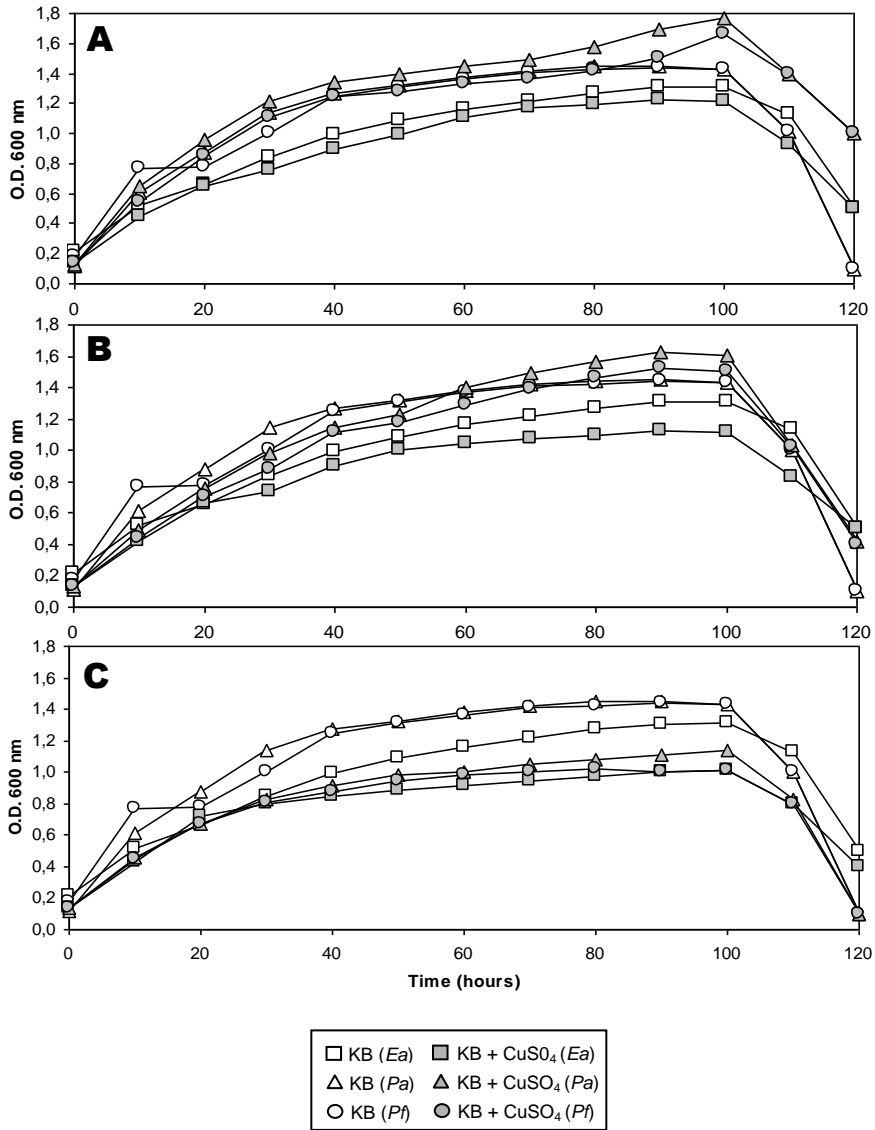


FIG.3. Growth curves of *E. amylovora* (*Ea*) CFBP 1430 strain (squares), *P. agglomerans* (*Pa*) EPS 411 strain (triangles), and *P. fluorescens* (*Pf*) EPS347 strain (circles), over 120 hours in KB broth alone (open symbols) or supplemented with copper (grey symbols): A) 0.5 mM CuSO₄; B) 1 mM CuSO₄; C) 1.5 mM CuSO₄. Curves were obtained using the Bioscreen C system (Labsystems, Finland), at 26° C and with temporary shaking at intervals of 1 h.

E. amylovora (3-4 decimal points in the absorbance measurements). However, at 1.5 mM CuSO₄ (Fig. 3C), the growth of the two epiphytic bacteria became significantly lower ($p < 0.05$) than in without copper, and similar to the growth of *E. amylovora*, reaching the three species very close cell numbers (D.O.₆₀₀ around 0.8). Above 1.5 mM CuSO₄ the growth of *E. amylovora* became to be hampered (data not shown). Then, 1.5 mM CuSO₄ was selected as the final concentration to be added to KB medium, being named RESC.

4.4.3. Colonial morphology of *E. amylovora* on RESC medium

After 48h at 26°C, the colonies of all *E. amylovora* strains assayed on RESC medium (including the levan mutants) appeared yellowish, circular, domed, smooth and very mucoid, ranging in size from 2.5 to 4.5 mm, while on KB medium they were creamy white, circular and smaller (1-1.2 mm) [King *et al.*, 1954] (Fig. 4). Due to the increase of the mucus in *E. amylovora* colonies on RESC, they were easily visible after only 24-36 h of incubation.

The colonies of the plant epiphytic bacteria assayed showed also a change in their colour, turning from deep yellow to orange in *P. agglomerans*, and from light to deep cream in *P. fluorescens*, in this case also with the characteristic surrounding yellow fluorescent pigment turned to light orange (Fig. 4). Consequently, they were easily distinguished from *E. amylovora*.

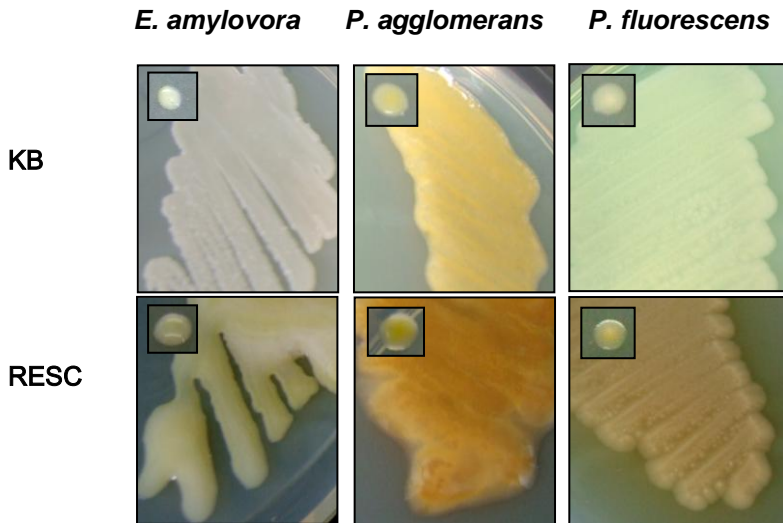


FIG. 4. Growth and colonial morphology of *E. amylovora*, *P. agglomerans* and *P. fluorescens* (CFBP1430, EPS411, EPS347 strains, respectively) on KB and RESC growth solid media after 48h at 26°C.

4.4.4. Recovery efficiency of *E. amylovora* on RESC medium *in vitro*

Culturable cell counts of *E. amylovora* from mixed cultures with *P. agglomerans* and/or *P. fluorescens* in the ratios in where the pathogen was in a lower proportion (1:10 and 1:100) are shown in Fig. 5A. The results with the three assayed strains of *E. amylovora* were very similar, so only the strain CFBP1430 is represented in the graph. Numbers of *E. amylovora* culturable cells on RESC medium were always significantly higher ($p < 0.05$) than those on the other assayed media (0.4 – 1 logarithmic order higher than KB/SNA, 0.3 – 0.8 than CCT, 0.2. – 0.7 than MM₂Cu), with a very small standard deviation in all cases (0.001 - 0.06) (Fig. 5A). Remarkably, the

differences on the efficiency of recovery of *E. amylovora* cells between RESC medium and the other media were noticeable even in the mixed cultures where the pathogen was in the lowest proportion (1:100) (Fig. 5A). On the other hand, the two epiphytic strains assayed grew at significantly ($p < 0.05$) lower levels on RESC medium than on the other media assayed (data not shown).

4.4.5. Recovery efficiency of *E. amylovora* on RESC medium *in vivo*

The percentage of *E. amylovora* isolations from field symptomatic samples processed on different growth media are represented in Fig. 5B. No *E. amylovora*-like colonies were recovered from the asymptomatic plant material on none of the growth media assayed. However, in all the samples that showed fire blight symptoms (see again Fig. 1) colonies of the pathogen were obtained on all tested media. The recovery of *E. amylovora* from shoot and branch samples was significantly higher on RESC (99%) than on the other growth media (80-90%), or similar like in bark from cankers (Fig. 5B). All *E. amylovora*-like colonies were identified by ELISA-DASI [Gorris *et al.*, 1996b] and PCR [McManus and Jones, 1995]. On RESC plates, the colonies of *E. amylovora* showed a characteristic light yellow colour and an increase in the mucus (Fig. 6A, B), as observed previously *in vitro* (Fig. 4). These morphologic characteristics of the pathogen colonies on RESC plates make them easily distinguishable from those of the tested epiphytic bacteria (Fig. 6C). In addition, a reduction in the number of different colonial morphotypes was evident on RESC in comparison with KB (25 - 50 %) (Fig. 6D) and SNA (data not shown).

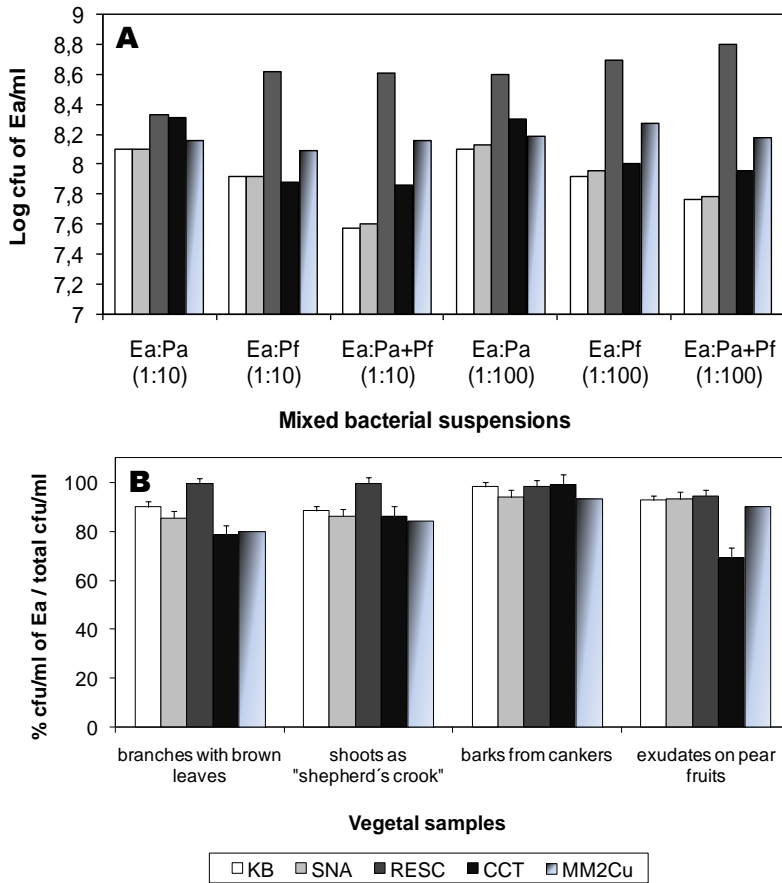


FIG. 5. Culturability of *E. amylovora* on different solid growth media. A) Culturable cell counts *in vitro*: (*Ea*) (CFBP1430 strain) from mixed cultures in ratios 1: 10 and 1: 100 with *P. agglomerans* (*Pa*) (EPS411 strain) and/or *P. fluorescens* (*Pf*) (EPS347 strain). B) Percentage of *E. amylovora* culturabile cells regarding the total ones isolated from symptomatic samples (*Crataegus azarolus*, and *Pyrus communis* cv. Conference and Blanquilla); the isolation protocol followed was that stated in the EPPO standard PM7/20 [EPPO, 2004]. Culture media and growth conditions were KB, SNA and RESC (after 48h), CCT (after 72h), and MM₂Cu plates (after 96h) at 26°C.

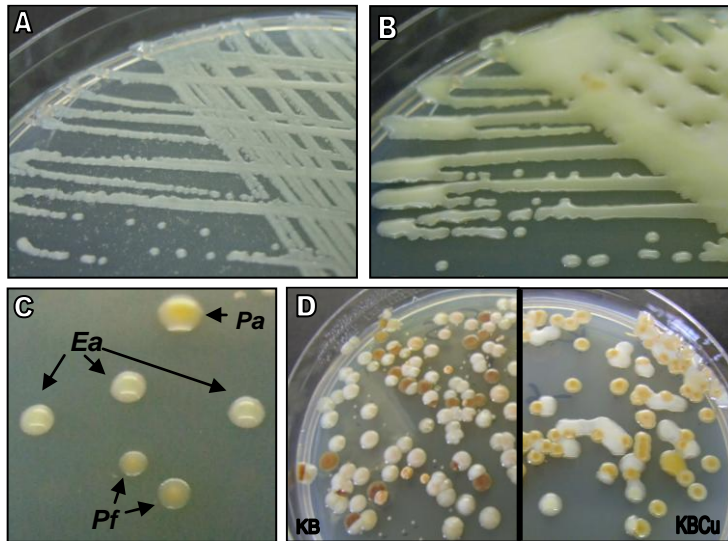


FIG. 6. Comparison of growth and colonial morphology of *E. amylovora* isolated from field symptomatic samples after 48h at 26°C on A) KB medium, and B) RESC medium. C) differentiation among colonial morphotypes of *E. amylovora* (*Ea*), *P. agglomerans* (*Pa*) and *P. fluorescens* (*Pf*) on RESC medium; D) Higher number of colonial morphotypes on KB (4) (left) than on RESC (2) (right).

4.4.6. Recovery efficiency of stressed *E. amylovora* cells on RESC medium

The results of the recovery of stressed *E. amylovora* cells on several growth solid media are shown in Figs. 7 and 8. Only the strain CFBP1430 is represented since the results were similar among all *E. amylovora* assayed strains. It was observed that the highest recovery was always obtained on RESC medium, followed by KB, SNA and MM₂Cu, regardless the type of stress imposed to *E. amylovora* cells (starvation, Fig. 7A; presence of 0.005 mM Cu²⁺, Fig. 7B; and UV irradiation, Fig. 8) and the time of exposure to the stressful conditions. The lowest recovery was always on CCT. Differences in the recovery

of the different stressed cells on RESC medium regarding to the rest of the media were always significant ($p < 0.05$).

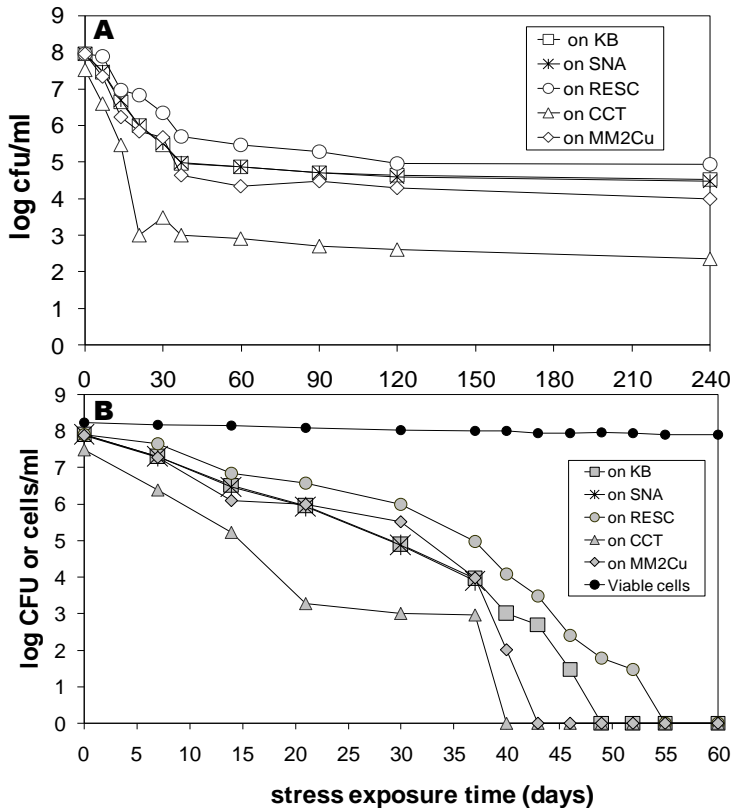


FIG. 7. Stressed *E. amylovora* cells (CFBP1430 strain) throughout 240 days on KB, SNA and RESC (after 48h), CCT (after 72h), and MM2Cu media (after 96h) at 26°C. A) culturability under starvation in mineral medium AB; B) culturability under starvation with 0.005 mM Cu²⁺. In this case, viability was also monitored to show the induction of the viable but nonculturable (VBNC) state. The minimum standard deviation (SD) was 0.001 and the maximum 0.327. The X-axis was shortened in the graph B at day 60 to improve the visualization of the differentiation in the entry time points into the VBNC state.

Under starvation stress (Fig. 7A), the culturability of *E. amylovora* decreased in all assayed media, but it was always

significantly higher on RESC. The lowest numbers of *E. amylovora* colonies were on CCT medium, being 2-3 logarithmic orders below RESC one.

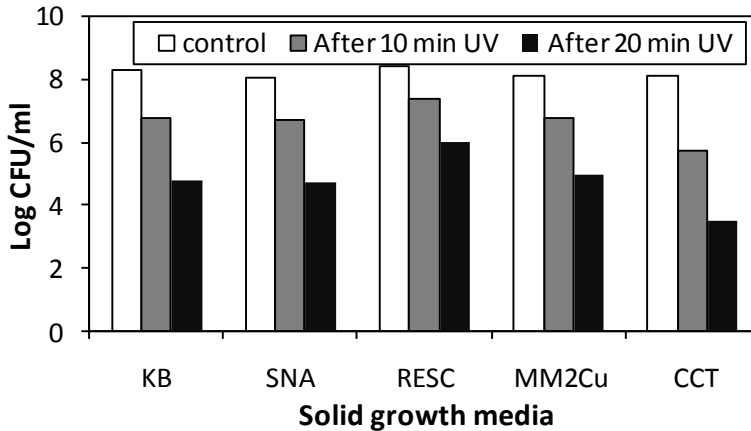


FIG. 8. Enumeration of stressed *E. amylovora* cells (CFBP1430 strain) by 10 and 20 minutes under UV irradiation (lamp 30w at 10 cm away) on KB, SNA and RESC (after 48h), CCT (after 72h), and MM2Cu plates (after 96h) at 26°C. The minimum standard deviation (SD) was 0.003 and the maximum 0.279.

Under starvation and copper stress in AB medium (Fig. 7B), it was observed the entry of *E. amylovora* into the VBNC state within the first 60 days in all assayed media, but at different rates. The culturability of *E. amylovora* was extended on RESC, being able to grow on these plates until day 55, and prolonging the time period in where the pathogen can be recovered on solid medium. By contrast, *E. amylovora* was unable to form colonies on CCT and MM₂Cu from days 40 and 43, respectively, neither on KB and SNA from day 49, in spite of the pathogen maintained its cellular viability (Fig. 7B), as determined by Live&Dead kit.

After UV stress (Fig. 8), the highest efficiency of recovery of stressed *E. amylovora* cells was also observed on RESC medium. Moreover, in this modified medium the difference in culturability between the exposure times imposed, 10 and 20 min, was more attenuated and smaller than on the other media, specially regarding to CCT. In this semiselective medium the recovery was the lowest recovery (26 – 41 % less than on RESC).

4.5. DISCUSSION

In this work we have modified one standard non-selective growth medium used for the isolation of *E. amylovora*, the KB medium, by adding copper sulphate, to improve the efficiency of recovery of this pathogen, specially under some stress conditions frequently found in its environment.

The copper sulphate concentration selected for supplementing the KB medium was 1.5 mM, the minimal one in that we observed a significant growth decrease of tested epiphytic bacteria down to the level of *E. amylovora* population. The modified medium was named RESC, according to the objective for that it was designed (Recovery of *E. amylovora* Stressed Cells). Low concentrations of copper in non copper-complexing media involves an stress for *E. amylovora* causing its entry into the VBNC state [Ordax *et al.*, 2006]. However, the fact that bacteria can grow on solid KB with at high concentration of copper is due to the great copper complexing ability exhibited by this medium. Thus, at the copper sulphate concentration chosen to modify the KB medium, about 70% of the copper ions added were bound, mainly by the peptone. These

results are consistent with previous reports [Ramamoorthy and Kushner, 1975; Zevenhuizen *et al.*, 1979].

On the RESC plates, *E. amylovora* colonies appeared yellow and very mucoid, both *in vitro* and *in vivo* conditions. In fact, a close relationship between copper ions and yellow colour [Zhang *et al.*, 2000], and EPS production [Bereswill *et al.*, 1998; Ordax *et al.*, submitted] has been reported. The *P. agglomerans* and *P. fluorescens* epiphytic strains assayed, as well as the native bacteria present in plant samples, also acquired a more intense coloration on the RESC plates, since the presence of copper induce the production of some pigments in many bacteria [Armstrong, 1994]. However, the light yellow colour induced by copper in *E. amylovora* was clearly different from that of other plant bacteria [Bereswill *et al.*, 1998]. Therefore, the addition of copper to KB medium provides a useful differential trait for *E. amylovora*, making easier the discrimination of its colonies is on RESC than on KB.

In vitro assays with mixed cultures of *E. amylovora* and *P. agglomerans* and/or *P. fluorescens*, at different ratios, showed the highest recovery of the pathogen on RESC plates when the pathogen was in the lowest proportion (1:100), above the levels of the epiphytic bacteria. The recovery efficiency of *E. amylovora* from naturally infected plant material was also significantly higher on RESC than on the other culture media usually employed for its isolation. The lack of positive isolation results from the asymptomatic samples analyzed was probably related with the absence of *E. amylovora* in them, since the pathogen was not detected with the serological and molecular techniques. Since the isolation of this

pathogen on plates can be difficult when other plant bacteria predominate in the vegetal sample [Bereswill *et al.*, 1998], it is important to highlight that on RESC medium the growth of epiphytic bacteria assayed did not mask the presence of *E. amylovora* either *in vivo* or *in vitro* conditions.

The comparison of the RESC medium with the other media usually employed for *E. amylovora* isolation from plant material reveals that the modification of KB offers several advantages over them for the isolation and presumptive identification of this pathogen, only by the addition of one component. For instance, levan-deficient strains of *E. amylovora* from fire blight symptomatic samples go unnoticed on SNA and CCT media [Bereswill *et al.*, 1997]. However, as sucrose is not a component of RESC, these strains, such as the mutants tested in this work, show on it the same morphology as levan producers strains, allowing their presumptive identification as *E. amylovora*. On the other hand, both on KB and CCT, *E. amylovora* colonies can be confused with those of pseudomonads, requiring the monitoring of the plates under UV light [King *et al.*, 1954; Ishimaru and Klos, 1984]. This is not the case on RESC medium due to the characteristic and differential yellow pigment of *E. amylovora* colonies. In addition, the typical colonial morphology of this pathogen is visible earlier on RESC than on the other media assayed, due to the increase of the EPS production by copper. Thus, the colonies of *E. amylovora* are easily observed and differentiated from those of epiphytic bacteria after 24-48h of incubation, while longer incubation times are recommended for the other media, such as 48-72 h for SNA [Lelliot, 1967], 72 h for CCT [Ishimaru and Klos, 1984], and 3-5 days for MM₂Cu [Bereswill *et al.*,

1998]. An additional advantage of RESC is its easy and rapid preparation together with its low cost, specially when compared to CCT and MM₂Cu.

The real problems for the isolation of bacterial pathogens arises when they are under stressful conditions, often prevailing in the natural environment, which can difficult or even prevent their growth on the solid media routinely used in the diagnostic laboratories. This is the case of stress by starvation [Biosca *et al.*, 2006] or by the presence of copper ions in mineral medium [Ordax *et al.*, 2006], that cause the entry of *E. amylovora* into the viable but non-culturable (VBNC) state. Both stressful factors are very common in the plant environment. Thus, when *E. amylovora* is in an epiphytic stage, it suffers the scarcity of nutrients in the leaves [Monier and Lindow, 2003; Dulla *et al.*, 2005], and even during the endophytic stage when the host plant is in dormancy [Vanneste and Eden-Green, 2000]. On the other hand, the copper compounds continue being widely used for controlling bacterial diseases, and the presence of copper complexes in the leaves is very frequent [Menkissoglu and Lindow, 1991a]. Likewise, epiphytic bacteria are often exposed to UV irradiation in plant leave surfaces [Monier and Lindow, 2003; Dulla *et al.*, 2005]. In the present work, the recovery of *E. amylovora* cells stressed by starvation, copper or UV irradiation conditions was evaluated on RESC medium, including the other media recommended for the isolation of this pathogen for comparative purposes. It was observed that the culturability of the stressed *E. amylovora* cells was significantly higher on RESC than on the other media assayed, regardless the kind of stress or the exposure time. Moreover, in the case of copper stress imposed in the

non-complexing copper mineral medium AB [Ordax *et al.*, 2006], we could observe that the entry time of *E. amylovora* into the VBNC state was significantly delayed on RESC medium. This is in accordance with previous reports on other bacteria showing that copper can favour the growth depending on the concentration of the other nutrients in the medium and their chelating power [Granger and Ward, 2003; Harrison and Berges, 2004; Yamasaki *et al.*, 2004]. The significant delay in the entry time into the VBNC state on RESC medium was the greatest regarding to CCT, probably due to the inhibitory components of this medium, which constitutes an additional stress for bacteria. In fact, it is widely known that the bacteria exposed to stress conditions can turn sensitive to some inhibitory agents employed in the selective media [Brewer *et al.*, 1977; Bissonnette *et al.*, 1975; Rocelle *et al.*, 1995; Liao and Shollenberger, 2004]. The CCT medium contains agents, such as crystal violet, that could inhibit the growth of stressed cells [Rocelle *et al.*, 1995; Scheusner *et al.*, 1971; Chou and Cheng, 2000]. In our study, CCT was the medium which always showed the lowest numbers of recovery of *E. amylovora* cells after suffering different stress conditions. This means that, although the stressed *E. amylovora* cells were viable or even culturable on other media, the lack of growth on CCT plates could result in false negatives. This fact could involve a hazard in the copper treated fields, since the copper-induced *E. amylovora* VBNC cells that are not detected in culture plates can resuscitate and cause infection [Ordax *et al.*, 2006]. However, the culturability of the stressed *E. amylovora* cells is extended on the RESC medium, providing a reliable diagnostic during more time under stress conditions. Therefore, in spite of that CCT medium is one of the most commonly media used for the

isolation of *E. amylovora* basing on its good level of selectivity [Paulin, 2000], it seems that is not suitable as the only choice for the isolation from plant samples from hosts in dormancy and/or that treated with copper compounds, or exposed to UV irradiations or other stressful conditions.

In view of the whole results from this work, we propose the inclusion of the RESC medium in the plant samples routinely processing for the isolation of *E. amylovora*. The differentiation of the pathogen colonies on RESC medium results easier, faster and more reliable than in other culture media frequently used up to now. The presence of copper in this medium provides not only the possibility of a clear differentiation of *E. amylovora* from other plant epiphytic bacteria, but also favours the isolation of the pathogen under stressful conditions present in the natural environment. The fact that the culturability of stressed *E. amylovora* cells is prolonged on RESC medium increases the possibilities of a successful isolation from plant samples under different environmental conditions. Therefore, the RESC medium constitutes a useful tool for improving the isolation of this pathogen under problematic conditions common in the nature, optimizing its detection and contributing to avoid a further spread of the fire blight disease.

4.6. Acknowledgements

This work was supported through projects AGL2004-07799-C03-02 and AGL2005-06982 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) of Spain and GV-05/214 from Generalitat Valenciana. M. Ordax wants to thank the MEC for being awarded with a predoctoral fellowship. Dr. E. Marco-Noales was initially supported by the MEC (Programa INIA/CC.AA), and now by the Agroalimed foundation from Generalitat Valenciana. The authors wish to specially thank J.M Quesada and M. T. Gorris (Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, IVIA) for their PCR and ELISA analysis, respectively, and E. Carbonell and J. Pérez (Departamento de Biometría, IVIA) for the statistical analysis. We also thank Dr. K. Geider (Max-Planck-Institut für Zellbiologie, BBA Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim, Germany) and Dr. E. Montesinos (Universidad de Gerona, Spain) for the bacterial strains provided, and S. Rubio (Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico, CIDA, Logroño, La Rioja) and M. Marín (Laboratorio Regional Finca "La Grajera", Logroño, La Rioja) for permitting us the sampling from orchards with fire blight symptoms.

5. Role of amylovoran and levan on the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress and starvation

**Mónica Ordax, Ester Marco-Noales,
María M. López, and
Elena G. Biosca.**

Applied and Environmental Microbiology (to be submitted)

5.1. Abstract

Copper induces the “viable-but-nonculturable” (VBNC) state in *Erwinia amylovora*, and increases the production of the exopolysaccharide (EPS) amylovoran. Nutrient deprivation also causes its entry into VBNC state. Consequently, our aim was to determine the role of amylovoran and other EPS, levan, on the survival of this pathogen under copper stress and starvation. Then, total, viable and culturable cell counts of amylovoran (AMY-) and levan (LEV-) deficient mutants, and wild type (wt) strains of *E. amylovora* were monitored under starvation in mineral medium with or without copper. With copper, all strains became nonculturable, but mutants entered before the wt strains. Without copper, induction of VBNC state in mutants was significantly delayed, whereas culturability in wt strains was reduced, although only partially, probably because starvation. The extracts of both EPSs were able to complex Cu^{2+} ions and were used as carbon source by starved *E. amylovora* cells. Therefore, the EPSs of *E. amylovora* play an important role on its survival under copper stress and starvation, extending its culturability, complexing copper and being used as carbon source. These new functions of amylovoran and levan give new insights into the survival strategies of *E. amylovora* in the natural environment.

5.2. INTRODUCTION

Copper compounds are widely used to control plant diseases, especially in the European Union, where antibiotics are forbidden [Anonymous, 1999b]. However, many factors greatly affect the copper availability for bacteria in plant organs, such as the significant complexing ability of copper ions by different compounds in the leaves [Menkissoglu and Lindow 1991a, 1991b], the species and cultivar or the physiological state of the host plant, as well as weather conditions, inoculum levels, and time and application methods [Psallidas and Tsiantos, 2000]. Besides, several phytopathogenic bacteria have developed different strategies to protect themselves from copper in some extent [Kidambi *et al.*, 1995; Kazy *et al.*, 1999; Grey and Steck, 2001; Teitzel and Parsek, 2003]. The former can contribute to the existence of persistent infections often observed in copper treated fields. This is the case of fire blight, a destructive and widespread disease caused by the bacterium *E. amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, which is still difficult to control [Norelli *et al.*, 2003]. *E. amylovora* can enter into the viable-but-nonculturable (VBNC) state by low copper concentrations [Ordax *et al.*, 2006]. Starvation conditions can also induce a loss of culturability in a fraction of the pathogen population [Biosca *et al.*, 2006]. In the VBNC state, the cells are unable to grow on non selective solid media but remain viable, and this is considered a survival strategy for many bacteria under adverse environmental conditions [Oliver, 1993]. In fact, copper-induced VBNC *E.*

amylovora cells can revert from this state, regaining their culturability and also their pathogenicity [Ordax *et al.*, 2006].

Copper can also increase the amylovoran production (Bereswill *et al.* 1998), the major capsular exopolysaccharide (EPS) of *E. amylovora* [Nimtz *et al.*, 1996]. It is a heteropolymer of glucuronic acid and galactose [Nimtz *et al.*, 1996] and its synthesis is encoded by the *ams* (amylovoran synthesis) operon, with 12 genes (*amsA* to *amsL*) organized in a large gene cluster [Bereswill and Geider, 1997]. But *E. amylovora* also produces other EPSs: levan and glucan. Levan is a homopolymer of fructose present in other bacteria and it is synthesized extracellularly from sucrose by the enzyme levansucrase. The similarity rate among levansucrases of Gram-negative bacteria is very high [Hettwer *et al.*, 1995]. In *E. amylovora*, this enzyme, encoded by the gene *lsc* [Gross *et al.*, 1992], is expressed independently from sucrose in the cell environment [Geier and Geider, 1993]. The levansucrase may also conduct the hydrolysis of levan to fructose [Hettwer *et al.*, 1995]. Regarding to glucan, it is a polymer of glucose poorly characterized in this bacterium. The production of EPSs is an important factor for the pathogenicity of *E. amylovora*, because it has been shown that amylovoran-deficient strains are non-pathogenic [Bernhard *et al.*, 1993] while levan-deficient strains are only affected in their virulence [Geier and Geider, 1993].

On the other hand, it is also known that bacterial EPSs have a protective role under different unfavourable conditions [Weiner, 1997; Pyrog, 2001]. In this sense, it has been demonstrated that they can complex metals to neutralize their toxic effects [Geddie and Sutherland, 1993] or be used as a carbon supply under nutrient

limitation conditions [Weiner, 1997; Pyrog, 2001]. Other function of EPSs can be the protection of bacterial cells from desiccation [Ophir and Gutnick, 1994] and changes in salinity [Denny, 1999], as it has been demonstrated in *E. amylovora* for amylovoran [Geider, 2000; Jock *et al.*, 2005]. However, little is known about other protective functions of such EPS or levan. To evaluate whether *E. amylovora* EPSs protect this pathogen under copper stress and starvation conditions, the survival of different EPS-deficient mutants and their EPS-levels in mineral medium with or without this metal were studied, using their wild type strains as control. At the same time, the ability of amylovoran and/or levan extracts to complex copper ions, and their possible use as carbon supply by *E. amylovora* starved cells were also examined.

5.3. MATERIAL AND METHODS

5.3.1. Bacterial strains and inoculation conditions

The strains studied, wild type (wt) and EPS-deficient mutants together with their EPS characteristics, are listed in Table 1.

Prior to survival experiments, the deficiency in amylovoran or levan production in the EPS mutants with regards to their wt strains was verified by EPS measurements as described below. In addition, several phenotypic and genotypic characteristics of these mutants were compared to those of their parent strains. Growth rates were evaluated in three types of liquid culture media: (i) minimal medium M9 [Clowes and Hayes, 1968] supplemented with 0.2% glucose and 0.1% nicotinic acid, (ii) nonselective rich media such as

medium B of King [King *et al.*, 1954] and Sucrose Nutrient Agar (SNA) [Lelliot, 1967], and (iii) semiselective medium CCT [Ishimaru and Klos, 1984]. This growth experiment was performed in microplates, using the Bioscreen C system (Labsystems Oy, Finland) at 26°C during 4 days.

TABLE 1. *E. amylovora* strains assayed.

Strains	EPS-Genotype	EPS-Phenotype	Reference
CFBP1430†	wild type (wt) 1	wt1	-
Ea 1/79	wt2	wt2	Falkenstein <i>et al.</i> , 1988
Ea 1/79Sm	wt3‡, Sm ^r §	wt3	Bellemann <i>et al.</i> , 1994
Ea 1/79Sm-del100	deletion from <i>amsA</i> to <i>amsF</i> , Cm ^r §	amylovoran-deficient mutant (AMY ⁻)	Bugert & Geider, 1995
Ea 1/79-18M	<i>R/sB</i> *:::pfdA8††, Km ^r §	levan-deficient mutant (LEV ⁻)	Du & Geider, 2002

* EPS, exopolysaccharide.† CFBP, Collection Française des Bactéries Phytopathogène.

‡ The strain Ea 1/79Sm is a spontaneous streptomycin (Sm) resistant mutant of Ea 1/79 strain.

§ Antibiotic resistance to Sm^r, chloramphenicol (Cm^r) and kanamycin (Km^r).

** Strong activator of levansucrase synthesis, close to *IsC* gene and directly involved in levan production [Du and Geider, 2002].

†† pfdA8, suicide plasmid, 1.7kb, fd ori, requires fd gene2, Km^r [Geider *et al.*, 1985].

We also examined the acid production from carbohydrates in the galleries API-50CH (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and the use of different carbon sources by BIOLOG-Microlog System, version 4.0 (Biolog, Inc.), following the manufacturer's instructions. Furthermore, the avirulence or the decrease in virulence of AMY⁻ and LEV⁻ mutants, respectively, was verified by inoculation in

immature pear fruits and pear shoots, as described in Appendix VI of the standard PM7/20 for the diagnostic of *E. amylovora* [EPPO, 2004]. Finally, a genotypic analysis was performed by PCR-ribotyping [McManus and Jones, 1995].

Once the characteristics of EPS mutants were checked, containers with 100 ml of sterile liquid mineral medium AB [Alexander *et al.*, 1999] which does not complex copper [Ordax *et al.*, 2006], were supplemented with 0.005 mmol l⁻¹ Cu²⁺, according to previous work [Ordax *et al.*, 2006]. Medium without this metal was used as control. Moreover, since AB medium lacks a carbon source, the effect of starvation conditions was also evaluated. All containers were inoculated by duplicate with each *E. amylovora* strain at 10⁸ CFU ml⁻¹ and kept at 26°C for 6 months. The experiments were repeated in two independent assays.

5.3.2. Bacterial cell counts

Aliquots of 1 ml were taken regularly from all the containers at various times after inoculation (time zero) and bacterial cell counts were determined. Culturable *E. amylovora* cells of wt strains were counted on nutrient broth Standard I (NBS1) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with 1.5 % agar (NBS1A). In the case of EPS-deficient mutants, NBS1A was also supplemented with the respective antibiotics used as resistance markers: chloramphenicol (Cm) and kanamycin (Km) at 20 µg ml⁻¹ for AMY⁻ and LEV⁻ mutants, respectively (Table 1). Total and viable cell counts were determined in a Nikon ECLIPSE E800 epifluorescence microscope using the

bacterial viability kit BacLight LIVE/DEAD (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg., USA), according to Ordax *et al.*, [2006].

5.3.3. Direct and indirect EPS measurements

Along the experimental period, additional aliquots of 1 ml were also taken periodically to determine directly the amylovoran levels by the CPC-turbidity assay [Bugert and Geider, 1995], and indirectly the levan levels by the levansucrase activity, according to Bereswill and Geider [1997].

5.3.4. Staining of EPS and bacterial morphology

Capsular EPS were monitored every 15 days according to Hiss capsule stain method [Murray *et al.*, 1994]. Briefly, bacterial smears from AB medium with or without copper were treated with crystal violet, heat-fixed, and rinsed with copper sulfate solution, and then visualized under visible light with a Nikon ECLIPSE E800 microscope.

The morphology of *E. amylovora* cells in presence and absence of copper was regularly examined by scanning electron microscopy (SEM), as described by Marco-Noales *et al.* [1999], with a Hitachi H-4100 scanning electron FE microscope.

Furthermore, bacterial cells were stained with SYTO 13 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg., USA) according to the manufacturer's instructions, and analyzed by flow cytometry (CMF) (Becton-Dickinson FACScalibur bench cytometer) for cellular size determination by the low-angle forward scatter (FSC).

5.3.5. Quantification of copper-complexing ability of EPSs

The ability to bind free copper ions by *E. amylovora* wt and EPS-mutant strains was quantified during the experimental period by the Microquant Copper Test (Merck, Darmstadt, Germany) [Ordax *et al.*, 2006] in AB medium with 0.005 mmol l⁻¹ Cu²⁺, using uninoculated media as control.

The ability of EPSs alone to complex copper ions was also analysed by the Microquant test. Thus, additional containers including a higher copper concentration (0.05 mmol l⁻¹ Cu²⁺) were performed with EPS extracts: 0.2% amylovoran (kindly provided by K. Geider) and/or levan (from *Pantoea agglomerans*, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany, and from *E. amylovora*, also supplied by K. Geider). These containers were not inoculated with bacterial cells.

5.3.6. Effect of EPS extracts under copper and starvation stress conditions

To evaluate the role of EPSs in the culturability of *E. amylovora* in the presence of copper, other containers were prepared. They had mineral medium supplemented with 0.005 mmol l⁻¹ Cu²⁺, together with amylovoran or levan (only commercial one due to availability reasons) extracts at 0.2% final concentration. The inoculum was 10⁸ CFU ml⁻¹ for each *E. amylovora* strain (wt or mutants). Additional containers without copper or EPSs extracts were used as controls for copper assays and, moreover, to study the starvation effect.

Culturable bacterial counts and levels of amylovoran or levansucrase activity were determined regularly along six months, as described above.

5.3.7. Statistical analysis

E. amylovora cell counts (after log-transformation) and values of EPSs measurements are presented as means of two determinations from two independent experiments (see Figures 1, 2, and 6 from Results section). Statistical significance of means differences was analysed by using a three-way factorial ANOVA (experiment, strain and copper treatment for each day in the Fig. 1 and 2; or strain, copper treatment and addition of EPS extracts for selected days in Fig. 6). In addition, the trends in the population dynamics among all *E. amylovora* strains assayed were analysed by covariance analysis to test the quality of slopes through the time. Then, the copper treatment, the presence (in wt strains) or the deficiency of EPSs (in mutants), and the day were considered for each strain. Null data from no culturable cells on NBS1 solid medium were excluded from the analysis.

5.4. RESULTS

All the assays performed to characterize the AMY⁻ and LEV⁻ deficient mutants confirmed the expected phenotypic and genotypic traits. Firstly, EPSs measurements showed their scarce production in the mutants, in such a way that AMY⁻ and LEV⁻ mutants produced about 95 % less of amylovoran and levan respectively, regarding to their wt

strains. Other phenotypic (growth rates in rich and minimal media, API-50CH, BIOLOG) and genotypic (PCR-ribotyping) tests showed similar results between EPS-mutants and their respective wt strains. Pathogenicity results were also as expected: avirulence in AMY⁻ mutant and a decrease in virulence for LEV⁻ one.

5.4.1. Influence of EPSs in the survival of *E. amylovora*

Fig. 1 shows the survival curves of one representative wt strain (wt2) (A, D) (wt1 and wt3 showed no significant differences, $p > 0.05$), and EPS-mutant strains (B, C, E, F) of *E. amylovora* during 6 months in copper-free AB mineral medium (A-C) and with copper (D-F). Total and viable cell numbers remained at high levels (10^8 and 10^8 - 10^7 cells ml⁻¹, respectively) in all the containers, regardless the strain assayed or the presence of Cu²⁺ ions (Fig. 1). However, these two factors did influence in the culturable cell counts, which showed significant declines ($p < 0.05$) when compared to microscopic counts from three weeks for wt strains and AMY⁻ mutant and from the first week for LEV⁻ mutant.

In copper-free medium, the number of culturable cells of wt strain (Fig. 1A) and AMY⁻ mutant (Fig. 1B) decreased from 10^8 to around 10^4 CFU ml⁻¹ within the first seven weeks, while LEV⁻ mutant (Fig. 1C) became nonculturable in only three weeks. Afterwards, the culturability of AMY⁻ mutant continued decreasing down to below 1 CFU ml⁻¹, entering into the VBNC state at six months (Fig. 1B), while wt strain (Fig. 1A) stabilized at 10^4 CFU ml⁻¹ until the end of the experiment.

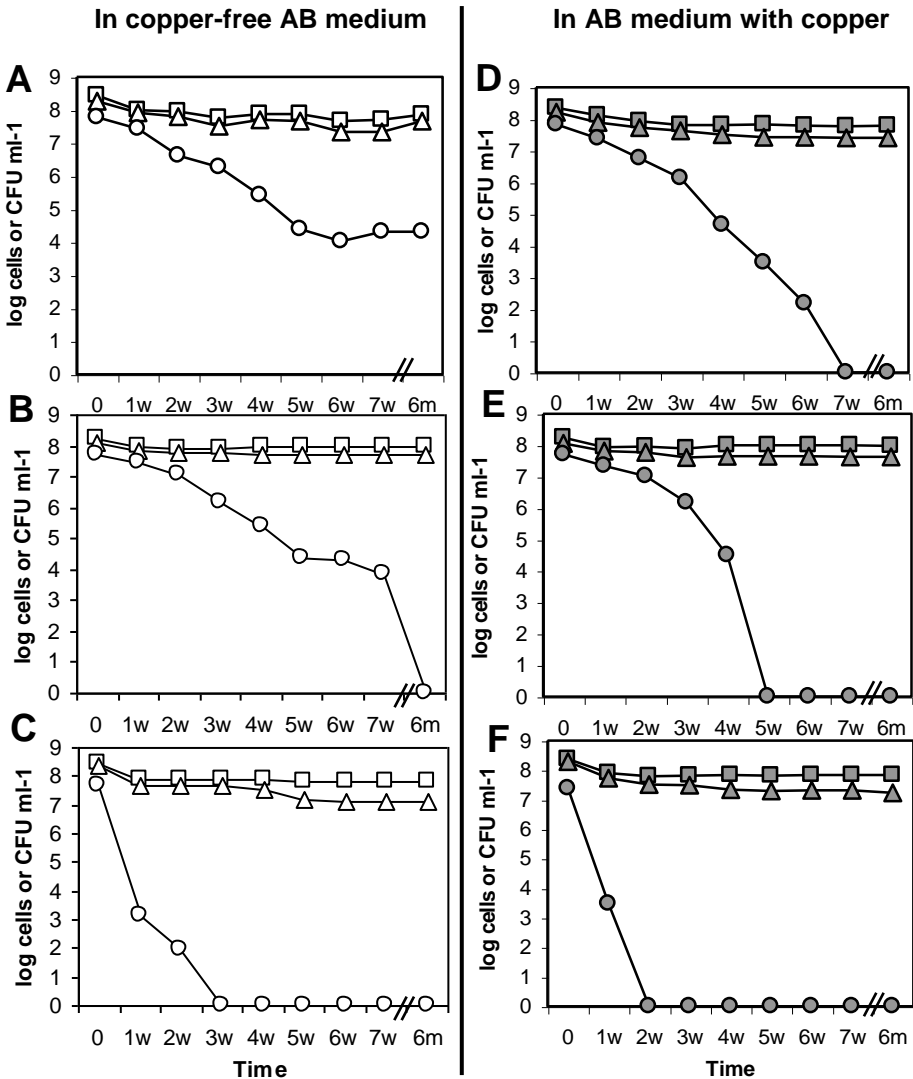


FIG. 1. Survival curves of wild type strain 2 (wt2) Ea1/79 (A, D) and EPS-deficient mutants “AMY-” (B-E) and “LEV-” (C-F) of *E. amylovora* over 6 months in AB liquid mineral medium without copper (white symbols) (A-C) or supplemented with 0.005 mmol l⁻¹ Cu²⁺ (grey symbols) (D-F). Total, viable and culturable cell counts are represented by squares, triangles and circles, respectively. Total and viable cell counts were determined using the LIVE/DEAD kit (Molecular Probes) and culturable counts by plating on NBS1 solid medium, supplemented with antibiotic markers for EPS-mutants. In X axis, the time points are represented in weeks (w) or months (m). The minimum standard deviation (SD) was 0.001 and the maximum 0.716.

In AB with copper (Fig. 1D-F), the culturable cell numbers for all strains dropped below the detection limit within seven weeks, entering faster into the VBNC state the EPS-mutants than their respective wt strains. The AMY⁻ mutant (Fig. 1E) took five weeks, while the LEV⁻ one (Fig. 1F) become nonculturable only in two weeks. However, the entry of wt strains in nonculturable state was delayed until seven weeks (Fig. 1D).

Regarding EPS levels, the amylovoran ones (Fig. 2A, C) increased during the first two weeks of the survival period from 1 to 2.5 and 2.8 mg ml⁻¹ (in the absence and the presence of copper, respectively) in wt strains (only wt2 is represented), but not in the EPS-mutants. Afterwards, they decreased below the initial levels, but faster when the metal was no present. By contrast, the levansucrase activity (indirect measurement of levan levels) (Fig. 2B, D) was low during the first three weeks, and then it started to increase only in wt strains, coinciding with the decrease of amylovoran (Fig. 2A, C). This rise of levansucrase activity was also observed both with and without copper (Fig. 2B, D), being slightly higher in the presence of the metal (Fig. 2D). After seven weeks, this activity decreased but it remained above the initial values up to the end of the experiment (Fig. 2B, D). Significant differences ($p < 0.05$) were found between wt strains and EPS-mutants for the amylovoran and levansucrase activity levels.

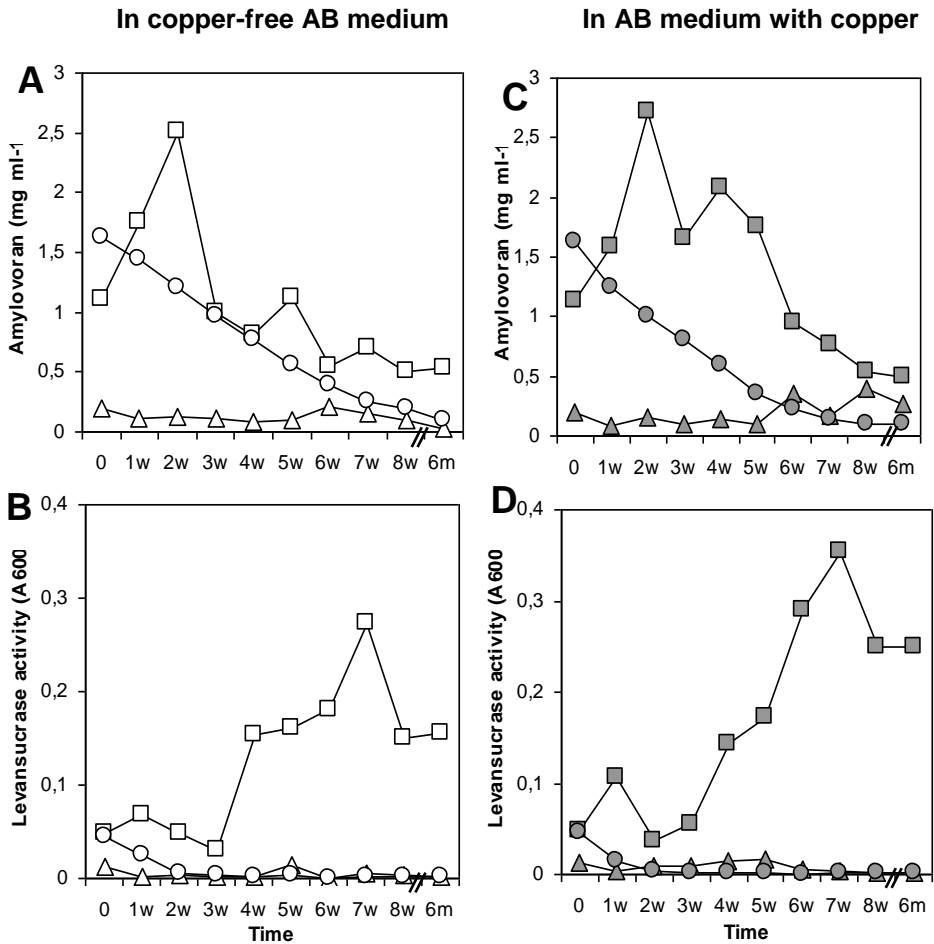


FIG. 2. Amylovoran (A and C) and levansucrase activity (B and D) levels of wild type strain 2 (wt2) (squares) and EPS-deficient mutants (AMY⁻ and LEV⁻, triangles and circles, respectively) of *E. amylovora* over 6 months in AB liquid mineral medium without copper (white symbols) (A-B) or with 0.005 mmol l⁻¹ Cu²⁺ (grey symbols) (C-D). In X axis, the time points are represented in weeks (w) or months (m). The minimum SD was 0.001 and the maximum 0.033.

5.4.2. Morphological changes in *E. amylovora* cells under stress conditions

Light microscopy capsule staining by the Hiss method was not suitable for the visualization of capsular EPSs of *E. amylovora* cells from mineral medium without copper. However, when the stained cells came from medium with this metal, they showed white halos around cells, probably corresponding to the EPS plus copper ions.

Changes in the morphology of *E. amylovora* cells were more precisely noticed by SEM depending on the presence or the absence of copper along 6 months (Fig. 3). Since no evident differences were observed among the wt strains, only wt2 strain is shown (Fig. 3A-C), together with AMY⁻ (Fig. 3D-F), and LEV⁻ (Fig. 3G-I) mutants. The morphology of wt and EPS-mutant *E. amylovora* strains at the time 0 was similar irrespective of the presence of copper (data not shown). Then, only photographs in copper-free medium are shown in time 0 (Fig. 3A, D, G). However, along the survival period under copper conditions, all assayed strains showed a progressive increase in the thickness of an external layer (3C, F, I), not observed without the metal (Fig. 3B, E, H). This was confirmed by CMF with a progressive increase of the cell diameter of *E. amylovora* cells in the presence of copper. In addition, a slight reduction in the cellular length was noticed by SEM in both starvation and copper stress conditions (Fig. 3).

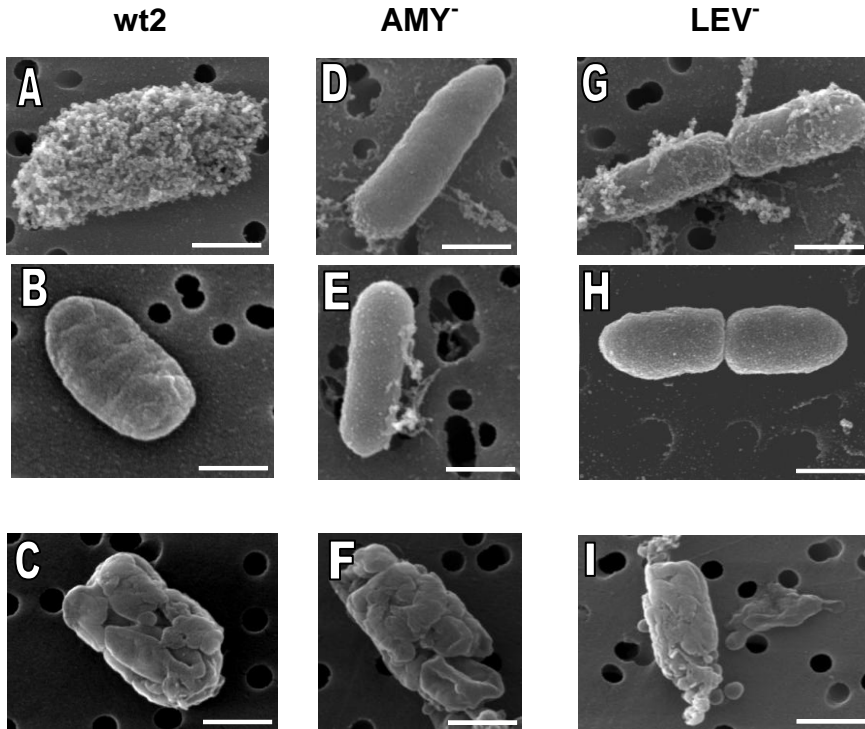


FIG. 3. Morphology of *E. amylovora* cells observed by scanning electron microscopy in AB liquid mineral medium without copper at time points 0 (A,D,G) and 6 months (m) (B,E,H); and with $0.005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ at 6m (C, F, I). A-C: wt strain 2 (wt2); D-F: AMY⁻ mutant; G-I: LEV⁻ mutant. In all cases the scale is 500 nm.

5.4.3. Copper-complexing ability of *E. amylovora* cells and EPS extracts

The percentage of Cu^{2+} ions bound by *E. amylovora* cells (only wt2 strain and AMY⁻ and LEV⁻ mutants are represented) in AB medium with copper ($0.005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$) during 6 months, using uninoculated medium as control, is represented in Fig. 4. All strains showed an increasing ability to bound copper ions within the first 12 weeks, up to a maximum value from 35% for EPS-mutants to 55% for

wt strains (Fig. 4). Afterwards, a stabilization was observed at these levels until the end of the experimental period. Therefore, the wt strains complexed greater percentage of Cu^{2+} ions than EPS-mutants (Fig. 4). In the control medium, the metal was not complexed (Fig. 4).

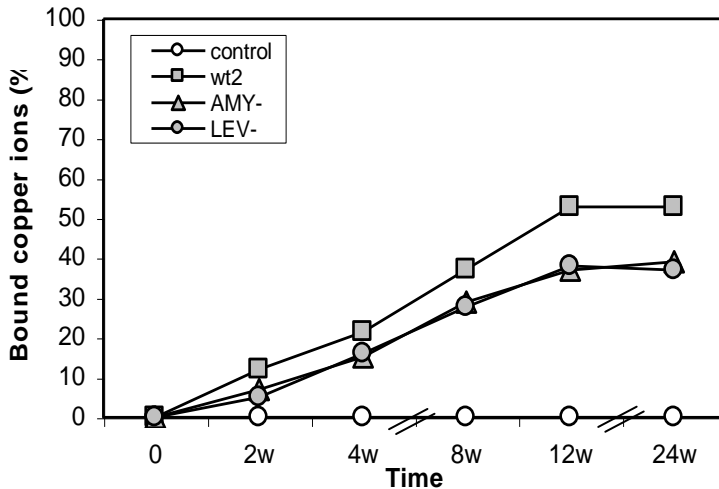


FIG. 4. Copper-complexing ability of *E. amylovora* cells by Microquant copper test (Merck) in AB liquid mineral medium with $0.005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ along 6 months. Strains: wild type strain 2 (wt2) and EPS-deficient mutants (AMY⁻, LEV⁻). Uninoculated AB medium was used as control. In X axis, the time points are represented in weeks (w).

To confirm that EPSs were involved in the copper-complexing ability observed by *E. amylovora* cells, additional experiments in uninoculated medium including also a higher copper concentrations ($0.05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$), and with 0.2% amylovoran and/or levan extracts were performed. At the lowest copper concentration assayed ($0.005 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$), all EPS extracts complexed 100% of copper ions added, regardless of the kind of EPS, and that the different EPS extracts were together or separately. At the highest one, $0.05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ (Fig. 5), all EPSs were also able

to bind copper ions, although in a different extent. Thus, amylovoran extract bound 70% Cu^{2+} ions, commercial levan from *P. agglomerans* 50%, and levan from *E. amylovora* around 85%. With the both kinds of EPS extracts together the percentage of complexed cations was higher (85% with amylovoran and commercial levan, and nearly 100% with amylovoran and levan from *E. amylovora*) than for each EPS separately (Fig. 5). Like in the previous experiment the control did not complex copper (Fig. 5).

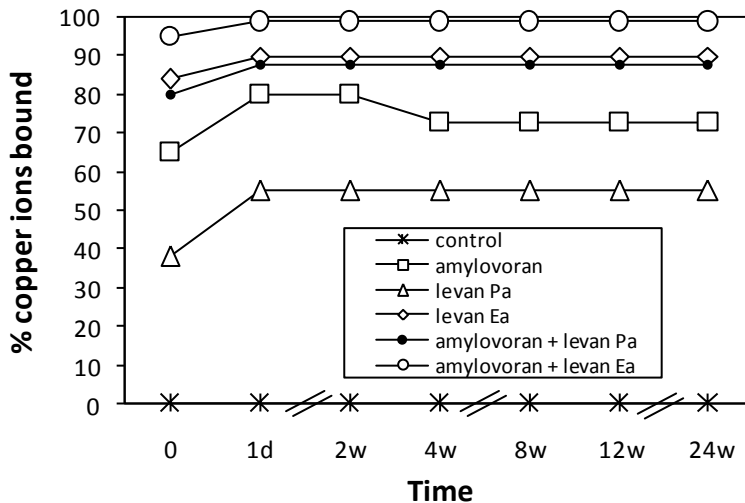


FIG. 5. Copper-complexing ability of EPS extracts by Microquant copper test (Merck) in AB liquid mineral medium with $0.05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ along 6 months. Amylovoran and/or levan extracts were added to AB medium at 0.2% final concentration. Levan extracts assayed came from *P. agglomerans* (Pa) and from *E. amylovora* (Ea). Uninoculated AB medium without EPS extracts was used as control. In X axis, the time points are represented in days (d) and weeks (w).

5.4.4. EPS extracts prolong the culturability of *E. amylovora* under stress conditions

Culturable cell numbers and direct and indirect EPS measurements in AB medium with or without copper, and with or without EPSs extracts over 6 months, are shown in Fig. 6. Only one representative wt strain (wt2) (Fig. 6A, B), and AMY⁻ (Fig. 6C, D) and LEV⁻ (Fig. 6E, F) mutants are showed. In control containers lacking EPSs extracts and with or without copper (Fig.6), the culturability of *E. amylovora* strains decreased and/or dropped below detection limit (< 1CFU ml⁻¹) as observed in Fig. 1. However, in those containers supplemented with EPS extract (either amylovoran or commercial levan), the decrease in culturability was slighter and delayed in time (Fig. 6). Thus, in those containers with the EPS extract, the culturable numbers remaining far above the detection limit regardless the presence of copper both in wt and EPS-mutants strains. In copper-free medium without EPSs, the number of wt culturable cells was lower after 6 months (10⁵ CFU ml⁻¹) than in the presence of EPSs extracts (10⁶ CFU ml⁻¹) (Fig. 6A, B). These differences in culturability depending on the presence or not of EPSs extracts were significantly ($p < 0.05$) more pronounced for both EPS-mutants after 6 months (between 10³ or 10⁴ CFU ml⁻¹ regarding to <1 CFU ml⁻¹) (Fig. 6C-F).

The former was even more noticeable in the presence of copper, since all assayed strains, including wt, entered into the VBNC state within 6 weeks in the absence of EPSs extracts (Fig. 6). However, when EPSs extracts were present, the culturability of wt strains was stabilized at levels of about 10⁶-10⁷ CFU ml⁻¹ (Fig. 6A, B) and for EPS-mutants around 10³- 10⁴ CFU ml⁻¹ (Fig. 6C-F), regardless

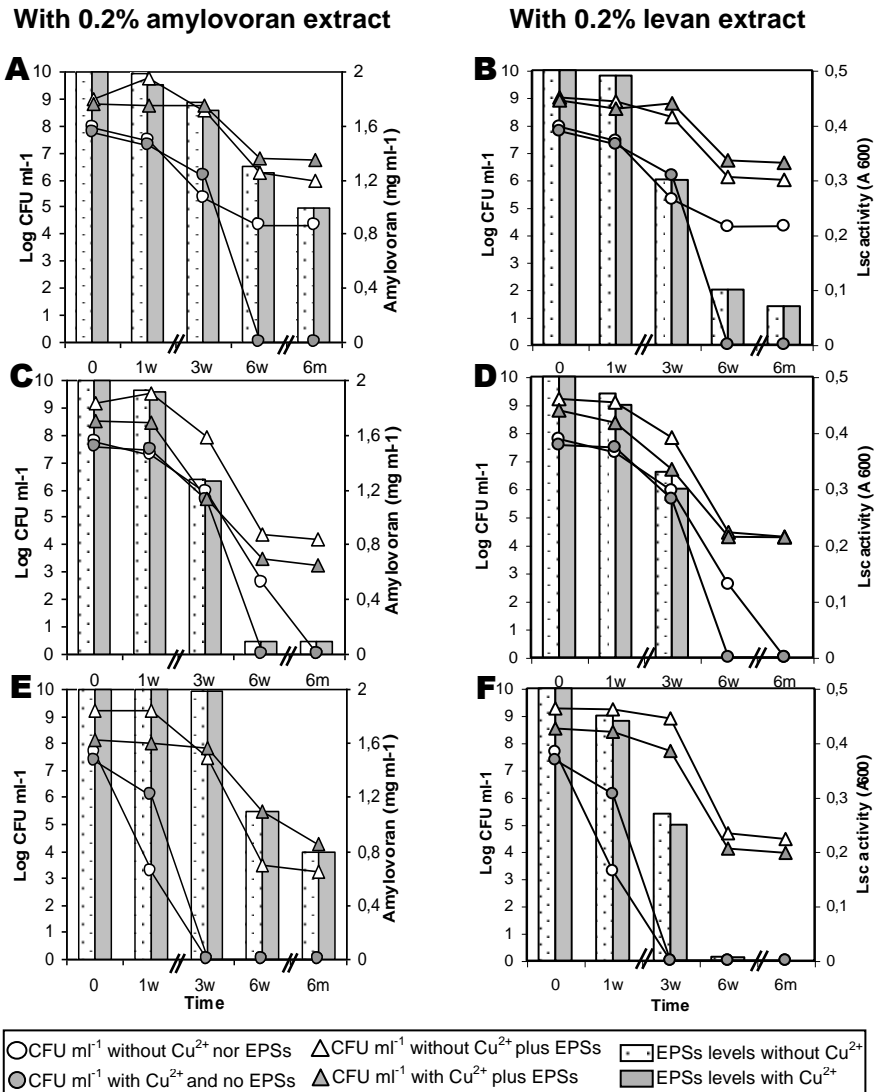


FIG. 6. Culturability of wild type strain 2 (wt2) (A-B) and AMY⁻ (C-D) and LEV⁻ (E-F) EPS-mutants of *E. amylovora* in copper-free AB mineral medium (white symbols) or in AB + 0.005 mmol l⁻¹ Cu²⁺ (grey symbols), without EPSs extracts (circles) or in the presence of them (triangles): 0.2% amylovoran (A, C, E) or levan from *P. agglomerans* (B, D, F). The culturability was monitored during 6 months by plating on NBS1 solid medium. The measurements of amylovoran (A, C, E) and levansucrase (Lsc) activity (B, D, F) are represented as bars including a secondary Y axis. In X axis, the time points are represented in weeks (w) or months (m). The minimum SD was 0.002 and the maximum 0.363.

which EPS extract was added. Then, with copper, the presence of either amylovoran or levan extract lead to a decline less pronounced in the number of *E. amylovora* culturable cells, also preventing their entry into the VBNC state.

In addition, a concomitant reduction in the amount of amylovoran added and levansucrase activity was observed (Fig. 6). Such levels of amylovoran and levansucrase activity were quite similar in copper-free medium as well as with 0.005 mmol l⁻¹ Cu²⁺ for each assayed strain. The amylovoran extract was reduced about a 40% by the wt strains in 6 weeks and 60% at 6 months (Fig. 6A), while it decreased around a 90% by AMY⁻ mutant in only 6 weeks (Fig. 6C). The LEV⁻ mutant was the slower consumer of amylovoran, since in 6 weeks it was only reduced 20%, although at 6 months its use reached a 60% for wt strains (Fig. 6E). On the other hand, the levansucrase activity in wt strains was reduced in a 80% in 6 weeks (Fig. 6B), while in the EPS-mutants (Fig. 6D, F) was a 95% for the same period, reaching 100% within in 3 months (data not shown).

This experiment was also performed with a higher copper concentration (0.05 mmol l⁻¹ Cu²⁺) like in the assays for quantification of copper-complexing ability, but under these conditions, all *E. amylovora* strains entered immediately into the VBNC state.

5.5. DISCUSSION

The role of amylovoran and levan in the survival of *E. amylovora* under copper stress has been studied using EPS-deficient mutants in

comparison with their parent strains. The results have shown a more prolonged culturability of wt strains under this stress than their respective EPS-mutants, with a significant delay in the entry time into the VBNC state. The LEV⁻ mutant was the first one to become non-culturable in the presence of copper, followed by AMY⁻ mutant, suggesting a relevant role of both EPSs against this stressful factor, not previously reported in the case of levan. The fact that we found significant differences between wt strains and EPS-mutants in the culturability period not only with copper, but also in copper-free AB medium, is probably due to carbon-deprivation in the mineral medium, indicating an additional effect of EPSs in the survival of *E. amylovora* under starvation conditions.

Some changes in the levels of amylovoran and levansucrase activity were also observed during the survival experiments, but only in wt strains. At first, there was an increase of amylovoran, followed by a decrease that was concomitant with a rise of levansucrase activity, which was maintained at levels higher than the initials until the end of the experiment. Since the biosynthesis of amylovoran is a complex and energy-intensive process [Geider, 2000], its down-regulation under adverse conditions could be advantageous for *E. amylovora* to avoid a high energetic cost [Du *et al.*, 2004]. In addition, the levansucrase from *E. amylovora* showed activity even under stress condition, which is in agreement with the high tolerance against physical and chemical stresses exhibited by other levansucrases from several plant bacteria [Hettwer *et al.*, 1995]. This ability of wt strains to adjust the amylovoran synthesis and levansucrase activity can be related with the spread and survival of *E. amylovora* in host plants [Bereswill and Geider, 1997]. On the

other hand, it was also observed that apparently there was no induction of amylovoran synthesis in *lev*⁻ mutant or levansucrase activity in *amy*⁻ mutant, probably due to an alteration in the cell metabolism of *E. amylovora* [Bereswill and Geider, 1997]. This inability of EPS-mutants to regulate their synthesis could lead to a lower persistence in the environment under unfavourable conditions, according to Bereswill and Geider [1997].

In preliminary assays, an available *AMY*-&*LEV*⁻ regulatory mutant from Ea1/79 strain (Ea1/79-MG) was initially included. However, its behavior was actually not as a double EPS-mutant, showing a more prolonged culturability than the other two EPS-mutants, so that it was excluded from the study. This regulatory mutant is mutated in an unstable activator of EPSs (*RcsA*) [Bernhard *et al.*, 1990; Stout *et al.*, 1991; Kelm *et al.*, 1997], being able to reach a residual production of EPSs up to 10% of the wt amount [Bernhard *et al.*, 1990].

The observations of *E. amylovora* cells by light microscopy after capsule staining revealed that only the cells from containers with copper presented clear halos. This could be due to the ephemeral nature of its EPSs, loosely held to the bacterial cell [Politis and Goodman, 1980]. Then, as these authors pointed out, it is necessary their previous stabilization for microscopic observations. The occurrence of halos only in containers with Cu^{2+} ions seems to suggest that they could be acting as a stabilizing agent of *E. amylovora* EPSs, improving their visualization. By SEM, it was evidenced an increase in the thickness of the cell external layer for all strains in the presence of copper, which apparently was related

with the results from CMF that showed an increase in the cell diameter only in those cells exposed to this metal. Therefore, all the morphological studies performed indicate that at least a part of Cu^{2+} ions was complexed in the surface of *E. amylovora* cells. However, results from EPS measurements indicated that the AMY⁻ mutant did not produce levan and that the LEV⁻ mutant neither produced amylovoran. Then, the increase in the thickness of the cell external layer observed by SEM in these two mutants in the presence of copper could be due to glucan, poorly characterized EPS of *E. amylovora* [Geider, 2000]. In fact, glucan can also bind copper cations in other microorganisms [Brady *et al.*, 2004]. Besides, in the SEM studies it was observed a slightly reduction in the length of *E. amylovora* cells under the starvation conditions of AB mineral medium. This phenomenon, very common in bacteria in oligotrophic environments, seems to increase the uptake of possible nutrients by rising of bacterial surface/volume ratio [Morita, 1997].

The ability of amylovoran to complex copper ions was previously suggested according to the characteristics of the *E. amylovora* colonies on the growth media MM_2Cu with CuSO_4 [Bereswill *et al.*, 1998]. In our work, the copper-complexing ability of *E. amylovora* cells, quantified along 6 months, was related to the presence of both amylovoran and levan on bacterial cells, together in wt strains or separately in the AMY⁻ and LEV⁻ mutants. To verify this ability of EPSs, uninoculated containers supplemented with EPSs extracts were also monitored, showing that not only amylovoran, but also levan (from *P. agglomerans* and from *E. amylovora*) can bind copper cations without the presence of bacterial cells. Consequently, the copper-complexing mechanism of EPSs is probably passive, through

a chemical interaction with its negatively charged groups [Beveridge, 1989; Weiner, 1997; Teitzel and Parsek, 2003]. In the case of amylovoran, it was pointed out that the uronic groups were the involved in the copper complexing [Geider, 1999]. On the contrary, the fact that levan can bind Cu^{2+} ions had not been considered up to date in *E. amylovora*. However, since levan is a neutral molecule, its charge appears when it is dissolved in liquid systems (personal communication of S. Gonta). Consequently, the hydroxyl groups arise, and copper and levan can be connected through these groups by hydrogen bonds (personal communication of S. Gonta). Therefore, the knowledge that levan acquires charge in liquids has to be considered for the possible implications. In the plant, *E. amylovora* may be frequently in contact with liquid systems, as epiphytic by the rain, the irrigation or the application of treatments, and as endophytic when it is in the vessels. In addition, a synergy between amylovoran and levan extracts was observed in our work, being higher the percentage of Cu^{2+} ions bound by both kinds of EPSs together than that by each one separately.

On the other hand, EPSs extracts also prolonged the culturability of all *E. amylovora* assayed strains. When they were added to mineral medium it was observed that their levels decreased at the same time that the culturability of *E. amylovora* cells was extended. Therefore, amylovoran as well as levan extracts, prevented the entry of *E. amylovora* into the VBNC state, suggesting their additional use as carbon source by the bacterium. Furthermore, the levels of amylovoran and levansucrase activity decreased in different way in the strains assayed. Thus, the reduction of amylovoran extract added was observed in all *E.*

amylovora strains, but only in the case of AMY⁻ mutant was nearly total. By contrast, the levansucrase activity decreased faster and in a higher percentage than amylovoran in all cases, probably due to the simplest chemical structure of levan that makes it more accessible as carbon supply for the bacterium. In fact, the levansucrase can degrade its own product, levan, in fructose monomers [Hettwer *et al.*, 1995], which could be used by *E. amylovora* cells [Donat *et al.*, 2007] under prolonged starvation conditions, extending their culturability. In our study, a commercial levan from *E. herbicola* (*P. agglomerans*) was also used. The levan degradation by levansucrases from other species has been previously reported in other bacteria, and it is due to the similarity among levan molecules from Gram negative bacteria in important characteristics such as molecular weight or amino acid sequence [Hettwer *et al.*, 1995].

It is well-known that EPSs may play a protective role for bacteria under different adverse conditions. In *E. amylovora*, it has been reported that amylovoran protects from desiccation [Jock *et al.*, 2005] and changing salt concentrations [Geider, 2000], and that its levels can be altered by pH, temperature and the type of carbon sources [Geider, 2000]. Regarding to levan, it was suggested its involvement in the protection of *E. amylovora* against plant defense mechanisms [Gross *et al.*, 1992; Geier and Geider, 1993], and that the levansucrase expression can be affected by the temperature [Bereswill *et al.*, 1997]. In this work, it has been demonstrated that the two major EPSs of *E. amylovora* favour its long-term survival, prolonging the culturability under copper and starvation stressful conditions. Such conditions have shown to influence the

amylovoran levels as well as the levansucrase activity. Furthermore, *E. amylovora* is able to use not only amylovoran, but also levan as complexing agents in the presence of free Cu^{2+} ions, and/or as carbon supply under deprivation conditions, traits unknown up to date in this pathogen. Overall, the new functions of amylovoran and levan showed in this study conditions may open up perspectives in the survival strategies of *E. amylovora* in copper-treated fields and in oligotrophic reservoirs outside its natural hosts.

5.6. Acknowledgements

This work was supported through projects AGL2004-07799-C03-02 and AGL2005-06982 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) and GV-05/214 from Generalitat Valenciana. M. Ordax wants to thank the MEC for being awarded with a predoctoral fellowship. Dr. E. Marco-Noales had a contract from the MEC of Spain (Programa INIA/CC.AA), and afterwards from the Foundation Agroalimed. We specially thank Dr. K. Geider (Max-Planck-Institut für Zellbiologie, BBA Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim, Germany) the EPS-mutants and EPS extracts generously provided, as well as, his deep and critical review to improve the manuscript. The authors thank the Servicio de Microscopía Electrónica (Universidad de Valencia) for expert technical assistance in scanning electron microscopy, Dr. J. M. Gasol (Centro Mediterráneo de Investigaciones Marinas y Ambientales, CMIMA, CSIC) for flow cytometry assays, and E. Carbonell and J. Pérez (Departamento de Biometría, IVIA) for statistical analysis. We also are grateful with R. Albiach-Martí (Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, IVIA) for the assistance as chemist, and especially S. Gonta (Laboratory of Microbial Storage Product Research, Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia) for the expert contribution in the chemical aspects of levan and its copper-complexing ability.

6. Discusión General y Conclusiones

6.1. DISCUSIÓN GENERAL

El fuego bacteriano, a pesar de ser una de las enfermedades de plantas más estudiadas, su control continúa siendo difícil en la actualidad, lo que podría estar relacionado con la escasa información sobre el ciclo biológico de *E. amylovora* fuera de hospedadores susceptibles. De hecho, se desconoce la posible supervivencia de este patógeno en condiciones adversas, que frecuentemente pueden presentarse en el medio natural, así como la importancia real de otros reservorios y/o vías de diseminación alternativas fuera de plantas hospedadoras [Jock y col., 2005]. Es importante, por lo tanto, avanzar en el conocimiento de la "vida oculta" de la bacteria, así como estudiar sus estrategias de supervivencia ante condiciones ambientales desfavorables, lo cual permitiría optimizar tanto la detección del patógeno como las medidas de prevención y control de la enfermedad.

En esta memoria se ha demostrado, en primer lugar, la inducción del estado VNC en *E. amylovora* en presencia de bajas concentraciones de iones cobre libres. Aunque este estado ya se había estudiado en otras bacterias fitopatógenas [Alexander y col., 1999; Ghezzi y Steck, 1999; Grey y Steck, 2001], no había sido descrito hasta el momento en *E. amylovora*. Los compuestos cúpricos, ampliamente usados para el control de bacteriosis de plantas, son considerados generalmente como bactericidas. Sin embargo, es relativamente frecuente que tratamientos que normalmente se consideran bactericidas resulten en la inducción

del estado VNC [Oliver, 2005]. Así, aunque es bien sabido que la incapacidad de una bacteria de formar colonias sobre un medio de cultivo sólido no implica necesariamente una pérdida de viabilidad [Roszak y Colwell, 1987; Oliver, 1993], la cultivabilidad en placa continúa siendo el único criterio vigente en los ensayos de evaluación de la actividad bactericida fijados por la UE [Normas europeas EN 1040 y EN 1276]. Sin embargo, este criterio no tiene en cuenta que hay factores diversos como la elevada tensión superficial y la alta concentración de oxígeno presentes en la superficie de un medio sólido [Kell y col., 1998], o la presencia de posibles inhibidores del crecimiento en el agar [Biosca y col., 2005], que suponen un estrés añadido para la bacteria y que pueden dificultar su crecimiento. Asimismo, tampoco se contempla la posible existencia de células VNC. De hecho, pese a que una bacteria no pueda crecer en un medio de cultivo sólido, una tasa metabólica baja es suficiente para que pueda mantenerse viable en condiciones adversas [Roszak y Colwell, 1987], respondiendo a métodos de determinación de la viabilidad independientes del cultivo.

En los ensayos realizados en la presente memoria, *E. amylovora* entró en el estado VNC en presencia de iones cobre después de 36 días (0.005 mM CuSO_4), o de sólo 24 horas cuando la concentración del metal fue más alta (0.01 mM CuSO_4). De esta forma, aunque la bacteria no creció en placas del medio no selectivo KB, más de un 80% de la población permaneció viable, manteniendo tanto la integridad de la membrana como su actividad respiratoria hasta, como mínimo, nueve meses. Las células VNC de *E. amylovora* inducidas por la exposición a iones

cobre podrían catalogarse como "tolerantes" a las concentraciones ensayadas de este metal, ya que aunque no son capaces de multiplicarse cuando están en su presencia, tampoco mueren [Keren y col., 2004]. Por otro lado, en los controles de medio mineral AB sin cobre también se observó una disminución de hasta tres órdenes logarítmicos en la cultivabilidad de *E. amylovora*. Por lo tanto, en ausencia del metal sólo una parte de la población bacteriana entró en el estado VNC, probablemente debido a la falta de nutrientes del medio mineral AB, el cual fue usado como control debido a que no acomplejaba los iones cobre.

La inducción del estado VNC en *E. amylovora* en presencia de cobre y/o por la limitación de nutrientes podría considerarse una estrategia de supervivencia de este patógeno ante estas condiciones de estrés, muy frecuentes en algunos de sus hábitats naturales como pueden ser las hojas [Menkissoglu y Lindow, 1991b; Dulla y col., 2005]. Sin embargo, para descartar que la pérdida de cultivabilidad observada en *E. amylovora* sea sólo una antesala de la muerte, debe ser posible la reversión o resucitación de la bacteria incluso tras largos períodos de no-cultivabilidad [Kell y col., 1998; McDougald y col., 1998; Bogosian y Bourneuf, 2001]. Mientras que la mayoría de estudios realizados con otras bacterias sólo consiguen la recuperación de la cultivabilidad tras períodos de pocos días, uno de los resultados más interesante de esta memoria ha sido demostrar que las células VNC de *E. amylovora* inducidas por cobre son capaces de revertir de este estado hasta después de 9 meses de su inducción, recuperando no sólo su cultivabilidad, sino también su poder patógeno. Como se ha propuesto para otras bacterias, esta resucitación tras períodos prolongados de pérdida de

cultivabilidad podría indicar un cierto papel del estado VNC en el ciclo de vida de *E. amylovora*. De hecho, la presencia de agentes quelantes de los iones cobre proporcionó una recuperación de la cultivabilidad. Dicha resucitación se prolongó con la utilización de componentes y nutrientes que el patógeno puede encontrarse en su hospedador, como ocurrió con el zumo de pera, que resultó ser uno de los métodos de resucitación con mayor éxito.

El siguiente paso consistió en abordar el estudio de la supervivencia de *E. amylovora* en un medio natural oligotrófico mediante la preparación de microcosmos de agua natural. Se observó que una fracción de la población bacteriana sobrevivió en estado cultivable durante al menos un año en los microcosmos de agua de riego a temperatura ambiente, mientras que otra entró en el estado VNC, al igual que ocurría en el medio mineral AB. Esta estrategia de supervivencia se observó tanto en agua natural estéril de distintos orígenes y características (destilada, de fuente, de lluvia o de acequia) donde el principal factor de estrés fue la escasez de nutrientes, como en agua de lluvia no estéril, donde además *E. amylovora* tuvo que competir con la microbiota natural presente. Además se demostró que *E. amylovora* mantuvo su poder patógeno independientemente del agua ensayada y de si estaba esterilizada o no. Todo ello hace pensar en el agua como un posible reservorio adicional, así como una vía de diseminación alternativa para *E. amylovora* en el campo, riesgo que hasta la fecha había sido subestimado. En consecuencia, la posible presencia de este patógeno en el agua no debe ser infravalorada, ya que el riego con agua contaminada es un riesgo real que

podría contribuir al avance de la enfermedad en el campo, sobre todo en zonas con un elevado nivel de inóculo.

Los protocolos de diagnóstico aconsejados en sanidad vegetal, y en concreto en el caso de los patógenos de cuarentena, recomiendan el aislamiento para confirmar un diagnóstico positivo [EPP0 2004]. Por lo tanto, la existencia de métodos que prolonguen la cultivabilidad de células estresadas retrasando su entrada en el estado VNC, permitiría disminuir el número de falsos aislamientos negativos en los análisis bacteriológicos de muestras naturales. En consecuencia, una vez demostrado que *E. amylovora* puede perder la cultivabilidad ante determinadas situaciones de estrés, pero manteniendo la viabilidad celular, nos planteamos como siguiente objetivo aumentar la eficiencia de recuperación de células estresadas de este patógeno en medio sólido. Pese a que los iones cobre por encima de ciertas concentraciones y en forma libre constituyen un factor de estrés para *E. amylovora*, también son un micronutriente esencial [Saxena y col., 2002]. Además el cobre es capaz de estimular el crecimiento de ciertas bacterias a bajas concentraciones en medios de cultivo ricos [Granger y Ward, 2003; Yamasaki y col., 2004], e incrementar la producción de EPSs en *E. amylovora* [Bereswill *et al.*, 1998]. Este carácter beneficioso del cobre se aprovechó con el fin de promover el crecimiento de *E. amylovora* en condiciones desfavorables. Para ello, se seleccionó experimentalmente la concentración de cobre más adecuada para ser añadida al medio de cultivo no selectivo KB, que potenciase la recuperación de *E. amylovora* en condiciones de estrés, pero que no favoreciese el crecimiento de las bacterias epífitas que más frecuentemente pueden competir con el

patógeno en sus plantas hospedadoras. El nuevo medio para la recuperación de células estresadas de *E. amylovora*, RESC (Recovery of *E. amylovora* Stressed Cells), mostró una eficiencia de recuperación significativamente mayor a la de otros medios de cultivo usados habitualmente para el aislamiento de *E. amylovora* (KB, SNA, CCT y MM₂Cu) tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, la cultivabilidad en RESC de células de este patógeno sometidas a distintos tipos de estrés frecuentes en condiciones naturales (escasez de nutrientes, iones cobre, luz UV) también fue significativamente más alta que en el resto de medios, retrasando incluso la entrada de la bacteria en el estado VNC en el caso del estrés por cobre. Por lo tanto, el medio RESC es un buen candidato para el aislamiento de este patógeno en muestras problemáticas donde las células de *E. amylovora* en estado cultivable pueden estar en números muy bajos y/o en otros estados fisiológicos que dificulten su aislamiento. Cabe destacar también que el medio semiselectivo CCT, uno de los más usados para el aislamiento de *E. amylovora*, parece no ser el más adecuado cuando la bacteria se encuentra en condiciones ambientales desfavorables. Así, en el medio CCT se observó la eficiencia de recuperación más baja independientemente del estrés ensayado, con una pérdida de cultivabilidad de *E. amylovora* muy temprana, por lo que no es muy aconsejable su uso como único medio de cultivo para el aislamiento de este patógeno.

En presencia de cobre también se observó un cambio en la morfología celular de *E. amylovora*, de forma que las células aparecían engrosadas, con una cubierta externa que no se observó en ausencia del metal. Estos resultados parecían confirmar

que el cobre puede unirse a la superficie de *E. amylovora* [Zhang y col., 2000]. Además, la presencia de cobre se ha relacionado con un incremento de la mucosidad de las colonias de *E. amylovora* en el medio MM₂Cu [Bereswill et al., 1998], característica que también observamos en el medio RESC. Por todo ello nos planteamos estudiar el papel de los EPSs de *E. amylovora* en su supervivencia e inducción del estado VNC en presencia de cobre. Así, al comparar la supervivencia de mutantes de *E. amylovora* deficientes en la síntesis de amilovorano (AMY⁻) y levano (LEV⁻) con sus cepas parentales en presencia de cobre y/o bajo condiciones de limitación de nutrientes, la cultivabilidad de los mutantes resultó notablemente más baja. En presencia de cobre, la entrada de los mutantes AMY⁻ y LEV⁻ en el estado VNC fue más rápida que la de las cepas parentales, en concreto cinco y dos semanas antes, respectivamente. Estos resultados indican que ambos EPSs retrasan la pérdida de cultivabilidad de *E. amylovora*, siendo más destacable el caso del levano. Además, se observó un incremento en los niveles de amilovorano durante las primeras dos semanas de estrés (ya fuera por la presencia de cobre y/o la escasez de nutrientes), y posteriormente un descenso que coincidió con un incremento en los niveles del enzima responsable de la síntesis del levano, la levanosacarasa. Por lo tanto, cabría la posibilidad de que las células VNC de *E. amylovora* pudieran estar regulando de algún modo la síntesis de ambos EPSs. El hecho de que las células VNC continúen produciendo EPSs en condiciones de estrés, al menos durante un tiempo, ha sido demostrado en otros modelos como cianobacterias [Fetton y Shilo, 1985] y cepas marinas de *Pseudomonas* sp. [Wrangstadh y col., 1988] y *Vibrio vulnificus* [Oliver, 1993], así como en *Acinetobacter calcoaceticus* [Rosenberg y col.,

1983]. De acuerdo con estos estudios, lo más probable es que un microorganismo, ante ciertas situaciones de estrés, continúe invirtiendo energía en sintetizar EPSs porque ello le confiera algún tipo de ventaja frente a dicho estrés. De hecho, se sabe que los EPSs bacterianos protegen frente a condiciones adversas como deshidratación, predación, fagocitosis, interacciones iónicas, efecto de antibióticos y otros compuestos considerados bactericidas, etc. [Weiner, 1997; Pyrog, 2001]. En el caso concreto de *E. amylovora*, su material capsular está considerado de gran importancia para el establecimiento y persistencia de este patógeno en su ambiente natural, tanto por su capacidad de protección frente a la respuesta defensiva de la planta, como para retener agua y proteger del estrés osmótico [Bugert and Geider, 1995]. En nuestro trabajo hemos demostrado que los EPSs de *E. amylovora* ejercen una gran influencia en la supervivencia de este patógeno frente a otras condiciones ambientales adversas. Así, tanto el amilovorano como el levano son capaces de acomplejar un alto porcentaje de los iones cobre libres en el medio, disminuyendo por lo tanto su toxicidad para *E. amylovora*. Además, ambos EPSs parecen ser utilizados por esta bacteria como fuente de carbono en condiciones de escasez de nutrientes. Estas nuevas funciones de los EPSs de *E. amylovora* aportan luz sobre las diversas estrategias que puede desarrollar el patógeno en la naturaleza para favorecer su supervivencia.

En conclusión, los resultados recogidos en esta memoria han permitido avanzar y profundizar en el conocimiento de la supervivencia de *E. amylovora* ante condiciones adversas, con las que la bacteria se puede encontrar frecuentemente en la

naturaleza. Así, la inducción del estado VNC en *E. amylovora* por cobre, y su capacidad de recuperación en condiciones favorables, podría explicar, al menos parcialmente, la reaparición de focos de fuego bacteriano en campos tratados con compuestos cúpricos. Se esclarecen, pues, algunos aspectos de la "vida oculta" de este importante patógeno que podrían contribuir a la optimización tanto de su detección como de las medidas de prevención y control de la enfermedad.

6.2. CONCLUSIONES GENERALES

Las principales conclusiones de esta memoria son las siguientes:

1. *E. amylovora* adopta el estado viable no cultivable (VNC) en un medio mineral en presencia de bajas concentraciones de iones cobre libres, siendo capaz de revertir de este estado en presencia de diversos agentes quelantes, y/o nutrientes, incluyendo sustancias del propio hospedador. Dicho estado, por lo tanto, representa una estrategia de supervivencia de este patógeno frente al cobre.
2. Las células VNC de *E. amylovora* inducidas por cobre pueden constituir un riesgo para la diseminación del fuego bacteriano, pues, aunque sólo fueran capaces de producir síntomas durante los primeros cinco días, su resucitación fue posible durante al menos nueve meses tras la entrada en este estado, recuperando siempre su patogenicidad.

3. *E. amylovora* es capaz de sobrevivir en estado cultivable en condiciones de oligotrofia, tanto en un medio mineral como en agua natural esterilizada o no, manteniendo además su poder patógeno. En estas condiciones de escasez de nutrientes sólo una parte de la población bacteriana entra en el estado VNC. Por lo tanto, el agua puede representar un reservorio y/o un vehículo alternativo de diseminación del patógeno.
4. El medio de cultivo RESC favorece la recuperación de *E. amylovora* bajo ciertas condiciones de estrés, retrasando la pérdida de cultivabilidad. Además, la adición de cobre a la concentración seleccionada estimula el crecimiento de este patógeno, al tiempo que disminuye el de la microbiota epífita, y le confiere, además, un carácter diferencial facilitando considerablemente la identificación visual y presuntiva de las colonias de *E. amylovora*.
5. La cultivabilidad de las células de *E. amylovora* bajo las condiciones de estrés ensayadas es significativamente menor en el medio semiselectivo CCT que en los medios RESC, KB, SNA, y MM₂Cu. Por lo tanto, nuestros resultados desaconsejan su uso como único medio de aislamiento de *E. amylovora*, especialmente en el caso de muestras en condiciones ambientales desfavorables, y en las que el inóculo del patógeno pueda ser bajo o encontrarse en un estado fisiológico alterado.

6. Tanto el amilovorano como el levano, principales EPSs de *E. amylovora*, retrasan la pérdida de cultivabilidad de este patógeno en presencia de cobre y/o bajo condiciones de oligotrofia, retrasando su entrada en el estado VNC.
7. *E. amylovora* parece ajustar la producción de EPSs ante condiciones de estrés, como la presencia de iones cobre y/o condiciones oligotróficas, aumentando inicialmente la producción de amilovorano, para luego disminuirla e incrementar la actividad del enzima levanosacarasa durante al menos 6 meses.
8. El papel de los EPSs en la supervivencia de *E. amylovora* bajo las condiciones de estrés ensayadas es al menos doble, de forma que por un lado, actúan como agentes quelantes de gran parte de los iones cobre libres presentes disminuyendo su toxicidad, y por otro, sirven como fuentes de carbono y energía cuando los nutrientes son escasos, ambas funciones desconocidas hasta el momento.
9. El conocimiento de estas nuevas funciones de los EPSs de *E. amylovora*, así como su aparente regulación en condiciones de estrés, abre nuevas perspectivas de estudio sobre las distintas estrategias que puede desarrollar *E. amylovora* para sobrevivir en la naturaleza.

7. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Acea, M.J., C.R. Moore, M. Alexander. 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil. Biol. Biochem.* **20**: 509-515.

Aldwinckle, H.S., S.V. Beer. 1978. Fire blight and its control. *Horticult. Rev.* **1**: 423-474.

Alexander, E., D. Pham, T.R. Steck. 1999. The viable but nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3754-3756.

Álvarez, B., M.M. López., E.G. Biosca. 2007. Influence of native microbiota on survival of *Ralstonia solanacearum* phylotype II in river water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* *In press.*

Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Of Phytopathol.* **30**: 603-635.

Angle, J.S., S.P. McGrath, A.M. Chaudri. 1992. Effects of media components on toxicity of Cd to rhizobia. *Water Air Soil Pollut.* **64**: 627-633.

Anónimo/Anonymous. 1993. R.D. 2071/1993, de 26 de noviembre, relativo a las medidas de protección contra la introducción y difusión en el territorio nacional y de la Comunidad Económica Europea de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales, así como para la exportación y tránsito hacia países terceros.

Anónimo/Anonymous. 1998. R.D. 1190/1998, de 12 de junio, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación o control de organismos nocivos de los vegetales aún no establecidos en el territorio nacional.

Anónimo/Anonymous. 1999a. R.D. 1201/1999, de 9 de julio, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas.

Anónimo/Anonymous. 1999b. Amounts of antimicrobial used, p. 44-45. *In* Opinion of the scientific steering committee on antimicrobial resistance. Unit B3 – Management of scientific committees II. Directorate general XXIV consumer policy and consumer health protection. European Commission.

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, Vol. **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 to harmful organism *Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. *et al.* Official Journal of the European Union, L321, 6 December 2003, p. 36.

Anónimo/Anonymous. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. *Erwinia amylovora*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **34**: 159-171.

Anónimo/Anonymous. 2005. R.D. 1512/2005, de 22 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 1201/1999 de 9 de julio, por el que se establece el programa nacional de erradicación y control del fuego bacteriano de las rosáceas.

Armon, R., C. Dosoretz, A. Yoirish, G. Shelef, I. Neeman. 1995. Survival of the phytopathogen *Erwinia carotovora* in sterile and non sterile soil, sand and their admixture. J. Appl. Bacteriol. **79**: 513-518.

Armstrong, G.A. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. J. Bacteriol. **176**: 4795-4802.

Balduque, R., M.A. Cambra, C. Lozano. 1996. El fuego bacteriano de las Rosáceas (*Erwinia amylovora*). Informaciones Técnicas, 1/1996. Dirección General de Tecnología Agraria, Departamento de Agricultura, Gobierno de Aragón.

Balduque, R., M.A. Cambra, C. Lozano. 1998. El fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*), Prevención y Lucha. Informaciones Técnicas, 1/1998. Dirección General de Tecnología Agraria, Departamento de Agricultura, Gobierno de Aragón.

Baldwin, C.H., R.N. Goodman. 1963. Prevalence of *Erwinia amylovora* in apple buds as detected by phage typing. Phytopathol. **53**: 1299-1303.

Baldwin, B.C., W.G. Rathmell. 1988. Evolution of concepts for chemical control of plant disease. Annu. Rev. Of Phytopathol. **26**: 265-283.

- Banin, E., T. Israely, A. Kushmaro, Y. Loga, E. Orr, E. Rosenber.** 2000. Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3031-3036.
- Bhaskara Reddy, M.V., J.L. Norelli, H.S. Aldwinckle.** 2000. Control of fire blight infection of apple blossoms. 1999. *Fungic. Nematicide Tests.* **55**: 22. American Phytopathological Society, St. Paul, M.N.
- Beattie, G.A., S.E. Lindow.** 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 145-172.
- Beer, S.V.** 1976. Fire blight: its nature and control. Information Bulletin 100, Cornell University.
- Bej, A.K., N. Vickery, F.E. Brasher, C. Jeffreys, A. Jones, D.D.A. DePaola, D.W. Cook.** 1997. Use of PCR to determine genomic diversity and distribution of siderophore-mediated iron acquisition genes in clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. *Abstr. Q177*, p. 485. *Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*
- Bellemann, P., S. Bereswill, S. Berger, K. Geider.** 1994. Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **16**: 290-296.
- Bennet, R.A., E. Billing.** 1978. Capsulation and virulence in *Erwinia amylovora*. *Ann. Appl. Biol.* **89**: 41-45.
- Bennet, R.A., E. Billing.** 1980. Origin of the polysaccharide component of ooze from plant infected with *Erwinia amylovora*. *J. Gen. Microbiol.* **116**: 341-349.
- Bereswill, S., P. Bugert, I. Bruchmüller, and K. Geider.** 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2636-2642.
- Bereswill, S., K. Geider.** 1997. Characterization of the *rscB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *J. Bacteriol.* **179**: 1354-1361.

- Bereswill, S., S. Jock, P. Aldridge, J.D. Janse, K. Geider.** 1997. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Phys. Mol. Plant Pathol.* **51**: 215-225.
- Bereswill, S., S. Jock, P. Bellemann, K. Geider.** 1998. Identification of *Erwinia amylovora* by growth in the presence of copper sulfate and by capsule staining with lectin. *Plant Dis.* **82**: 158-164.
- Bernhard, F., D.L. Coplin, K. Geider.** 1993. A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to *cps* genes in *Erwinia stewartii*. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 158-168.
- Bernhard, F., K. Poetter, K. Geider, D.L. Coplin.** 1990. The *rcsA* gene from *Erwinia amylovora*: identification, nucleotide sequence, and regulation of exopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Plant Microb. Interact.* **3**: 429-437.
- Beumer, R.R., J. de Vries, F.M. Rombouts.** 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Intern. J. Food Microbiol.* **15**: 153-163.
- Beveridge, T.J.** 1989. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 147-171.
- Billing, E.** 1992. Billing's revised system (BRS) for fireblight risk assessment. *EPPO Bull.* **22**: 1-102.
- Billing, E., L.A.E. Baker, J.E. Crosse, C.M.E. Garret.** 1961. Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* *J. Appl. Bacteriol.* **24**: 195-211.
- Binnerup, S.J., D.F. Jensen, H. Thordal-Christensen, J. Sorensen.** 1993. Detection of viable, but nonculturable *Pseudomonas fluorescens* DF57 in soil using a microcolony epifluorescence technique. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**: 97-105.
- Biosca, E.G., B. Álvarez, E. Marco-Noales, M. Ordax, M.M. López.** 2006a. Long-term survival of *Erwinia amylovora* and *Ralstonia solanacearum* in sterilized irrigation water. 2nd FEMS Congress of European Microbiologists. pp. 288.

- Biosca, E.G., P. Caruso, E. Bertolini, B. Álvarez, J.L. Palomo, M.T. Gorris, López, M.M.** 2005. Improved detection of *Ralstonia solanacearum* in culturable and VBNC state from water samples at low temperatures, p. 501-506. In Allen, C., Prior, P., and Hayward, A.C. (eds.), Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, Minnesota, USA.
- Biosca, E.G., E. Marco-Noales, M. Ordax, M.M. López.** 2006b. Long-term starvation-survival of *Erwinia amylovora* in sterile irrigation water. Acta Hort, **704**: 107-112.
- Bissonnette G.K., J.J. Jezeski, G.A. McFeters, D.G. Stuart.** 1975. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. Appl. Environ. Microbiol. **29**: 186-194.
- Bogdanove, A.J., J.F. Kim, S.V. Beer.** 2000. Disease-specific genes of *Erwinia amylovora*: keys to understanding pathogenesis and potential targets for disease control, p. 163-177. In J.L. Vanneste (ed.), Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Bogosian, G., E.V. Boumeuf.** 2001. A matter of bacterial life and death. EMBO reports. **2**: 770-774.
- Bogosian, G., L.E. Sammons, P.J.L. Morris, J.P. O'Neil, M.A. Heitkamp, D.B. Weber.** 1996. Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 4114-4120.
- Bonn, W.G.** 1999. Opening address. Acta Hort. **489**: 27-28.
- Boulos, L., M. Prévost, B. Barbeau, J. Coallier, R. Desjardins.** 1999. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J. Microbiol. Methods. **37**: 77-86.
- Brady, D., A. D. Stoll, L. Starke, J. R. Duncan.** 2004. Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. **44** : 297-302.
- Brauns, L.A., M.C. Hudson, J.D. Oliver.** 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 2651-2655.

Brenner, D.J. 1984. Family I. *Enterobacteriaceae*, p.408-420. In N.R.A. Krieg and J.G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, M.D.

Brewer D.G., S.E. Martin, Z.J. Ordal. 1977. Beneficial effects of catalase or pyruvate in a most-probable-number technique for the detection of *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. **34**: 797-800.

Bugert, P., K. Geider. 1995. Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. Mol. Microbiol. **15**: 917-933.

Bugert, P., K. Geider. 1997. Characterisation of the *amsl* gene product as a low molecular weight acid phosphatase controlling exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. FEBS Lett. **400**: 252-256.

Burrill, T.J. 1883. New species of Micrococcus. Am. Naturalist. **17**: 319.

Byrd, J.J., H-S. Xu, R.R. Colwell. 1991. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 875-878.

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.

Cabrefiga, J., A. Bonaterra, E. Montesinos. 2002. Prospección, selección, y ensayos de control biológico del fuego bacteriano mediante bacterias antagonistas. Phytoma España. **144**: 95-98.

Cambra, M., A. Olmos, M.T. Gorris, N. Durán, M.P. Román, E. Camarasa, M.A. Dasí. 1996. Sensitive detection of plant pathogen by using immobilized targets in tissue imprinted membranes. Abstracts of 4th International Symposium EFPP, Bonn, Germany.

Cambra, M.A., A. Palacio, M.L. González, J. Fortanete. 2004. Fire blight in Aragon (Spain): efficacy of containment measures, p.18. In Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy.

Cambra, M.A., A. Palacio, C. Lozano, J. Crespo. 2002. El fuego bacteriano de las Rosáceas. *Erwinia amylovora*. Informaciones Técnicas, 1/2002. Dirección General de Tecnología Agraria, Departamento de Agricultura, Gobierno de Aragón.

Cappaert, M.R., M.L. Powelson, G.D. Franc, M.D. Harrison. 1988. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot erwinias for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathol.* **78**: 1668-1672.

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

Chou C.C., S.J. Cheng. 2000. Recovery of low-temperature stressed *Escherichia coli* O157:H7 and its susceptibility to crystal violet, bile salt, sodium chloride and ethanol. *Int. J. Food Microbiol.* **61**: 127-136.

Clowes, R.C., W. Hayes. 1968. Experiments in microbial genetics, pp.187. John Wiley & Sons Inc., New York.

Colwell, R.R., P.R. Brayton, D. J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq, L.M. Palmer. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technol.* **3**: 817-820.

Colwell R.R., J. Grimes. 2000. Semantics and strategies, p. 1-6. *In* R.R. Colwell and D.J. Grimes (eds.), *Nonculturable microorganisms in the environment*. ASM Press, Washington, D.C.

Créach, V., A.C. Baudoux, G. Bertru, B.L. Rouzic. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *J. Microbiol. Methods.* **52**: 19-28.

Day, A.P., J.D. Oliver. 2004. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *J. Microbiol.* **42**: 69-73.

Denny, T.P. 1999. Autoregulator-dependent control of extracellular polysaccharide production in phytopathogenic bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**: 417-430.

Diaper, J.P., C. Edwards. 1994. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 221-228.

- Donat, V.** 2004. Caracterización fenotípica y genotípica de aislados españoles de *Erwinia amylovora*. Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.
- Donat, V., E.G. Biosca, J. Peñalver, M.M. López.** 2007. Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infections sources. J. Appl. Microbiol. (*in press*).
- Donat, V., E.G. Biosca, A. Rico, J. Peñalver, M. Borruel, D. Berra, T. Basterretxea, J. Murillo, M.M. López.** 2005. *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics. Ann. Appl. Biol. **146**: 105-114.
- Du, Z., K. Geider.** 2002. Characterization of an activator gene upstream of *IsrA*, involved in levan synthesis of *Erwinia amylovora*. Physiol. Mol. Plant Pathol. **60**: 9-17.
- Du, Z., V. Jakovljevic, H. Salm, K. Geider.** 2004. Creation and genetic restoration of *Erwinia amylovora* strains with low levan synthesis. Physiol. Mol. Plant Pathol. **65**: 115-122.
- Dufour, P., M. Colon.** 1992. The tetrazolium reduction method for assessing the viability of individual bacterial cells in aquatic environments: improvements, performance and application. Hydrobiol. **232**: 211-218.
- Dulla G., M. Marco, B. Quiñones, S. Lindow.** 2005. A closer look at *Pseudomonas syringae* as a leaf colonist. ASM News **71**:469-475.
- Düring, K.** 1996. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. Mol. Breed. **2**: 297-305.
- Dye, D.W.** 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 1. The *amylovora* group. New Zealand J. of Sci. **11**: 590-607.
- Dye, D.W.** 1969a. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 2. The *carotovora* group. New Zealand J. of Sci. **12**: 81-97.
- Dye, D.W.** 1969b. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 3. The *herbicola* group. New Zealand J. of Sci. **12**: 223-236.
- Dye, D.W.** 1969c. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 4. Atypical erwinias. New Zealand J. of Sci. **12**: 833-839.

Eastgate, J.A. 2000. *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fire blight disease. Mol. Plant Pathol. **1**: 325-329.

EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests: *Erwinia amylovora*. In EPPO Standards PM 7/20 (1). Bull. OEPP/EPPO Bull. **34**:159-171

European Norm EN 1040. 1997. Chemical disinfectants and antiseptics. Basic bactericidal activity. Test method and requirements (phase 1).

European Norm EN 1276. 1997. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas. Test methods and requirements (phase 2, step 1).

Expert, D., A. Dellagi, and R. Kachadourian. 2000. Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferrioxamine E, the main siderophore of *Erwinia amylovora*, p. 179-195. In J.L. Vanneste (ed.), Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Falkenstein, H., P. Bellemann, S. Walter, W. Zeller, and K. Geider. 1988. Identification of *Erwinia amylovora*, the fireblight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 2798-2802.

Federighi, M., J.L. Tholozan, J.M. Cappelier, J.P. Tissier, J.L. Jouve. 1998. Evidence of non-coccoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron electron microscopy. Food Microbiol. **15**: 539-550.

Gasol, J.M., U.L. Zweifel, F. Peters, J.A. Fuhrman, A. Hagström. 1999. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 4475-4483.

Gay, F.P. 1936. Agents of disease and host resistance, p. 201. Charles Thomas, Baltimore.

Geddie, J.L., I.W. Sutherland. 1993. Uptake of metals by bacterial polysaccharides. J. Appl. Bacteriol. **74**: 467-472.

- Geider, K.** 1999. Interference of copper sulphate in growth of *Erwinia amylovora*. J. Phytopathol. **147**: 521-526.
- Geider, K.** 2000. Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan, p. 117-140. In J.L. Vanneste (ed.), Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Geider, K.** 2006. Twenty years of molecular genetics with *Erwinia amylovora*: answers and new questions about EPS-synthesis and other virulence factors. Acta Hort. **704**: 397-402.
- Geider, K., Z. Du, M. Hildebrand, W.-S. Kim, V. Jakovljevic, S. Jock.** 2006. Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora* and related pathogens. Acta Hort. **704**: 403- 415.
- Geider, K., C. Hohmeyer, R. Haas, T.F Meyer.** 1985. A plasmid cloning system utilizing replication and packaging functions of the filamentous bacteriophage fd. Gene **33**: 341-349.
- Geider, K., E. Moltman, W. Zeller, M. Mohammadi.** 2007. Simultaneous detection of *Erwinia amylovora* strains with and without plasmid pEA29 and of antagonistic bacteria by real-time PCR. 11th International Workshop on Fire Blight, Portland, Oregon, USA. Abstract, p. 108.
- Geier, G., K. Geider.** 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. Physiol. Mol. Plant Pathol. **42**: 387-404.
- Ghezzi, J.I., T.R. Steck.** 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. FEMS Microbiol. Ecol. **30**: 203-208.
- Goodman, R.N.** 1983. Fire blight, a case study, p. 45-63. In J.A. Callow (ed.), Biochemical Plant Pathology. J. Wiley & Sons, Chichester.
- Gorris, M.T., E. Camarasa, M.M. López, J.P. Paulin, R. Chartier, M. Cambra.** 1996a. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. Acta Hort. **411**: 47-52.
- Gorris, M.T., M. Cambra, P. Lecomte, P. Llop, R. Chartier, J.P. Paulin, M.M. López.** 1996b. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. Acta Hort. **411**: 41-46.

- Granger J., B.B. Ward.** 2003. Accumulation of nitrogen oxides in copper-limited cultures of denitrifying bacteria. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 313-318.
- Grey, B.E., T.R. Steck.** 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3866-3872.
- Gross, M., G. Geier, K. Rudolph, K. Geider.** 1992. Levan and levansucrase synthesized by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **40**: 371-381.
- Guilford, P.J., R.K. Taylor, R.G. Clark, C.N. Hale, L.S. Forster.** 1996. PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **411**: 53-56.
- Gutnick, D.L., H. Bach.** 2000. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 451-460.
- Hale, C.N., R.K. Taylor, M.T. Momol, H. Saygili.** 1999. Effect of cool storage on survival of *Erwinia amylovora* in apple calyxes. *Acta Hort.* **489**: 139-143.
- Harrison R.J., J.A. Berges.** 2004. Marine culture media, p. 21-34. In O. Selinus, B. Alloway, J.A. Centeno *et al.* (eds.), *Essentials of medical geology*. Elsevier, Academic Press, Burlington, USA.
- Hauben, L., E.R.B. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, J. Swings.** 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. And Appl. Microbiol.* **21**: 384-397.
- Heijnen, C.E., J.D. van Elsas.** 1994. Metabolic activity of bacteria introduced into soil, P. 187-189. In M.H. Ryder, P.M. Stephens, and G.D. Bowen (eds.), *Improving plant productivity with Rhizobacteria*. CSIRO Division of soils, Adelaide, Australia.
- Henis, Y., Y. Bashan.** 1986. Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens, p. 252-268. In N.J. Fokkema and J. Van den Heuvel (eds.), *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Hettwer U., M. Gross, K. Rudolph.** 1995. Purification and characterization of levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **177**: 2834-2839.

- Hildebrand, M., P. Aldridge, K. Geider.** 2006. Characterization of *hns* genes from *Erwinia amylovora*. *Mol. Genet. Genomics.* **275**: 310-319.
- Hildebrand, D.C., M.N. Schroth, D.C. Sands.** 1988. *Pseudomonas*, p. 60-80. *In* N.W. Schaad (ed.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Hildebrand, M., C.C. Tebbe, K. Geider.** 2001. Survival studies with the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in soil and in a soil-inhabiting insect. *J. Phytopathol.* **149**: 635-639.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, T.J. Staley, S.T. Williams.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, Maryland, USA. 787 pp.
- Hoppe, H.G.** 1976. Determination and properties of actively metabolizing heterotrophic bacteria in the sea, investigated by means of microautoradiography. *Mar. Biol.* **36**: 291-302.
- Huq, A., I.N.G. Rivera, R.R. Colwell.** 2000. Epidemiological significance of viable but nonculturable microorganisms, p. 301- 323. *In* R.R. Colwell and D.J. Grimes (eds.), *Nonculturable microorganisms in the environment*. ASM Press, Washington D.C.
- Husson, D., R.R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A.D. Pearson, R.M. Weiner, W.D. Burge.** 1987. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Bio/Technol.* **5**: 947-950.
- Ilan, O., Y. Bloch, G. Frankel, H. Ullrich, K. Geider, I. Rosenshine.** 1999. Protein tyrosine kinases in bacterial pathogens are associated with virulence and production of exopolysaccharide. *EMBO J.* **18**: 3241-3248.
- Ishimaru C., E.J. Klos.** 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathol.* **74**: 1342-1345.
- Jannasch, H.W.** 1979. Microbial ecology of aquatic low nutrient habitats, p. 243-260. *In* M. Shilo (ed.), *Strategies of microbial life in extreme environments*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Jock, S., C. Langlotz, K. Geider.** 2005. Survival and possible spread of *Erwinia amylovora* and related plant-pathogenic bacteria exposed to environmental stress conditions. *J. Phytopathol.* **153**: 87-93.

Johnson, K.B., V.O. Stockwell. 1998. Management of fire blight: a case study in microbial ecology. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 227-248.

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

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

Jones, A.L., K. Geider. 2001. *Erwinia amylovora* group, p. 40-55. In N.W. Schaad, J.B. Jones y W. Chun (eds.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, APS Press, St. Paul, Minnesota.

Jones, D.M., E.M. Sutcliffe, A. Curry. 1991. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2477-2482.

Jumel, K., K. Geider, S.E. Harding. 1997. The solution molecular weight and shape of the bacterial exopolysaccharides amylovoran and stewartan. *Int. J. Biol. Macromolecules.* **20**: 251-258.

Kazy, SK, P. Sar, R.K. Asthana, S.P. Singh. 1999. Copper uptake and its compartmentalization in *Pseudomonas aeruginosa* strains: chemical nature of cellular metal. *World J. Microbiol. and Biotechnol.* **15**: 599-605.

Keel, C., M. Zala, J. Troxler, A. Natsch, H.A. Pfirter, G. Defago. 1994. Application of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO to standard soil-columns and field-scale lysimeters. I. Survival and vertical translocation, p. 255-257. In M.H. Ryder, P.M. Stephens, and G.D. Bowen (eds.), *Improving plant productivity with Rhizobacteria.* CSIRO Division of soils, Adelaide, Australia.

Kell, D.B., A.S. Kaprelyants, D.H. Weichart, C.R. Harwood, M.R. Barer. 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Leeuwenhoek.* **73**: 169-187.

Kelm, O., C. Kiecker, K. Geider, F. Bernhard. 1997. Interaction of the regulator proteins RcsA and RcsB with the promoter of the operon for amylovoran biosynthesis in *Erwinia amylovora*. *Mol. Gen. Genet.* **256**: 72-83.

Kidambi, S.P., G.W. Sundin, D.A. Palmer, A.M. Chakrabarty, C.L. Bender. 1995. Copper as a signal for alginate synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2172-2179.

Kim, J.F., S.V. Beer. 2000. *hrp* genes and harpins of *Erwinia amylovora*: a decade of discovery, p. 141-161. In J.L. Vanneste (ed.), Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Kim, W.-S., S.L. Rhim, B. Volksch, L. Gardan, J.P. Paulin, S. Jock, K. Geider. 1999. Characterization of a new *Erwinia* species affecting Asian pear trees. Acta Hort. 489: 201-205.

King, E.O., M. Ward, D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Lab. Clin. Med. **44**: 401-407.

Knudsen, G.R. 1991. Models for the survival of bacteria applied to the foliage of crop plants, p. 191-216. In C.J. Hurst (ed.), Modeling the environmental fate of microorganisms. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Ko, K., J.L. Norelli, J.P. Reynold, E. Boreszja-Wysocka, S.K. Brown, H.S. Aldwinckle. 2000. Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. Biotechnol. Lett. **22**: 373-381.

Koch, A.L. 1994. Growth measurement, p. 248-277. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood & N.R. Krieg (eds.), Methods for general and molecular bacteriology. ASM, Washington D.C.

Kogure, K., U. Simidu, N. Taga. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiol. **25**: 415-420.

Leive, L. 1965. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **21**: 290-296.

Lelliot, R.A. 1967. The diagnosis of fire blight (*Erwinia amylovora*) and some diseases caused by *Pseudomonas syringae*. EPPO Bull. **45**: 27-34

- Liao, C., L.M. Shollenberger.** 2004. Enumeration, resuscitation, and infectivity of the sublethally injured *Erwinia* cells induced by mild acid treatment. *Phytopathol.* **94**: 76-81.
- Linder, K., J.D. Oliver.** 1989. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **12**: 185-190.
- Lindow, S.E., G. McGourty, R. Elkins.** 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* A506 in the control of fire blight and frost injury of pear. *Phytopathol.* **86**: 841-848.
- Llèò, M.M. , S. Pierobon, M.C. Tafi, C. Signoreto, P. Canepari.** 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4564-4567.
- Llop, P., A. Bonaterra, J. Peñalver, M.M. López.** 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**: 234-240.
- Llop, P., P. Caruso, J. Cubero, C. Morente, M.M. López.** 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.
- Llop, P., V. Donat, M. Rodríguez, J. Cabrefiga, L. Ruiz, J.L. Palomo, E. Montesinos, M.M. López.** 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathol.* **96**: 900-907.
- López, M.M., E. Bertolini, A. Olmos, P. Caruso, M.T. Gorris, P. Llop, R. Penyalver, M. Cambra.** 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *Int. Microbiol.* **6**: 233-243.
- López, M.M., M. Cambra.** 1996. Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas, p. 587-625. *In* G. Yacer, M.M. López, A. Trapero, A. Bello (eds.), *Patología Vegetal*. Sociedad Española de Fitopatología.
- López, M.M., P. Llop, V. Donat, J. Peñalver, A. Rico, A. Ortiz, J. Murillo, I. Llorente, E. Badosa, E. Montesinos.** 2002. Chronicle of a disease foretold (that advances slowly): the 2001 Spanish situation. *Acta Hort.* **590**: 35-38.

López, M.M., P. Llop, M.T. Gorris, J. Peñalver, V. Donat, M. Cambra, M. Keck. 2006. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. Acta Hort. **704**: 99-103.

López, M.M., C. Noval, E. Palazón, M. Sapayo. 1988. El fuego bacteriano. *Erwinia amylovora*. 72 pp. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.

López, M.M., R. Peñalver. 2005. Control biológico de bacterias fitopatógenas, p. 131-151. In J. Jacas, P. Caballero, J. Ávila (eds.), El control biológico de plagas y enfermedades. Universitat Jaume I y Universidad Pública de Navarra.

Maes, M., P. Garbeva, C. Crepel. 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.

Manafi, M., W. Kneifel, S. Bascomb. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Rev. **55**: 335-348.

Manahan, S.H., T.R. Steck. 1997. The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*. FEMS Microbiol. Ecol. **22**: 29-37.

Marco-Noales, E., E.G. Biosca, C. Amaro. 1999. Effects of salinity and temperature on long-term survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). Appl. Environ. Microbiol. **65**: 1117-1126.

Mascher, F., C. Hase, Y. Moenne-Loccoz, G. Defago. 2000. The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote persistence in soil. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 1662-1667.

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.

McDougald, D., J.I. Prosser, L.A. Glover, J.D. Oliver. 1995. Effect of temperature and plasmid carriage on nonculturability in organisms targeted for release. FEMS Microbiol. Ecol. **17**: 229-238.

McDougald, D., S.A. Rice, D. Weichart, S. Kjelleberg. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? FEMS Microbiol. Ecol. **25**: 1-9.

- McGovern, V.P., J.D. Oliver.** 1995. Induction of cold responsive proteins in *Vibrio vulnificus*. J. Bacteriol. **177**: 4131-4133.
- McLaughlin, R.J., T.A. Chen, J.M. Wells.** 1989. Monoclonal antibodies against *Erwinia amylovora*: characterization and evaluation of a mixture for detection by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathol. **79**: 610-613.
- McManus, P.S., A.L. Jones.** 1994. Role of wind-driven rain, aerosols and contaminated budwood in incidence and spatial pattern of fire blight in an apple nursery. Plant Dis. **78**: 1059-1066.
- McManus, P.S., A.L. Jones.** 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested-PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. Phytopathol. **85**: 618-623.
- McManus, P.S., V. Stockwell, G. Sundin, A.L. Jones.** 2002. Antibiotic use in plant agriculture. Annu. Rev. Phytopathol. 2002. **40**: 443-465.
- Meng, X., J.M. Bonasera, J.F. Kim, R.M. Nissenin, W.-S. Kim, S.V. Beer.** 2003. DspE protein of *Erwinia amylovora* interacts with kinases from apple. Acta Hort. **590**: 463-464.
- Menkissoglu, O., S.E. Lindow.** 1991a. Relationship of free ionic copper and toxicity to bacteria in solutions of organic compounds. Phytopathol. **81**: 1258-1263.
- Menkissoglu, O., S.E. Lindow.** 1991b. Chemical forms of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on plants. Phytopathol. **81**: 1263-1270.
- Miller, T.D., M.N. Schroth.** 1972. Monitoring of epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pears with selective medium. Phytopathol. **62**: 1175-1182.
- Mohan, S.K., S.V. Thomsom.** 1996. An outbreak of fire blight in plums. Acta Hort. **411**: 73-96.
- Momol, M.T., J.D. Ugine, J.L. Norelli, H.S. Aldwinckle.** 1999. The effect of prohexadione calcium, SAR inducers and calcium on the control of shoot blight caused by *Erwinia amylovora* on apple. Acta Hort. **489**: 601-607.
- Monier J.-M., S.E. Lindow.** 2003. *Pseudomonas syringae* responds to the environment on leaves by cell size reduction. Phytopathol. **93**: 1209-1216.

- Montesinos, E., M.M. López.** 1998. El fuego bacteriano de las rosáceas. Situación actual y perspectivas de control. *Phytoma España* **104**: 24-36.
- Montesinos, E., M.M. López.** 2000. Fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*), p. 37-40. Enfermedades de los frutales de pepita y hueso. Ed. Mundi-Prensa. ISBN: 84-7144-916-8.
- Montesinos, E., M.M. López, J. Murillo.** 1999. Importancia y situación actual del fuego bacteriano en España. Epidemiología, daños y prevención. *Phytoma España*. **114**: 128-136.
- Morgan, J.A.W., P.A., Cranwell, R.W. Pickup.** 1991. Survival of *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1777-1782.
- Morita, R.Y.** 1997. Bacteria in oligotrophic environments. Starvation-survival lifestyle. Chapman & Hall., International Thomson Publishing, New York.
- Morton, D., J.D. Oliver.** 1994. Induction of carbon starvation proteins in *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3653-3659.
- Murray, R.G.E., R.N. Doetsch, C.F. Robinow.** 1994. Determinative and cytological light microscopy, p. 21-41. *In* P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A Wood, and N.R. Krieg (eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.
- Nimtz, M., A. Mort, T. Domke, V. Wray, Y. Zhang, F. Qiu, D. Coplin, K. Geider.** 1996. Structure of amylovanan, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydr. Res.* **287**: 59-76.
- Norelli, J.L., H.S. Aldwinckle, L. Destefano Beltran, J.M. Jaynes.** 1994. Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin gene E has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica*. **77**: 123-128.
- Norelli, J.L., A.L. Jones, H.S. Aldwinckle.** 2003. Fire blight management in the twenty-first century. *Plant. Dis.* **87**: 756-765.
- Norelli, J.L., S.S. Miller.** 2006. Using prohexadione-calcio to control fire blight in young apple trees. *Acta Hort.* **704**: 217-223.

Norton, J.M., M.K. Firestone. 1991. Metabolic status of bacteria and fungi in the rhizosphere of ponderosa pine seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1161-1167.

Nwoguh, C.E., C.R. Harwood, M.R. Barer. 1995. Detection of induced β -galactosidase activity in individual non-culturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay. *Mol. Microbiol.* **17**: 545-554.

Nyström, T. 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch. Microbiol.* **176**: 159-164.

Nyström, T., S. Kjelleberg. 1989. Role of protein synthesis in the cell division and starvation induced resistance to autolysis of a marine *Vibrio* during the initial phases of starvation. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1599-1606.

Oliver, J.D. 1993. Formation of viable but nonculturable cells, p. 239-272. *In* S. Kjelleberg (ed.), *Starvation in bacteria*. Plenum Press, New York, N.Y.

Oliver, J.D. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-300. *In* R.R. Colwell and D.J. Grimes (eds.), *Nonculturable microorganisms in the environment*. ASM Press, Washington D.C.

Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**: 93-100.

Oliver, J.D., R. Bockian. 1995. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2620-2623.

Olsen, R.A., L.R. Bakken. 1987. Viability of soil bacteria: optimization of plate counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microb. Ecol.* **13**: 59-74.

Ophir, T., D.L. Gutnick. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 740-745.

Palomo, J.L. 2007. El fuego bacteriano en Castilla y León. Detección de un nuevo foco en "La Cepeda" (León), p. 11. *In* Abstracts II Reunión del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas de la Sociedad Española de Microbiología, Málaga, España.

Paulin, J.P. 2000. *Erwinia amylovora*: general characteristics, p. 87-115. In J.L. Vanneste (ed.), Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Paulin, J.P., C. Jacquart-Romon, P. Lecomte. 1994. El programa Parafeu. Una herramienta para luchar racionalmente contra el fuego bacteriano. Phytoma España. **61**: 44-48.

Paulin, J.P., R. Samson. 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.

Pedersen, J.C., C.S. Jacobsen. 1993. Fate of *Enterobacter cloacae* JP120 and *Alcaligenes eutrophus* AEO106(pRO101) in soil during water stress: effects on culturability and viability. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 1560-1564.

Pedersen, J.C., T.D. Leser. 1992. Survival of *Enterobacter cloacae* on leaves and in soil detected by immunofluorescence microscopy in comparison with selective plating. Microb. Releases. **1**: 95-102.

Pemezny, K., J. Collins. 1997. Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper: relationships to host-plant resistance and exposure to copper sprays. Plant. Dis. **81**: 791-794.

Politis, D.J., R.N. Goodman. 1980. Fine structure of extracellular polysaccharide of *Erwinia amylovora*. Appl. Environ. Microbiol. **40**: 596-607.

Porter, J., C. Edwards, R.W. Pickup. 1995. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. J. Appl. Bacteriol. **4**: 399-408.

Postgate, J.R. 1967. Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress, p. 1-21. In A.H. Rose & J. Wilkinson (eds.), Advances in microbial physiology. Academic Press, London, United Kingdom.

Postgate, J.R. 1969. Viable counts and viability. Meth. Microbiol. **1**: 611-628.

Postma, J., J.D. van Elsas, J.M. Govaert, J.A. van Veen. 1988. The dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil as determined by immunofluorescence and selective techniques. FEMS Microbiol. Ecol. **53**: 251-260.

- Pruzzo, C., R. Tarsi, M.M. Lleò, C. Signoretto, M. Zampini, R.R. Colwell, P. Canepari.** 2002. Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *Curr. Microbiol.* **45**: 105-110.
- Psallidas, P.G., J. Tsiantos.** 2000. Chemical control of fire blight, p. 199-234. In J.L. Vanneste (ed.), *Fire Blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Pyrog, T.P.** 2001. Biological functions of microbial exopolysaccharides. *Mikrobiol. Z.* **63**: 80-101.
- Rahman, I., M. Shahamat, M.A.R. Chowdhury, R.R. Colwell.** 1996. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 115-120.
- Ramamoorthy S., D.J. Kushner.** 1975. Binding of mercuric and other heavy metal ions by microbial growth media. *Microb. Ecol.* **2**: 162-176.
- Ray, T.C., A.R.W. Smith, K.J. Carter, R.C. Hignett.** 1986. Composition of lipopolysaccharides from four strains of *Erwinia amylovora*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3159-3167.
- Richaume, A., C. Steinberg, L. Jocteur-Monrozier.** 1993. Differences between direct and indirect enumeration of soil bacteria: the influence of soil structure and cell location. *Soil. Biol. Biochem.* **25**: 641-643.
- Rocelle M., S. Clavero, L.R. Beuchat.** 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3268-3273.
- Roselló, M., R. Christen, P. Llop, S. Ferrer, L. Gardan, M.M. López.** 2007. Description of *Erwinia piriflorinigrans* sp. Nov. That causes necrosis of pear blossoms. 11th International Workshop on Fire Blight, Portland, Oregon, USA. Abstract, p. 242.
- Roszak, B.D., R.R. Colwell.** 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**: 365-379.
- Salm, H., K. Geider.** 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Plant Pathol.* **53**: 602-610.

- Samson, R., J.B. Legendre, R. Christen, M. Fischer-Le Saux, W. Achouak, L. Gardan.** 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.*, 1953) Brenner *et al.*, 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1415-1427.
- Saxena, D., N. Joshi, S. Srivastava.** 2002. Mechanism of copper resistance in a copper mine isolate *Pseudomonas putida* strain S4. *Current Microbiol.* **45**: 410-414.
- Scanferlato, V.S., R.D. Orvos, J.Jr. Cairns, G.H. Lacy.** 1989. Genetically engineered *Erwinia carotovora* in aquatic microcosms: survival and effects on functional groups of indigenous bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1477-1482.
- Scheusner D.L., F.F. Busta, M.L. Speck.** 1971. Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents. *Appl. Microbiol.* **21**: 46-49.
- Signoretto, C., M.M. Lleò, P. Canepari.** 2002. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr. Microbiol.* **44**: 125-131.
- Slade, M.B., A.I. Tiffin.** 1984. Biochemical and serological characterization of *Erwinia*, p. 228-293. *In* T. Bergon (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 15. Academic Press, London.
- Sobiczewski, P., T. Deckers, J. Pulawska.** 1997. Fire blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. *In* P. Sobiczewski, T. Deckers, J. Pulawska (eds.), *Phare the European Union's. Phare Partnership and Institution Building programme.*
- Steiner, P.W.** 1989. Predicting canker, shoot and trauma blight phases of apple fire blight epidemics using MARYBLYT model. *Acta Hort.* **273**: 149-158.
- Stockwell, V.O., K.B. Johnson, J.E. Loper.** 1996. Compatibility of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* with antibiotics used for fire blight control. *Phytopathol.* **86**: 834-840.
- Stout, V., A. Torres-Cabassa, M.R. Maurizi, D. Gutnick, S. Gottesman.** 1991. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J. Bacteriol.* **173**: 1738-1747.

Teitzel, G.M., M.R. Parsek. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2313-2320.

Thibault, B., M. Le Lezec. 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.

Tholozan, J.L., J.M. Cappelier, J.P. Tissier, G. Delattre, M. Federighi. 1999. Physiological characterization of viable-but-non-culturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1110-1116.

Thomson, S.V. 2000. Epidemiology of fire blight, p. 9-36. *In* J.L. Vanneste (ed.), Fire Blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.

Tolbert, N.E. 1964. Nitrogen requirement and metabolism of *Erwinia amylovora*. *Physiol. Plant.* **17**: 44-48.

Troxler, J., M. Zala, C. Keel, A. Natsch, G. Defago. 1994. Application of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO to standard soil-columns and field-scale lysimeters. II. Detection and enumeration, p. 258-260. *In* M.H. Ryder, P.M. Stephens, and G.D. Bowen (eds.), Improving plant productivity with Rhizobacteria. CSIRO Division of soils, Adelaide, Australia.

Troxler, J., M. Zala, Y. Moenne-Loccoz, G. Defago. 1997. Predominance of nonculturable cells of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the surface horizon of large outdoor lysimeters. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3776-3782.

Tsiantos, J., P. Psallidas. 2004. Fire blight resistance in various loquat, apple and pear cultivars and selections in Greece. *J. Plant Pathol.* **86**: 227-232.

Valentine, R.C., J.R.G. Bradfield. 1954. The urea method for bacterial viability counts with electron microscope and its relation to other viability counting methods. *J. Gen. Microbiol.* **11**: 349-357.

Van der Zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight, p. 37-54. *In* J.L. Vanneste (ed.), Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.

Van der Zwet, T., S.V. Beer. 1995. Fire Blight – Its nature, prevention, and control. A Practical Guide to Integrated Disease Management. United States Department of Agriculture (U.S.D.A). Agriculture Information Bulletin No. 631. Washington, D.C.

Van der Zwet, T., H.L. Keil. 1979. Fire blight – A bacterial disease of rosaceous plants. United States Department of Agriculture (U.S.D.A.). Agriculture Handbook 510. Washington, D.C.

Van der Zwet, T., J. Walter. 1996. Presence of *Erwinia amylovora* in apparently healthy nursery propagating material. Acta Hort. **411**: 127-130.

Van der Zwet, T., B.G. Zoller, S.V. Thomson. 1988. Controlling fire blight of pear and apple by accurate prediction of the blossom blight phase. Plant Dis. **72**: 464-472.

van Elsas, J. D., P. Kastelein, P. M. de Vries, L. S. van Overbeek. 2001. Effects of ecological factors on the survival physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. Can. J. Microbiol. **47**:1-13.

van Elsas J.D., P. Kastelein, P. van Bekkum, J.M. van der Wolf, P.M. de Uries, L.S. van Overbeek. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. Phytopathol. **90**: 1358-1366.

Van Elsas, J.D., L.S. Van overbeek, M.J. Bailey, J. Schönfeld, K. Smalla. 2005. Fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 as affected by conditions and soil treatments in temperature climate zones, p. 39-49. In C. Allen, P. Prior, A.C. Hayward (eds.), Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Vanneste, J.L. 1995. *Erwinia amylovora*, p. 21-41. In U.S. Singh, R.P. Singh y K. Kohmoto (eds.), Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular basis, vol. 1. Pergamon Press, Oxford and London, UK.

Vanneste, J.L. 2000. What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it?, p. 1-6. In J.L. Vanneste (ed.), Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.

Vanneste, J.L., S. Eden-Green. 2000. Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues, p. 73-83. In J.L. Vanneste (ed.), Fire blight. The disease and its causative agent. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.

- Warner, J.M., J.D. Oliver.** 1998. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3025-3028.
- Wehland, M., C. Kiecker, D.L. Coplin, O. Kelm, W. Saenger, F. Bernhard.** 1999. Identification of an RcsA/RcsB recognition motif in the promoters of exopolysaccharide biosynthetic operons from *Erwinia amylovora* and *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *J. Biol. Chem.* **274**: 3300-3307.
- Weichert, D.H.** 1999. Stability and survival of VBNC cells – conceptual and practical implications. In C.R. Bell, M. Brylinsky and P. Johnson-Green (eds), *Microbial biosystems: new frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.* Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Weiner, R.M.** 1997. Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends Biotechnol.* **15**: 390-394.
- Whitesides, M.D., J.D. Oliver.** 1997. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1002-1005.
- Wilson, M., S.E. Lindow.** 1992. Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3908-3913.
- Wilson, M., S.E. Lindow.** 1993. Effect of phenotypic plasticity on epiphytic survival and colonization by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 410-416.
- Wilson, M., S.E. Lindow.** 2000. Viable but nonculturable cells in plant-associated bacterial populations, p. 229-241. In R.R. Colwell and D.J. Grimes (eds.), *Nonculturable microorganisms in the environment.* ASM Press. Washington, D.C.
- Winslow, C.E.A., J. Broadhurst, R.E. Buchanan, C. Krumwiede, L.A. Rogers, G.H. Smith.** 1920. The families and genera of the bacteria; *Erwineae*. *J. Bacteriol.* **5**: 191-229.
- Xu, H.-S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes, R.R. Colwell.** 1982. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**: 313-323.
- Yamasaki, A., M. A. S. D. A. Cunha, J. A. B. P. Oliveira, A. C. Duarte, M. T. S. R. Gomes.** 2004. Assessment of copper toxicity using an acoustic wave sensor. *Biosens. Bioelectron.* **19**: 1203-1208.

Zevenhuizen, L.P.T.M., J. Dolfing, E.J. Eshuis, I.J. Scholten-Koerselman. 1979. Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecol.* **5**: 139-146.

Zhang, Y., K. Geider. 1999. Molecular analysis of the *rlsA* gene regulating levan production by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **54**: 187-201

Zhang, Y., S. Jock, K. Geider. 2000. Genes of *Erwinia amylovora* involved in yellow color formation and release of a low-molecular-weight compound during growth in the presence of copper ions. *Mol. Gen. Genet.* **264**: 233-240.

Zimmerman, R., R. Iturriaga, J. Becker-Birck. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **36** : 926-935.