

Método de detección de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) en ramas asintomáticas de *Actinidia* spp.

Método de deteção de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) em ramos assintomáticos de actinídea

Adela Abelleira*, Aitana Ares Yebra, Olga Aguín Casal y Pedro Mansilla Vázquez

Estación Fitopatológica do Areiro. Deputación Pontevedra. Subida a la Robleada s/n, 36153 Pontevedra, Espanha.
E-mail: *adela.abelleira@depo.es., author for correspondence

Received/Recebido: 2015.02.27
Accepted/Aceite: 2015.06.03

RESUMEN

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (Psa) es la responsable del chancro bacteriano del kiwi, una enfermedad que se ha extendido rápidamente en los principales países productores causando importantes pérdidas económicas. Para intentar frenar la dispersión del patógeno y controlar el desarrollo de esta enfermedad, es necesario utilizar técnicas de diagnóstico precoz. El objetivo de este estudio fue aplicar un método de detección temprana en muestras asintomáticas. Se seleccionaron 20 plantas de kiwi (15 de *Actinidia deliciosa*, 3 de *A. arguta* y 2 de *A. kolomikta*) en las que se había confirmado previamente la presencia de Psa, localizadas en Pontevedra (España). La recogida de muestras se realizó durante el reposo vegetativo, tomando de cada planta cuatro ramas del año, con diferente orientación, que se subdividieron en tres submuestras y fueron procesadas mediante lavado interno con una solución salina tamponada. Tres alícuotas de cada submuestra se analizaron por técnicas moleculares y se sembraron en medio King B. Las colonias obtenidas con morfología típica de Psa también se identificaron por técnicas moleculares. La bacteria fue detectada en el 55% de las plantas muestreadas, pero no en todas las ramas de una misma planta. En las ramas que resultaron positivas, Psa se aisló y detectó en las tres submuestras analizadas.

Palabras clave: *Actinidia deliciosa*, *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta*, chancro bacteriano del kiwi, parada vegetativa

RESUMO

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (Psa) é a bactéria causadora do cancro bacteriano da actinídea, uma doença que se expandiu rapidamente nos principais países produtores causando importantes prejuízos. Para tentar conter a propagação do agente patogénico e controlar o desenvolvimento desta doença, é necessário utilizar técnicas de diagnóstico precoce. O objetivo deste estudo foi aplicar um método de deteção precoce em amostras assintomáticas. Foram selecionadas 20 plantas de kiwi (15 de *Actinidia deliciosa*, 3 de *A. arguta* e 2 de *A. kolomikta*) em que já se tinha confirmado a presença de Psa, localizadas em Pontevedra (Espanha). A amostragem foi realizada durante o repouso vegetativo, colhendo 4 ramos do ano de cada planta, com orientações diferentes. Foram subdivididos em 3 sub-amostras e processado por lavagem interna uma solução salina tamponada. Três alíquotas de cada sub-amostra foram analisadas por meio de técnicas moleculares e colocadas em meio King B. As colónias obtidas com morfologia típica de Psa também foram identificadas por técnicas moleculares. A bactéria foi detetada em 50% das plantas amostradas, embora não em todos os ramos da mesma planta. Nos ramos positivos, a Psa foi isolada e detetada nas 3 sub-amostras analisadas.

Palavras-chave: *Actinidia deliciosa*, *Actinidia arguta*, *Actinidia kolomikta*, cancro bacteriano de kiwi, repouso vegetativo

Introducción

El chancro bacteriano del kiwi, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), se detectó por primer vez en Japón en 1989 (Takikawa *et al.*, 1989) y posteriormente en Corea (Koh *et al.*, 1994) y China (Wang *et al.*, 1992), llegando a Italia, en 1992 (Scortichini, 1994). En 2008, en este mismo país se produce un rebrote muy agresivo de la bacteria (Balestra *et al.*, 2009; Ferrante y Scortichini, 2009), apareciendo más tarde en Portugal (Balestra *et al.*, 2010), Francia (Vanneste *et al.*, 2011), España (Abelleira *et al.*, 2011; Balestra *et al.*, 2011), Suiza, Turquía (Bastas y Karakaya, 2012) y Alemania (EPPO, 2013) así como en dos de los principales países productores, Nueva Zelanda (Biosecurity New Zealand, 2011) y Chile (EPPO, 2011). Actualmente se la considera la principal causa de pérdidas económicas en el cultivo de kiwi (Vanneste *et al.*, 2012), ocasionando mermas en la producción de fruta y un aumento en la mortalidad de plantas (Scortichini *et al.*, 2012). Esta bacteria afecta principalmente a *A. deliciosa* y *A. chinensis*, las dos especies más comercializadas en todo el mundo, pero también se ha detectado en *A. arguta* y *A. kolomikta*, dos especies con un área de cultivo más reducida (Serizawa *et al.*, 1989; Ushiyama *et al.*, 1992).

Teniendo en cuenta la alta severidad y las especies susceptibles a la bacteria, la Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO) decidió incluir a *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* en su lista A2 como patógeno de cuarentena desde el año 2012, y la Comisión Europea publicó la Decisión 2012/756/EU para evitar nuevas introducciones y la propagación de la enfermedad, obligando a los países de la Unión Europea a realizar inspecciones oficiales anuales.

Los síntomas del chancro bacteriano aparecen generalmente en hojas en la primavera así como en yemas y ramas en el otoño, cuando las condiciones climatológicas son más favorables para el desarrollo de la enfermedad (bajas temperaturas, abundantes lluvias y alta humedad) (EPPO, 2012).

Debido a los daños que ocasiona y a que existen períodos en los que la planta afectada no manifiesta síntomas es necesario disponer de técnicas que permitan un diagnóstico precoz de la bacteria en plantas asintomáticas, de forma que se puedan tomar medidas en fases previas a la aparición de los síntomas y reducir la propagación de la enfermedad.

Diferentes autores han propuesto con éxito técnicas de detección precoz, para el diagnóstico de distintas bacterias, mediante el uso de bombas de vacío o de jeringas para forzar el paso de una solución a través de material leñoso (Bazzi *et al.*, 1987; Bazzi *et al.*, 1990; Scortichini, 1991; Cambra, 1997).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar un método de lavado interno de ramas para la detección de Psa en plantas asintomáticas durante la parada vegetativa que pueda ser aplicado para la detección temprana de la bacteria.

Material y Métodos

Selección del material vegetal y toma de muestras

El material vegetal se obtiene de dos plantaciones adyacentes de *Actinidia* spp. situadas en la provincia de Pontevedra (España). Una constituida por plantas de *A. deliciosa* 'Hayward' con un sistema de conducción en T y un marco de plantación de 4,5 x 5 m, y otra de menor tamaño, con plantas de diferentes variedades de *A. arguta* cv. 'Larger', 'Meader', 'Ananasnaja' y '74 -49' y de *A. kolomikta* cv. 'Krupho', 'Pavlov', 'Senty' y 'Arotna', con un sistema de conducción en pérgola y una marco de plantación 4 x 5 m. En ambas plantaciones, existía un sistema de riego con aspersores, uno por planta, y se regaban una vez al día durante los meses de primavera y verano.

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron 20 plantas asintomáticas en madera en las que se había confirmado el año anterior la presencia de Psa en hojas: 15 de *A. deliciosa* 'Hayward', 3 de *A. arguta* (una del cultivar '71-79', otra del cv 'Larger' y la tercera del cv 'Meader') y 2 de *A. kolomikta* (una del cultivar 'Krupho' y la segunda del cv 'Pavlov'). Las muestras se recogieron en el mes de Febrero del año 2014 durante la parada vegetativa de invierno. De cada planta seleccionada se tomaron cuatro ramas del año situadas en la parte superior de la misma y de diferente orientación; noroeste (NO), suroeste (SO), noreste (NE) y sureste (SE), recolectándose un total de 80 ramas: 60 de *A. deliciosa*, 12 de *A. arguta* y 8 de *A. kolomikta*.

Hasta su análisis en el laboratorio las muestras fueron conservadas a 4 °C durante un período máximo de una semana.

Procesamiento de las muestras

Para la detección de Psa, a partir del material recogido en campo, se utilizó un protocolo adaptado de Cambra (1997) y Bazzi et al (1987) que consiste en el lavado y aspiración de una solución tamponada a través de la muestra a analizar.

Cada rama recogida en campo fue cortada en tres submuestras, con al menos tres yemas cada una. Posteriormente, los dos extremos de cada submuestra fueron sellados con Parafilm® y, a continuación, se procedió a una desinfección superficial mediante lavado con agua destilada y etanol al 70%. Una vez desinfectado el material vegetal, se cortaron los dos extremos para renovar los cortes de poda, bajo condiciones de asepsia, en cabina de flujo laminar. Tras la renovación de los cortes, uno de los extremos de la rama se introdujo en un tubo Falcón® que contenía 25 mL de una solución salina tamponada con fosfato (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y NaCl, pH=7,2) y, el otro extremo, se adaptó a un tubo de silicona de diámetro apropiado, en función del grosor de la rama, asociado a una jeringa de 20 mL y se tiró del émbolo para producir, por diferencia de presión, el paso de la solución salina directamente a la jeringa (Figura 1). Para cada submuestra se utilizó una jeringa y se hicieron tres aspiraciones, para recoger un total de 3 alícuotas de 500 μ L cada una. Los lavados internos obtenidos se pasaron a tubos Eppendorf® y se conservaron a 4°C hasta su análisis.

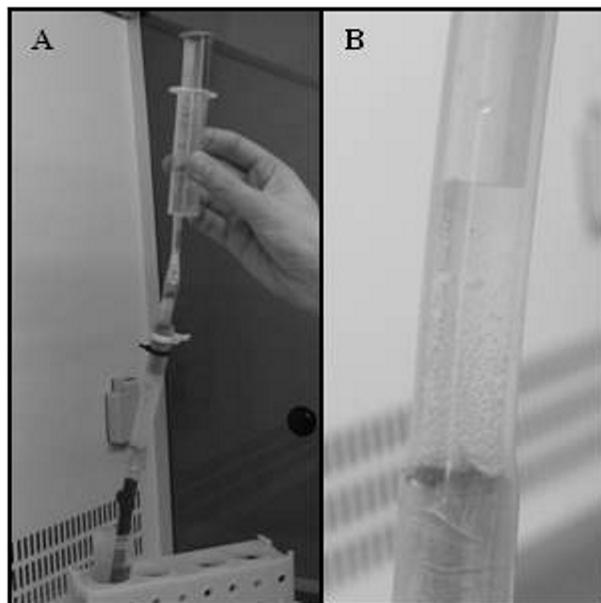


Figura 1 - A. Rama asintomática de *A. deliciosa* colocada en un tubo Falcón con la solución salina tamponada y acoplada a un tubo de silicona con la jeringa para llevar a cabo el lavado y aspiración de la solución para la detección de Psa. B. Detalle de la solución aspirada a través de la rama.

Análisis molecular

Para el análisis se utilizaron 50 μ L de cada una de las alícuotas recogidas en cada submuestra y, se purificaron con el High Pure Purification Kit (Roche Diagnostics, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación se utilizó 1 μ L del lavado interno purificado como ADN molde, y dos protocolos: PCR estándar propuesto por Rees-George *et al.* (2010) con los primers PsaF1/PsaR2 (5' TTTTGCTTTGCACACCCGATTTT 3'; 5' CACGCACCCTTCAATCAGGAT G 3') y dúplex PCR (Gallelli *et al.*, 2011) con los primers KN-F/KN-R (5' CACGATACATGGGCTTATGC 3'; 5' CTTTTCATC-CACACACTCCG 3') y AvrDdPx-F/AvrDdPx-R (5' TTTCGGTGGTAACGTTGGCA 3'; 5' TTCCGCTA-GGTGAAAAATGGG 3').

Los amplicones obtenidos por ambos métodos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 0,5 X y las bandas de ADN posteriormente se tiñeron con GelRed™ (Biotium Inc., EE.UU.) y se visualizaron bajo un transiluminador de luz ultravioleta. Los tamaños de las bandas se compararon con un marcador molecular de 100 pb.

Aislamiento en medio de cultivo

Para la obtención de colonias se sembraron 200 μ L

del lavado interno de cada una de las alícuotas obtenidas en el medio King B incubando las placas a 25°C durante 48-72 horas. Después del período de incubación, los cultivos bacterianos obtenidos eran prácticamente puros, y presentaban la morfología asociada a Psa, colonias pequeñas y de color blanco brillante (Everett *et al.*, 2011) siendo seleccionadas para su análisis molecular. Para ello se extrajo directamente el ADN por choque térmico de los aislados resuspendiéndolos en 900 µL de agua con 100 µL de NaOH 0.5 mM a 95°C durante 10 minutos. Las colonias fueron confirmadas por los protocolos moleculares anteriormente mencionados: Rees-George *et al.* (2010) y Gallelli *et al.* (2011).

Resultados y Discusión

La aplicación del método de lavado y aspiración por jeringa de una solución salina tamponada a través de material vegetal leñoso asintomático, permitió la detección de Psa en las tres especies del género *Actinidia* analizadas. En un 55% de las plantas se confirmó la presencia de Psa; 6 plantas de *A. deliciosa* Hayward, 3 en *A. arguta* (74-49, Larger y Meader) y 2 en *A. kolomikta* (Krupho y Pavlov). De la misma manera Cambra (1997) utilizando este método obtuvo buenos rendimientos para la extracción de *Xylophilus ampelinus* en sarmientos de vid.

La detección de la bacteria en las ramas analizadas por especie no superó el 40%, siendo en *A. arguta* donde se obtuvo el mayor porcentaje con un 33%, seguido por un 25% para *A. kolomikta* y un 22% para *A. deliciosa* (Tabla 1).

Tabla 1 - Número de plantas y ramas con presencia de Psa en *Actinidia deliciosa*, *Actinidia arguta* y *Actinidia kolomikta*, por técnicas moleculares-TM (Rees-George *et al.*, 2010; Gallelli *et al.*, 2011) y aislamiento.

Especie	Número de plantas positivas/Número total de plantas	Número ramas analizadas	Ramas positivas/Total TM	Ramas positivas/Total Aislamiento
<i>A. deliciosa</i>	6/15	60	13/60	13/60
<i>A. arguta</i>	3/3	12	4/12	4/12
<i>A. kolomikta</i>	2/2	8	2/8	2/8
Total	11/20	80	19/80	19/80

Se ha observado una distribución homogénea de Psa a lo largo de las ramas analizadas ya que en todas las muestras en las que se detectó, la bacteria apareció en todas las submuestras y alícuotas correspondientes.

La bacteria, también fue encontrada en todas las orientaciones (NO, NE, SO y SE), excepto en plantas de *A. kolomikta* que sólo fue observada en las orientaciones NE y SE (Tabla 2).

Tabla 2 - Número de ramas con presencia de Psa presentes en *Actinidia deliciosa*, *Actinidia arguta* y *Actinidia kolomikta* en función de la orientación: noroeste (NO), noreste (NE), suroeste (SO) y sureste (SE) por técnicas moleculares-TM (Rees-George *et al.*, 2010; Gallelli *et al.*, 2011) y aislamiento.

Especie	Orientación	Ramas	Ramas
		Positivas/Total TM	Positivas/Total Aislamiento
<i>A. deliciosa</i>	NO	2/15	2/15
	NE	3/15	3/15
	SO	4/15	4/15
	SE	4/15	4/15
<i>A. arguta</i>	NO	1/3	1/3
	NE	1/3	1/3
	SO	1/3	1/3
	SE	1/3	1/3
<i>A. kolomikta</i>	NO	0/2	0/2
	NE	1/2	1/2
	SO	0/2	0/2
	SE	1/2	1/2

La siembra del lavado interno de las alícuotas en medio King B dio lugar a crecimientos puros de colonias de Psa, no detectándose la presencia de otras bacterias, favoreciendo y simplificando la detección e identificación de *P. syringae* pv *actinidiae* a partir de colonias.

No existieron diferencias de resultados en función de los métodos empleados, técnicas moleculares y aislamiento, obteniéndose por ambos el mismo número de ramas positivas, es decir, que siempre que se detectaba la bacteria mediante protocolos mole-

culares se obtenía el aislado bacteriano.

De la misma manera tampoco se han registrado diferencias entre los métodos moleculares utilizados (PCR estándar y dúplex PCR). En la figuras 2 y 3 se muestran geles de agarosa al 2% con los fragmentos de ADN amplificados de 15 alícuotas analizadas de ramas asintomáticas de *Actinidia deliciosa* donde se observa la correspondencia de los resultados de Psa según Rees- George *et al.* (2010) y Galleli *et al.* (2011).

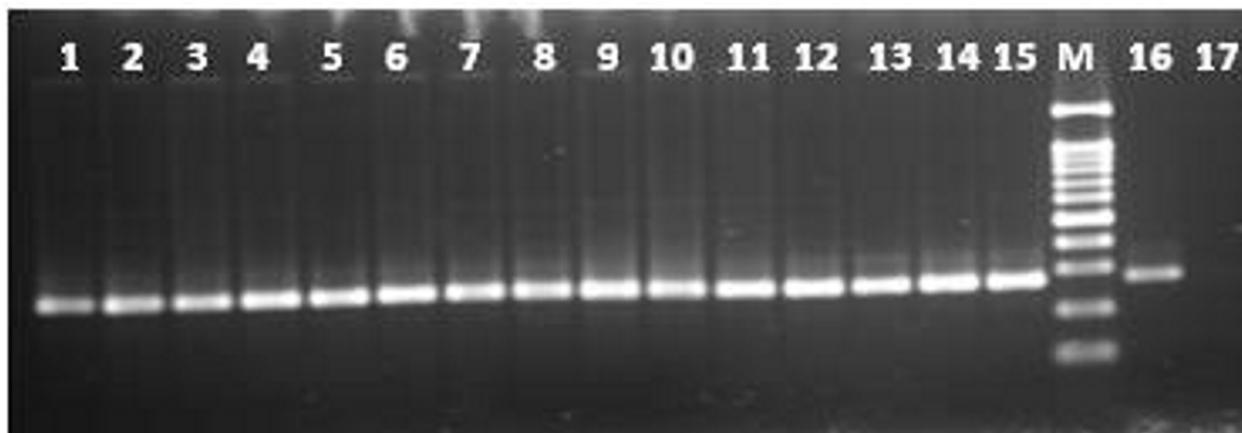


Figura 2 - Gel de agarosa al 2% mostrando los fragmentos de ADN amplificados con el protocolo de Rees-George *et al.* (2010). Calles 1-15: alícuotas analizadas de ramas de *Actinidia deliciosa*, Calle 16: control positivo, Calle 17: control negativo y M: Plus Blue DNA Ladder Marker 100bp.

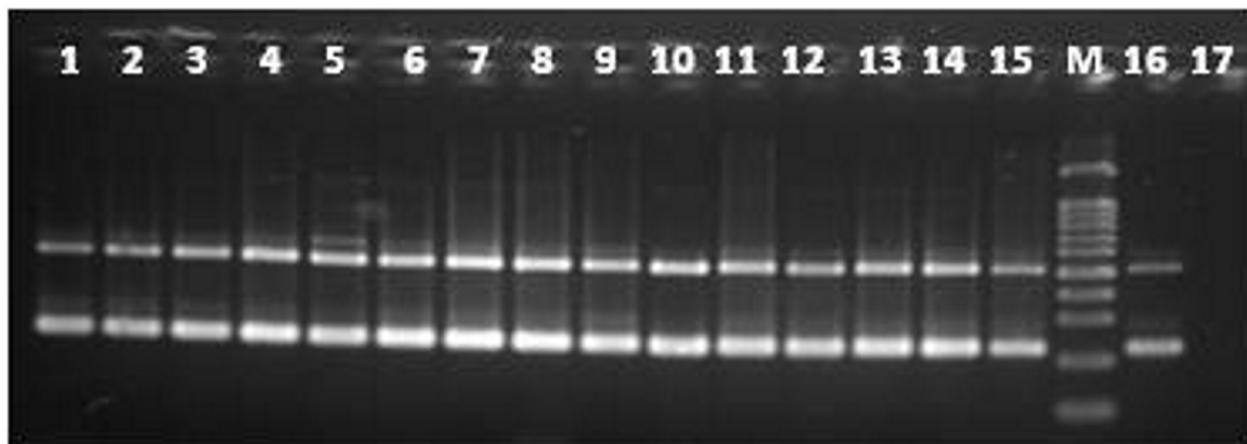


Figura 3 - Gel de agarosa al 2% mostrando los fragmentos de ADN amplificados con el protocolo de Gallelli et al., 2011. Calles 1-15: alícuotas analizadas de ramas de *Actinidia deliciosa*, Calle 16: control positivo, Calle 17: control negativo y M: Plues Blue DNA Ladder Marker 100bp

Conclusiones

Aunque con el método de detección de Psa en ramas asintomáticas mediante el lavado y aspiración de una solución salina tamponada se ha obtenido un porcentaje de éxito superior al 50%, teniendo en cuenta que en el 100% de las plantas analizadas se había previamente diagnosticado la presencia de Psa, nos indica que es necesario llevar a cabo más investigaciones sobre época de muestreo, tratamiento previo de la muestra, etc., para optimizar la detección de la bacteria, ya que se trata de un método rápido, fiable, sencillo y poco agresivo para el análisis de muestras asintomáticas enfocado principalmente a material de propagación.

Referencias bibliográficas

- Abelleira, A.; Peñalver, J.; Aguin, O. y Mansilla, P. (2011) - First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain. *Plant Disease*, vol. 95, n. 12, p. 1593.
- Balestra, G.; Mazzaglia, A.; Quattrucci, A.; Renzi, M. y Rossetti, A. (2009) - Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Disease Notes*, vol. 4, p. 34-36.
- Balestra, G.; Renzi, M. y Mazzaglia, A. (2010) - First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae* in Portugal. *New Disease Reports*, vol. 22 , 10 [doi:10.5197/j. 2044-0588.2010.022.010].
- Bastas, K.; y Karakaya, A. (2012). - First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. *Plant Disease*, vol. 96, n. 3, p.452.
- Bazzi, C.; Piazza, C. y Burr T.S. (1987) - Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, vol. 17, n. 1, p. 105-112.
- Bazzi, C.; Stefani, E.; Padovan, F. y Mazzuchi, U. (1990) - *Xylella fastidiosa* Wells et al. is not associated with "mal dell'esca" of grapevine in the Emilia-Romagna Region. *Phytopathological Mediterranean*, vol. 29, p. 56-58.
- Biosecurity New Zealand (2010) - MAF confirms positive test for kiwifruit vine bacteria Psa. MAF Biosecurity New Zealand Online. <http://www.biosecurity.govt.nz/media/8-11-10/positive-test-kiwifruit-vine-bacteria-Psa> (accessed on 18 July 2011).
- Cambra, A.M. (1997) - La necrosis bacteriana de la vid, causada por *Xylophilus ampelinus*. Detección serológica, distribución en Aragón y sensibilidad varietal. *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia. 209 p.
- Commission Implementing Decision (2012/756/EU) of 5 December (2012) - As regards measures to prevent the introduction into and the spread within the Union of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Takikawa, Serizawa, Ichikawa, Tsuyumu and Goto.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2011) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Chile. EPPO Reporting Service 2011/055 2011/055. <http://archives.eppo.org/EPPORreporting/2011/Rse-1103.pdf> [accessed on 8 September 2013].

- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2012). - Revision of EPPO Standard PM 1/2 EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. Standards approved by EPPO Council in 2012-09.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2013) - First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Germany, EPPO Reporting Service 2013/185 <http://archives.eppo.int/EPPOreporting/2013/Rse-1309.pdf> [accessed on 29 November 2013].
- Everett, K. R.; Taylor, R.K.; Romberg, M.K.; Rees-George, J.; Fullerton, R.A.; Vanneste, J.L. y Manning, M.A. (2011) - First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australasian Plant Disease*, vol. 6, p. 67-71.
- Ferrante, P. y Scortichini, M. (2009) - Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellowkiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *Journal of Phytopathology*, vol. 157, n. 11-12, p. 768-770.
- Gallelli, A.; L'Aurora, A. y Loreti, S. (2011) - Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* developing diagnostic protocols. *Journal Plant Pathology*, vol. 93, n. 2, p. 425-435.
- Koh, Y.; Cha, B.; Chung, H. y Lee, D. (1994) - Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit. *Korean Journal of Plant Pathology*, vol. 10, p.68-72.
- Rees-George, J.; Vanneste, J.L.; Cornish, D. A.; Pushparajah, I.P.S.; Yu, J.; Templeton, M.D. y Everett, K.R. (2010) - Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology*, vol. 59, p. 453-464.
- Scortichini, M. (1991) - Aspetti sintomatologici, diagnostici, e di prevenzione della "malattia di Pierce". *L'Informatore Agrario*, vol. 20, p. 73-79.
- Scortichini, M. (1994) - Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology*, vol. 43, p. 1035-1038.
- Scortichini, M.; Marcelletti, S.; Ferrante, P.; Petriccione, M. y Firrao, G. (2012) - *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging multi-faceted, pandemic pathogen. *Molecular Plant Pathology*, vol. 13, p. 631-640.
- Serizawa, S.; Ichikawa, T.; Takikawa, Y.; Tsuyumu, S. y Goto, M. (1989) - Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan; description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. *Annual Phytopathology. Society of Japan*, vol. 55, p. 427-436.
- Takikawa, Y.; Serizawa, S.; Ichikawa, T.; Tsuyumu, S. y Goto, M. (1989) - *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, vol. 55, p. 437-444.
- Ushiyama, K.; Suyama, K.; Kita, N.; Aono, N.; Ogasawa, J. y Fujii, H. (1992) - Isolation of kiwifruit canker Pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from Leaf Spot of Tara Vine (*Actinidia arguta* Planch.). *Annals Phytopathology Society of Japan*, vol. 58, p. 476-479.
- Vanneste, J.; Poliakoff, F.; Audusseau, C.; Cornish, D.; Paillard, S. y Rivoal, C. (2011) - First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of Kiwifruit in France. *Plant Disease*, vol. 95, n. 10, p. 1311.
- Vanneste, J.L.; Moffat, B.J. y Oldham, J.M. (2012) - Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on *Cryptomeria japonica*, a non-host plant used as shelter belts in kiwifruit orchards. *New Zealand Plant Protection*, vol. 65, p. 1-7.