

DISTRIBUCIÓN DE *BRENNERIA* SPP. EN LA COMUNIDAD VALENCIANA Y ESPECIES FORESTALES A LAS QUE AFECTA

Elena González Biosca¹, Eduardo Pérez-Laorga Arias², Begoña Águila Clarés¹, José Francisco Catalá-Senent¹, Ricardo Delgado Santander¹, Raquel González Abolafio³ y María Milagros López González³

¹ Dpto. Microbiología y Ecología. Facultad de Biológicas. Universidad de Valencia. Dr. Moliner 50. 46100-BURJASOT (Valencia, España). Correo electrónico: elena.biosca@uv.es

² Servicio de Prevención de Incendios y Sanidad Forestal. Conselleria de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda. Generalitat Valenciana. C/ Francisco Cubells 7. 46011-VALENCIA (España)

³ Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Carretera de Moncada a Náquera km 4,5. 46113-MONCADA (Valencia, España)

Resumen

El género *Brenneria* agrupa especies bacterianas que producen chancros con lesiones necróticas y exudados en plantas leñosas. En España, en los últimos años, se han identificado varias *Brenneria* sp. como responsables de chancros bacterianos en quercíneas (*B. quercina*), nogales (*B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens*) y chopos (*Brenneria* sp.). En la Comunidad Valenciana también se han detectado focos de *B. quercina* en encinas de algunos parajes de importancia medioambiental, pero todavía se dispone de escasa información acerca de la incidencia de esta bacteriosis en nuestra Comunidad. Sin embargo, no existen referencias de la presencia de *Brenneria* spp. en nogal o chopo en la Comunidad Valenciana, aunque no se puede descartar su presencia o introducción a través de material vegetal. El objetivo del presente trabajo ha sido conocer la incidencia de dichas bacteriosis en nuestra Comunidad. Para ello, se han continuado las prospecciones en masas de quercíneas de distintos orígenes geográficos de la Comunidad Valenciana iniciadas en un estudio anterior, y se han centrado en aquellas zonas o especies del género *Quercus* en las que la bacteria no había sido detectada previamente. Además, se han iniciado prospecciones en otras especies forestales de interés para nuestra Comunidad, como *Juglans regia* y *Populus* spp.

Palabras clave: Chancro bacteriano, Chopo, Decaimiento, Exudados, Nogal, Quercíneas

INTRODUCCIÓN

El nuevo género *Brenneria* fue creado en 1998 (HAUBEN et al., 1998) para agrupar a seis especies bacterianas, anteriormente incluidas en el género *Erwinia*, que afectan a varias especies leñosas produciendo generalmente chancros con exudados. En España, las bacteriosis causadas

por *Brenneria* sp. eran desconocidas, pero en la última década se han identificado el chancro bacteriano y el chancro profundo del nogal producidos por *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens*, respectivamente (LÓPEZ et al., 1994; GONZÁLEZ et al., 2002), el chancro bacteriano de las quercíneas causado por *B. quercina* (SORIA et al., 1997, BIOSCA et al., 2003) y el chancro bacteriano del

chopo cuyo agente causal ha sido recientemente identificado como *Brenneria* sp. (BIOSCA et al., 2002b, 2006a, 2006b).

B. quercina, el agente causal de la enfermedad conocida como “drippy nut” o frutos con exudados, se describió por primera vez en *Q. agrifolia* y *Q. wislizeni* en California en 1967 (HILDEBRAND & SCROTH, 1967). En España, esta bacteria se identificó por primera vez en 1992 en la Comunidad de Madrid, a partir de chancros en tronco y ramas de *Q. rotundifolia* y *Q. pyrenaica* (SORIA et al., 1997). Posteriormente, se ha detectado en otras especies del género *Quercus* de distintas Comunidades Autónomas, lo que demuestra su amplia distribución geográfica en las masas forestales españolas (BIOSCA et al., 2000, 2001). En España, los primeros síntomas observados y los más llamativos, fueron los chancros con exudados copiosos en el tronco y ramas, y que, dependiendo de su número y localización, pueden limitar el desarrollo del árbol pudiendo causarle la muerte. También es habitual la observación de exudados en frutos en formación, causando su caída prematura, y, con menor frecuencia, en yemas. Esta bacteria se considera en nuestro país como una de las causas del síndrome de la seca de las quercíneas, que también produce el decaimiento y muerte de bosques de quercíneas en varias zonas de Europa y noreste de África (SORIA et al., 1997). En las prospecciones realizadas en la Comunidad Valenciana desde 1998 hasta 2000, también se detectaron distintos focos de *B. quercina* en encinas, algunos de ellos en parajes de importancia medioambiental como el Parque Natural de la Font Roja en Alicante, el valle de Ayora en Valencia y en el Maestrazgo en Castellón (LÓPEZ et al., 2000; BIOSCA et al., 2000, 2001). Sin embargo, hasta ahora, esta bacteria no se había detectado en otras especies de quercíneas en la Comunidad Valenciana por lo que la información acerca de la incidencia de esta bacteriosis en nuestra Comunidad todavía es escasa.

Se han descrito dos especies del género *Brenneria* que pueden afectar a los nogales; *B. nigrifluens*, responsable de chancros superficiales en tronco y ramas (WILSON et al., 1957) y *B. rubrifaciens* que produce síntomas parecidos, pero que afecta también a la corteza interna, cambium y xilema causando el chanco profundo

(WILSON et al., 1966). En España, *B. nigrifluens* se detectó por primera vez en 1986 en nogales autóctonos con chancros superficiales con exudados (LÓPEZ et al., 1994). En 1995, se identificó *B. rubrifaciens* en Badajoz en plantaciones de nogales con síntomas de chanco profundo que habían sido importados de California (GONZÁLEZ et al., 2002). Actualmente, se dispone de escasa información acerca de la incidencia de estas bacteriosis en España, aunque se han observado síntomas similares a los causados por *B. nigrifluens* en nogales de Cataluña y Galicia (BIOSCA et al., 2002a). Sin embargo, en la Comunidad Valenciana todavía no existen referencias sobre la presencia de estos patógenos en nogal.

En 2000, se detectó por primera vez en España el chanco bacteriano del chopo (*Populus* spp.) en plantaciones de *P. xeuramericana* en Teruel. El agente causal fue identificado como *Brenneria* sp. Un año después, se detectó este patógeno en otras plantaciones de chopo en Zaragoza y Teruel (BIOSCA et al., 2002a, 2002b, 2006a, 2006b), demostrando que no se trataba de un hecho aislado. Los chancros observados eran similares a los causados por otras especies de *Brenneria*, sin embargo no se había citado ninguna especie de *Brenneria* en *Populus* spp. Posteriormente, se ha identificado este patógeno en otras Comunidades Autónomas como Murcia y La Rioja (BIOSCA et al., 2006a). Actualmente se desconoce la incidencia del chanco bacteriano del chopo en la Comunidad Valenciana, aunque no se puede descartar su posible introducción a través de material vegetal infectado.

El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la presencia, incidencia y características de las bacteriosis causadas por algunas especies del género *Brenneria* que afectan a las poblaciones naturales de quercíneas y que pueden afectar a otras especies forestales de interés para la Comunidad Valenciana, tales como *Juglans regia* y *Populus* spp.

MATERIAL Y MÉTODOS

Prospecciones de *Brenneria* spp. en la Comunidad Valenciana

Se realizaron en distintas zonas forestales en ejemplares de *Quercus* spp. y en plantaciones de

Juglans regia y *Populus* spp. de Valencia, Castellón y Alicante desde 2005 hasta 2007.

Aislamiento de *Brenneria* spp.

Tras las prospecciones, el aislamiento de *Brenneria* spp. de material vegetal sintomático o sospechoso de estar infectado se llevó a cabo a partir de muestras de peridermis, parénquima cortical, exudados y frutos según BIOSCA et al. (2001, 2003, 2006a, 2006b). Tras 48 h de incubación a 26°C en el medio B de King (KING et al., 1954) suplementado o no con cicloheximida (para inhibir el crecimiento de hongos) se realizó la lectura de las placas y se escogieron al azar colonias representativas del tipo morfológico mayoritario, similar al de las especies del género *Brenneria*.

Caracterización fenotípica de *Brenneria* spp.

Caracterización bioquímica y fisiológica. Se realizó con una selección de aislados de *Brenneria* spp. mediante pruebas convencionales, los sistemas miniaturizados API 20 E, API 20 NE, API 50 CH, API ZYM, el sistema Biolog y el análisis de los ácidos grasos celulares (MEAG).

La identificación de una selección representativa de aislados de *Brenneria* spp. se confirmó mediante análisis de secuenciación parcial del ADN ribosómico 16S (BIOSCA et al., 2006a).

Determinación del poder patógeno. Se han ensayado distintos métodos de inoculación sobre frutos, hojas y tronco de encinas y chopos jóvenes, con el objeto de encontrar un modelo para los ensayos de patogeneidad que permita la observación de síntomas con mayor rapidez que con árboles adultos.

En todos los ensayos, se incluyeron cepas de referencia de las especies del género *Brenneria* con propósitos comparativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prospección y aislamiento de *Brenneria* spp. en la Comunidad Valenciana

Los resultados de las prospecciones y aislamientos de *B. quercina* realizados entre 2005 y 2007 a muestras de distintos orígenes geográficos de la Comunidad Valenciana se incluyen en la

figura 1. En dicha figura se muestra un mapa actualizado de la distribución de este patógeno en nuestra Comunidad, incluyendo detecciones previas realizadas durante los años 1998, 1999 y 2000 (LÓPEZ et al., 2000; BIOSCA et al., 2000, 2001). Los análisis realizados durante el presente estudio han confirmado la amplia distribución de *B. quercina* en las masas forestales de las tres provincias valencianas, habiéndose identificado la bacteria en zonas en las que no había sido detectada previamente. También cabe destacar, la presencia del patógeno en otras especies del género *Quercus* de la Comunidad Valenciana, tales como *Q. faginea* y *Q. pyrenaica* en la provincia de Castellón y *Q. suber* en la provincia de Valencia, en las que el patógeno tampoco había sido detectado anteriormente. Los síntomas observados en dichas quercíneas fueron similares a los que la bacteria produce en *Q. rotundifolia*, chancros superficiales con exudados en el tronco.

Además, se ha detectado, por primera vez en la Comunidad Valenciana, la presencia de *B. nigrifluens* en nogales en Quart de Poblet y *Brenneria* sp. en chopos en Sinarcas, en la provincia de Valencia, también con chancros bacterianos con exudados abundantes en la corteza.

Caracterización fenotípica de *Brenneria* spp.

Tras la identificación preliminar de aislados bacterianos con características similares a *Brenneria* spp. (HAUBEN et al., 1998; BIOSCA et al., 2003), la identificación bioquímica y fisiológica se continuó con una selección de estos aislados mediante sistemas convencionales y miniaturizados API. En algunos casos, la identidad de los aislados se confirmó mediante el sistema Biolog y análisis de los metil-ésteres de los ácidos grasos celulares así como mediante análisis de secuenciación parcial del ADN ribosómico 16S. Así, la caracterización de una selección representativa de aislados de *Brenneria* spp., ha permitido identificar a aquellos obtenidos de quercíneas como *B. quercina*, a los de nogal como *B. nigrifluens* y a los de chopo como *Brenneria* sp. Asimismo, estos resultados han mostrado la homogeneidad fenotípica de los aislados de *B. quercina* y *B. nigrifluens* que presentaron un perfil bioquímico similar al de otras cepas españolas y de referencia. La caracterización de *Brenneria* sp., que compartió un gran

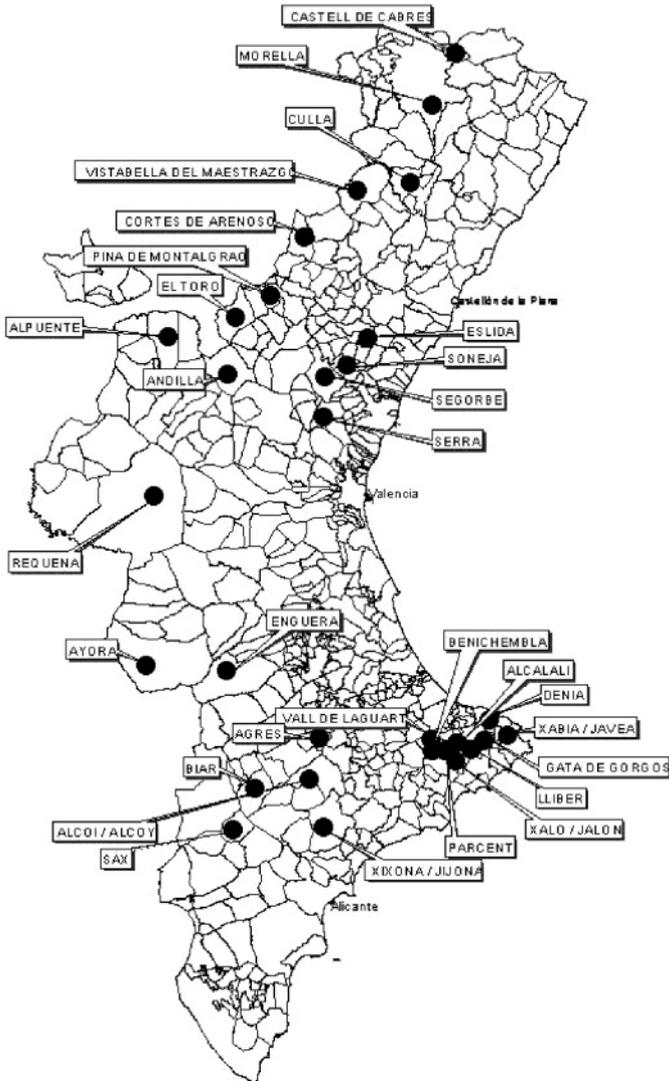


Figura 1. Mapa de localización de los aislamientos de *B. quercina* en la Comunidad Valenciana hasta marzo de 2007

número de características fenotípicas con *B. salicis*, el agente causal de chancros bacterianos en sauce (HAUBEN et al., 1998), sugiere que podría tratarse de una nueva especie aunque sería necesario realizar un estudio taxonómico completo para poder confirmarlo.

Los resultados de las inoculaciones en tronco de árboles jóvenes han puesto de manifiesto la dificultad de reproducir los chancros observa-

dos en condiciones naturales en árboles inoculados artificialmente. Sin embargo, los resultados de las inoculaciones de *B. quercina* en bellotas y de *B. quercina* y *Brenneria* sp. en hojas de chopo han confirmado su utilidad como modelo para ensayo rápidos de patogenicidad "ex vivo", presentando la ventaja de que los síntomas pueden observarse en una semana (BIOSCA et al., 2003, 2006a, 2006b). La producción de necrosis

y exudados en hojas de chopo, así como la de exudados en bellotas son indicadores del poder patógeno de las cepas de *Brenneria*, reaislándose la bacteria de las hojas y frutos inoculados.

En conclusión, los resultados de las prospecciones y análisis realizados en muestras de distintos orígenes geográficos de la Comunidad Valenciana, amplían las zonas de distribución de *B. quercina* en las tres provincias de nuestra Comunidad, y demuestran su presencia, no sólo en *Q. rotundifolia*, sino en otras especies de quercíneas como *Q. faginea*, *Q. pyrenaica* y *Q. suber*. Por último, se ha identificado, por primera vez en la Comunidad Valenciana, *B. nigri-fluens* y *Brenneria* sp. en algunas plantaciones de nogal y de chopo, respectivamente.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto GV-05/295 de la Generalitat Valenciana titulado “Bacterias fitopatógenas de especies forestales de la Comunidad Valenciana”.

BIBLIOGRAFÍA

- BIOSCA, E.G.; DONAT, V.; GONZÁLEZ, R.; PEÑALVER, J. Y LÓPEZ, M.M.; 2000. Variabilidad genética de cepas españolas de *Erwinia amylovora* y *Brenneria quercina* mediante electroforesis en campo pulsante. *En: Sociedad Española de Fitopatología* (eds.), *Actas del X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Valencia
- BIOSCA, E.G.; GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, M.J.; MARTÍN, S. Y LÓPEZ, M.M.; 2002a. Bacterias fitopatógenas del género *Brenneria* (*Erwinia*) identificadas en España. *Phytoma-España* 138: 73-77.
- BIOSCA, E.G.; GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, M.J.; SORIA, S.; MONTÓN, C.; PÉREZ-LAORGA, E. & LÓPEZ, M.M.; 2003. Isolation and characterization of *Brenneria quercina* causing bark canker and drippy nut of *Quercus* sp in Spain. *Phytopathology* 93: 485-492.
- BIOSCA, E.G.; GONZÁLEZ, R.; POZA-CARRIÓN, C.; AGUILAR, I.; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. & LÓPEZ, M.M.; 2001. Phenotypic and molecular characterization of Spanish isolates of *Brenneria quercina*. *In: Società Italiana di Patologia vegetale* (eds.), *Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology. Biodiversity in Plant Pathology*: 84-86. Taormina-Giardini Naxos, Sicilia.
- BIOSCA, E.G.; MARTÍN, S.; ÁGUILA, B.; ARAHAL, D.R.; LÓPEZ-OCAÑA, L. & LÓPEZ, M.M.; 2006a. *Brenneria* sp. causing bark cankers in Spanish poplars. *In: J. Elphinstone, S. Weller, R. Thwaites, N. Parkinson, D. Stead & G. Saddler* (eds.), *Proceedings of the 11th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*: 140. SASA, Edimburgo, U.K.
- BIOSCA, E.G.; MARTÍN, S.; ZURIAGA, P. Y LÓPEZ, M.M.; 2002b. El chancro bacteriano del chopo en España. *Phytoma-España* 139: 9.
- BIOSCA, E.G.; MARTÍN, S.; ZURIAGA, P.; MONTÓN, C.; LÓPEZ-OCAÑA, L. & LÓPEZ, M.M. 2006b. Characterization of *Brenneria* sp. from poplar cankers in Spain. *In: A. Mendez-Vilas* (ed.), *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology. Exploiting Microbes and Their Interactions*: 385-389. Wiley-VCH. Weinheim.
- GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, M.J.; BIOSCA, E.G.; LÓPEZ, F.; SANTIAGO, R. & LÓPEZ, M.M.; 2002. First Report of Bacterial Deep Bark Canker of Walnut caused by *Brenneria rubrifaciens* in Europe. *Plant Dis.* 86: 696.
- HAUBEN, L.; MOORE, E.; VAUTERIN, L.; STEENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L. & SWINGS, J.; 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 384-397.
- HILDEBRAND D.C. & SCHROTH, M.N.; 1967. A new species of *Erwinia* causing the drippy nut disease of live oaks. *Phytopathology* 57: 250-253.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RAINEY, D.E.; 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- LÓPEZ, M.M.; BIOSCA, E.G. Y GONZÁLEZ, R.; 2000. *Informe FEDER 2000*. Subproyecto de Valencia 1FD97-0911-C03-02 dentro del programa FEDER de la Unión Europea.

- LÓPEZ, M.M.; MARTÍ, R.; MORENTE, C.; ORELLANA, N.; NINOT, T. Y ALETA, N.; 1994. Bacterias fitopatógenas identificadas en nogal en España. *Inv. Agrar.* 2: 307-314.
- SERVICIO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO; 2001. “*La Seca*” en las especies mediterráneas del género *Quercus* L. Hojas divulgadoras, 2, Junta de Extremadura. Mérida.
- SORIA, S.; LÓPEZ, M.M. Y LÓPEZ, M.J.; 1997. Presencia, sintomatología y daños de *Erwinia quercina* en España y su posible relación con la seca de la encina. *Ecología* 11: 295-301.
- WILSON, E.E.; STARR, M.P. & BERGER, J.A.; 1957. Bark canker, a bacterial disease of persian walnut tree. *Phytopathology* 47: 669-663.
- WILSON, E.E.; ZEITOUN, F.M. & FREDRICKSON, D.L.; 1967. Bark phloem canker, a new disease of persian walnut trees. *Phytopathology* 57: 618-621.