

Resumen

El fuego bacteriano está considerada la enfermedad más grave que afecta a frutales de pepita y rosáceas ornamentales y silvestres, por su difícil control químico, su fácil diseminación y por afectar a especies vegetales de gran importancia económica, como manzano, peral, níspero y membrillero. El agente causal de esta enfermedad es la bacteria *Erwinia amylovora*, perteneciente a la familia *Erwiniaceae* y considerada organismo de cuarentena en la Unión Europea.

Esta especie ha sido ampliamente estudiada, pero a nivel genómico todavía queda mucho por conocer, ya que en la actualidad existen únicamente dos genomas publicados, completamente secuenciados y anotados, y otros trece ensamblados en *scaffolds*, de cepas de *E. amylovora* de diferentes orígenes geográficos y huéspedes. Por ello su pangenoma se considera abierto, aunque con un *core* o genoma conservado con una alta identidad de secuencia en estas cepas. Con esos datos podemos decir que existe muy poca variabilidad intraespecífica, lo que se manifiesta en una escasa diversidad genotípica, advirtiéndose que los plásmidos son la mayor fuente de variabilidad genética. Esta variabilidad podría explicar las diferencias en virulencia en cepas portadoras de plásmidos, así como su mejor adaptación a diferentes condiciones ambientales.

Esta tesis consta de una introducción general, una revisión bibliográfica específica y publicada, sobre los plásmidos de las especies de *Erwinia* patógenas y epifitas asociadas a frutales de pepita y rosáceas ornamentales, y cuatro trabajos experimentales sobre *E. amylovora* y *E. piriflorinigrans*.

El origen de este trabajo surgió al observar que el plásmido pEA29 descrito en la mayoría de las cepas de *E. amylovora*, y con un efecto cuantitativo en virulencia, no se encontró en algunos aislados españoles de la bacteria. El estudio de estas cepas sin plásmido dio paso al descubrimiento de otro plásmido de unas 70 Kb que se ha denominado pEI70, el cual está presente en cepas de *E. amylovora* de varios países europeos. Por ello, después del pEA29, el plásmido pEI70 es el de mayor presencia en las cepas de esta especie. Se ha estudiado la función, distribución y contenido genético de este plásmido, así como el efecto del pEA29 y del pEI70 sobre la expresión de los genes cromosómicos de la cepa que los porta, tras la infección en fruto inmaduro. Los experimentos de inoculación en fruto con las cepas a las que se les había introducido el plásmido pEI70 o el pEA29, en comparación con esa misma cepa sin plásmidos, mostraron un aumento de la virulencia, que se manifestaba en una reducción en el tiempo de la aparición de síntomas y en que éstos se presentaban de forma más agresiva.

Por todo ello, con el fin de estudiar si la presencia de cada uno de estos dos plásmidos podría producir efectos sobre determinados genes cromosómicos que explicarían esa variación en virulencia de la cepa portadora, se realizó un experimento de expresión génica diferencial usando un *microarray* con sondas del genoma completo de la bacteria, así como de los plásmidos pEA29 y pEI70. Los resultados obtenidos demostraron el papel de ambos plásmidos al afectar a la expresión de entre 120 y 180 genes cromosómicos según el plásmido que porte la cepa, enriqueciéndose en cada caso categorías funcionales diferentes, aunque 28 de ellos fueron coincidentes en los dos casos.

Por otro lado, *E. piriflorinigrans* es una especie patógena descrita recientemente que produce necrosis sólo en las flores de peral, pero no parece afectar a otros órganos. Además, ambas especies comparten características fenotípicas y moleculares, haciendo difícil su distinción. Su detección y correcta identificación era un reto debido a que los síntomas que provoca en flores son prácticamente

indistinguibles a los causados por *E. amylovora*. En este trabajo se ha estudiado el contenido genético de un plásmido de 37 Kb, denominado pEPIR37, que se ha comprobado está presente en todas las cepas analizadas de la especie *E. piriflorinigra*s. Además, se ha observado que cuando este plásmido es introducido en cepas de la especie *E. amylovora* curadas de plásmidos, y que por ello presentan una virulencia reducida, mostraron un nivel de virulencia mayor, comparable a la observada en las cepas portadoras del plásmido pEA29, lo que parece indicar que este plásmido produce un efecto similar. Por todo ello en este trabajo también se han desarrollado dos protocolos específicos y sensibles de PCR en tiempo real y convencional para identificar, detectar y diferenciar *E. piriflorinigra*s de *E. amylovora* y de otras especies de este género, usando iniciadores diseñados a partir de secuencias específicas del plásmido pEPIR37. Ello ha permitido identificar esta nueva especie en otros huéspedes como *Pyracantha* sp., además de peral y en otras regiones españolas en donde anteriormente no se había detectado.

Asimismo, estos resultados han permitido conocer aspectos biológicos y epidemiológicos de *E. piriflorinigra*s que aportan nueva información científica que resultaría clave para establecer estrategias para su control en frutales de pepita.

El estudio de los plásmidos y sus funciones en estas dos especies tan relacionadas filogenéticamente y su papel en la adaptación al medio en el que ambas habitan, así como en la virulencia de las cepas que los portan, podría dar nuevas pistas sobre el origen de estos patógenos, su evolución, su ciclo biológico y su interacción con las plantas hospedadoras.