

DISTRIBUCIÓ, DINÀMICA POBLACIONAL I CARACTERITZACIÓ DE *Pseudomonas syringae*, FORMADORS DE NUCLIS DE GEL I FITOPATÒGENS DE *Pyrus communis* A LES COMARQUES GIRONINES

E. Montesinos¹ P. Vilardell^{1,2}, E. García¹ i E. Recas¹

¹ Departament de Producció vegetal. Secció de Girona. Escola Universitària Politècnica de Girona (UPC). Av. Lluís Santaló, s/n. 17002-Girona.

² Associació de Defensa Vegetal de Productors de Pera de Girona. Canet de la Tallada. Girona.

RESUM

Unes tres-centes mostres de diferents òrgans de pereres procedents de 35 camps de cultiu de la província de Girona van ésser analitzades durant l'any 1987 per detectar-hi la presència de *Pseudomonas syringae*. Els nivells poblacionals depenien en gran mesura de les condicions climàtiques. La dinàmica poblacional presentà dos períodes de màxim creixement durant les èpoques humides de primavera i de tardor, i va decréixer els mesos més secs d'estiu. Unes cent soques de *Pseudomonas* van ésser aïllades, representant en alguns casos fins el 90% de la flora bacteriana total. El 39% de les soques pertanyien a *P. syringae*. D'entre les soques fitopatògenes el 78% eren *P. syringae*, mentre que les restants pertanyien a *P. fluorescens*, a *P. viridiflava* i a formes intermèdies. L'activitat formadora de nuclis de gel (INA) era exclusivament associada amb *P. syringae* donat que entre les soques INA el 95% eren *P. syringae*. Finalment, existeix una associació entre la capacitat de formar nuclis de congelació i la fitopatogenicitat ja que el 39% de les soques de *P. syringae* presenten ambdós caràcters.

RESUMEN

Durante el año 1987 se han analizado unas trescientas muestras de diferentes órganos procedentes de perales de 35 campos de cultivo de la provincia de Gerona. Los niveles poblacionales de *Pseudomonas syringae* dependían de las condiciones climáticas, siendo mayores en la zona de la Selva, con un clima mediterráneo húmedo. La dinámica poblacional presenta dos periodos de máximo crecimiento durante las épocas húmedas de primavera y de otoño, y uno de mínimo, en la época seca durante el verano. Se han aislado unas cien cepas de *Pseudomonas*, que representaban en algunos casos hasta el 90% de la flora bacteriana total del peral. El 39% de las cepas pertenecían a *P. syringae*. Entre las cepas fitopatógenas, el 78% eran *P. syringae*, mientras que las restantes pertenecían a *P. fluorescens*, a *P. viridiflava* y a formas intermedias. La actividad formadora de núcleos de congelación estaba asociada exclusivamente a *P. syringae* dado que entre las cepas INA, el 95% eran *P. syringae*. Finalmente existe una asociación entre la capacidad para formar núcleos de congelación y la fitopatogenicidad, puesto que el 39% de las cepas de *P. syringae* presentaban ambos caracteres.

ABSTRACT

Up to 300 samples of different organs, were taken at random from 35 pear tree orchards of Girona during 1987 and analyzed for the presence of *Pseudomonas syringae*. Population densities were strongly dependent on climatic conditions. Population dynamics showed two maximum growth periods during the wet spring and autumn, and dropped during drier summer months. Up to 100 strains of *Pseudomonas* have been isolated, they accounted for up to 90% of total bacteria in some samples of infected necrotic floral buds. A 39% of strains pertained to *P. syringae*. Among phytopathogenic strains 78% were *P. syringae* and the remaining pertained to *P. fluorescens*, *P. viridiflava* and intermediate forms. Ice nucleation activity (INA) was mainly associated with *P. syringae* since among INA strains 95% were *P. syringae*. Finally there was a relationship between the capacity for inducing frost injury and phytopathogenicity since a 39% of *P. syringae* were both INA and phytopathogenic.

Key words: *Pseudomonas syringae*, INA activity, phytopathogenicity.

INTRODUCCIÓ

Un dels efectes climàtics que poden afectar la viabilitat de les plantes és la gelada. Els efectes en les parts aèries del vegetal depenen del seu estat de desenvolupament, de la humitat ambiental, de la baixada de temperatura i de la durada del procés. Sota el punt de vista purament físic-químic l'aigua pura (sense partícules ni sals) en petits volums (gotícules de condensació) i en repòs, congela al voltant de -40 °C (Vali, 1971). Si a la pràctica aquest procés es produeix a temperatures més elevades, és degut a la presència de nuclis de congelació, com ara diverses partícules de pols o bé substàncies químiques. En condicions de laboratori i en molts vegetals la congelació i el dany per gelades tenen lloc a temperatures per sota de -10 °C (Luisetti & Paulin, 1972).

Existeixen bacteris que formen part de la flora epífita (no són invasius en condicions normals) d'una àmplia varietat d'espècies vegetals i a diferents àrees geogràfiques, que actuen com a partícules que catalitzen la formació de nuclis de gel (Gross et al. 1984; Lindow, 1978). La majoria dels bacteris amb activitat de formació de nuclis de gel (activitat INA) pertanyen a *Pseudomonas syringae* o a *Erwinia herbicola*, encara que s'han descrit alguns casos en *Pseudomonas viridiflava* i *Pseudomonas fluorescens*. La congelació dels vegetals on es troben pot donar-se a temperatures de tant sols -1 °C.

La formació de gel produeix danys macroscòpics i microlesions als teixits protectors de la planta. Aquests danys depenen directament de la concentració de bacteris, de la seva activitat com a formadors de nuclis de gel i del temps d'exposició a la temperatura baixa. En estudis realitzats amb mostres naturals s'ha observat que es necessiten al voltant de 10^2 a 10^7 bacteris INA per formar un nucli de congelació dependent de la soca i de les condicions de creixement. La probabilitat de danys és afavorida per la humitat relativa elevada (boires i rosades), per la temperatura baixa i, especialment, per les gelades tardanes

durant els mesos d'abril i de maig, que coincideixen amb el període d'inici de la floració d'alguns arbres fruiters (especialment perers).

S'ha demostrat que temperatures de l'ordre de -2°C aplicades a inflorescències de perer impregnades amb *P. syringae* provoquen necrosis als esmentats òrgans, mentre que aquests símptomes no són observables en flors no tractades amb *Pseudomonas* (Panagopoulos & Grosse, 1968).

L'acció negativa d'aquests bacteris es desenvolupa mitjançant tres vies d'actuació: 1) Afavorint la formació de cristalls de gel a temperatures anormalment elevades i produint danys físics macro o microscòpics. 2) Infectant posteriorment els teixits afectats i donant lloc a una acció patogènica convencional hoste-patògen (toxines, etc.). 3) Augmentant la sensibilitat de la planta a d'altres malalties fúngiques, bacterianes i fins i tot víriques (Gross & Cody, 1985; Asada et al., 1982; Gross et al., 1984).

Diversos autors han observat una clara relació directa entre la presència d'elevades poblacions de *P. syringae* amb una alta activitat formadora de nuclis de congelació (aproximadament més de 10^5 ufc/g pes fresc) i els danys per gelades tardanes en arbres fruiters als Estats Units, a Washington D.C., a Oregon i a Wisconsin (Gross et al., 1983; Hirano et al., 1985), a les valls del Maine, del Loira i del Roine a França (Luisetti & Paulin, 1972), a la península de Catània, a Itàlia (Alliata et al., 1985), a Israel (Yankofsky et al., 1981) i al Japó (Makino, 1982), entre d'altres llocs.

Actualment a Catalunya, només a les comarques de Girona la situació ha esdevingut greu respecte d'aquest problema. Si bé l'extensió de perers és de tant sols unes quatre-centes hectàrees, estimacions aproximades indiquen que la bacteriosi està en expansió i cada vegada produeix majors pèrdues econòmiques (especialment a les comarques de la Selva i del Gironès). Els primers efectes es van detectar a la primavera de 1977 (Rovira, 1981) com a greus problemes en algunes plantacions de varietats de perers més susceptibles (Passe Crassane, Conference, De Comice, Grand Champion). L'afecció es caracteritza per una necrosi a l'aixella dels brots durant la tardor-hivern, que acaba assecant-los. La floració es retarda i moltes flors infectades s'assequen o són afectades per les gelades tardanes.

MATERIAL I MÈTODES

Presa de mostres

La nostra experiència en camps de perers afectats per *Pseudomonas syringae* a la província de Girona indica que la distribució dels arbres afectats en els camps i del òrgans afectats als arbres no és «normal» sinó que és del tipus «contagiós» (lognormal). Això ha estat ressaltat per d'altres autors (Hirano et al., 1982). En conseqüència es va prendre una quantitat suficient de material de cada arbre, fent mostratge de diversos arbres a l'atzar per cada filera (mit-

jançant nombres aleatoris), la qual cosa constituïa una mostra del camp (entre 10 i 30 g de brots, borrons i inflorescències). De cada camp es prenen mostres de diverses fileres escollides a l'atzar.

Tractament de les mostres

Donat que *Pseudomonas syringae* forma part de la flora bacteriana epifítica (superficial) dels arbres i que és adsorbida a la seva superfície mitjançant mucopolisacàrids, cal efectuar un rentat per fer una extracció completa de l'esmentada població bacteriana. Altres mètodes infraestimen o seleccionen determinades poblacions. La nostra experiència indica que *Pseudomonas syringae* està situada preferentment a la zona interna dels borrons, als pistils (zona basal) i al receptacle de les flors afectades. En conseqüència els borrons varen ésser seccionats convenientment amb un bisturí estèril. El material així processat era homogeneïtzat amb 100 ml d'aigua peptonada estèril i agitat a 200 rpm durant quinze minuts. La majoria d'autors recomanen aquest mètode per la lleugera acció detergent de l'aigua peptonada i demostren una eficiència d'extracció de més del 95% de la flora epifítica total (Gross et al., 1983). S'ha demostrat també que no existeixen diferències degudes a creixement en les dues hores següents a l'extracció.

Sembra i aïllament de la flora bacteriana

Immediatament després de l'extracció es realitzaren una sèrie de dilucions en solució de Ringer 1/4 estèril (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4}). Se sembraren 0,1 ml de cada dilució en Agar B de King (King, 1954) a fi d'obtenir colònies aïllades. Les plaques s'incubaren a 25 °C durant tres dies. Les colònies de *Pseudomonas* desenvolupen en aquest medi una producció de pigments difusibles que donen fluorescència groga o blavosa en presència de llum ultraviolada llunyana. L'existència de colònies fluorescents i oxidasa negatives indica la presència de *Pseudomonas syringae* o *Pseudomonas viridiflava*, o de totes dues alhora. Un dels grans avantatges d'aquest mètode és que permet quantificar la seva concentració. La confirmació posterior de la presència de *Pseudomonas syringae* es va efectuar mitjançant les proves addicionals d'activitat de formació de nuclis de congelació (INA), producció de levans en medis contenint sacarosa i la prova de producció d'argininadihidrolasa (Bergey's Manual for Determinative Bacteriology, 1985).

Assaigs d'activitat formadora de nuclis de congelació

Una de les proves més conclouents d'aquest estudi és la presència d'activitat INA en les mostres i la detecció de colònies amb activitat INA en els aïllats en Agar B de King. El 50% de les soques de *Pseudomonas syringae* aïllades de la

flora dels perers presenta activitat INA mentre que solament algunes soques d'*Erwinia herbicola*, de *Pseudomonas fluorescens* i de *Pseudomonas viridiflava* la presenten. L'assaig d'activitat INA es va efectuar segons el mètode de Vali (1971), modificat per Lindow (1982).

Per a l'assaig directe en els rentats de les mostres es realitzà un banc de dilucions en solució Ringer (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4}). Els tubs eren posteriorment submergits durant deu minuts en un bany salí mantingut a $-3,5$ °C i es prenia nota dels que s'havien congelat. Es van realitzar uns controls, contenant només solució de Ringer o aigua peptonada i els resultats sempre van ser negatius. L'invers de la dilució més alta que donava positiu correspon al títol en unitats de nuclis de congelació per mililitre de rentat. Coneixent el pes total del material extret es pot calcular la concentració d'UFNC per gram de pes fresc.

Per a l'assaig d'activitat INA en colònies aïllades en medi King, aquestes es resuspenien en 1 ml de Ringer. En una placa de Petri es dipositaven 10 gotes (50 µl) de Ringer (control) i 10 de la suspensió bacteriana. A continuació la placa es mantenia tres minuts a $-3,5$ °C i s'anotava el nombre de gotes congelades respecte del control.

Assaigs de fitopatogenicitat

Es van realitzar utilitzant fruits immadurs (de cins a sis setmanes) de la varietat *Passe Crassane*. Els fruits eren desinfectats prèviament amb una solució d'hipoclorit sòdic al 0,2% durant deu minuts i rentats amb aigua corrent i aigua destil·lada. Posteriorment assecats sota corrent d'aire a la vitrina estèril i inoculats per punció amb una agulla emmanegada impregnada amb una colònia de bacteris crescuts durant vint-i-cuatro a quaranta-vuit hores en medi King B. Els fruits inoculats s'incubaven a 25 °C en un recipient de plàstic saturat d'humitat. S'observaven les lesions al cap de tres i cinc dies. Les lesions positives corresponen a necrosis superficials lleugerament còncaves, d'aspecte negre o marronós que envaeixen totalment o parcialment el fruit.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Distribució

La zona objecte d'aquest estudi està localitzada al nord-est de la península ibèrica, a la província de Girona. Els diagrames ombrotèrmics (representació de les temperatures i pluviositats mitjanes mensuals) indiquen condicions climàtiques mediterrànies. Però poden distingir-s'hi dues zones clarament diferenciades, l'Empordà, fortament influenciat pels efectes de la costa i per la tramuntana, i el Gironès i la Selva, incloses en una vall determinada per les serralades Litoral i Pre-litoral. Com es pot observar, el Gironès i la Selva gau-

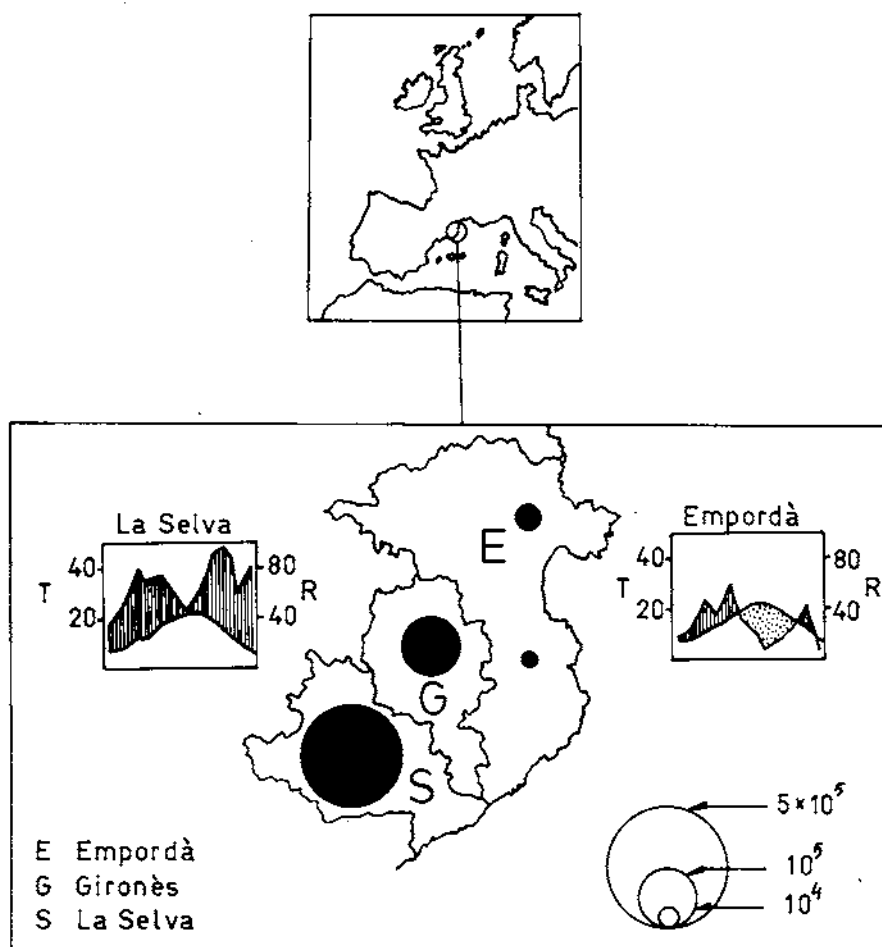


Figura 1. Mitjana poblacional dels nivells de *Pseudomonas F + Ox*- en ufc/g p.f. en 300 mostres de borrons florals de 35 camps de conreu de perera de la província de Girona durant l'any 1987. S'hi indiquen els valors per a les comarques de la Selva, el Gironès i l'Empordà, en relació amb les condicions climàtiques determinades pels diagrames ombrotèrmics.

deixen d'un clima mediterrani humit, especialment en l'últim cas. Els resultats de les anàlisis d'unes tres-centes mostres, principalment de borrons i de flors provinents de 30 camps, indiquen que la densitat poblacional mitjana de *Pseudomonas F + Ox*- durant l'any 1987 fou entre deu i cent vegades superior a les comarques de la Selva i el Gironès que a l'Empordà (vegeu Fig. 1). Aquests resultats suggereixen una gran dependència de *Pseudomonas* respecte a la humitat ambiental, que vindria també accentuada pel fet que es tracta de bacteris epífits que viuen damunt les superfícies vegetals. D'altra banda, els esmentats resultats concorden molt amb el fet que a les comarques de la Selva i del

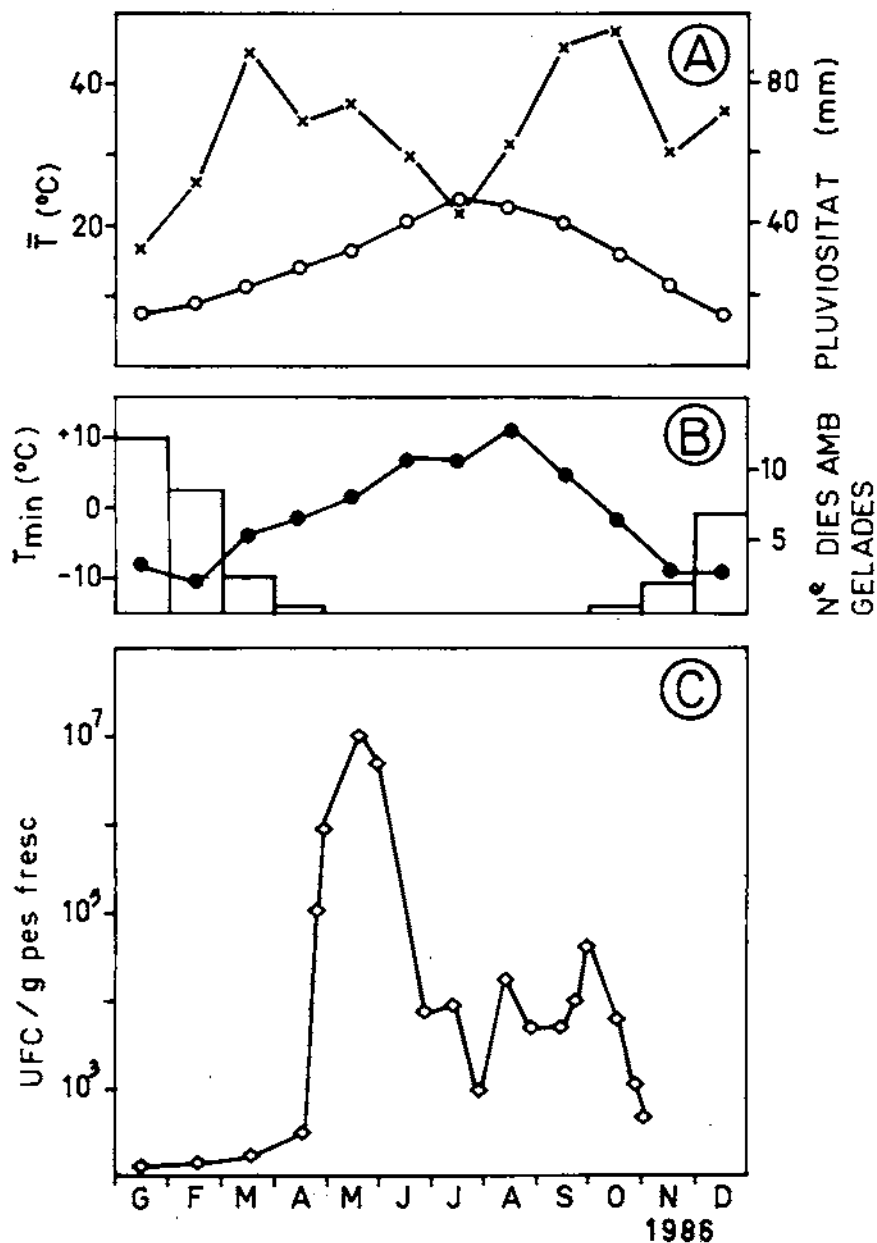


Figura 2. Dinàmica poblacional de *Pseudomonas F + OX* en un camp de pereres de la varietat *Passé Crassane* a la comarca de la Selva (C), en relació amb la temperatura mitjana mensual i la pluviositat (A). S'hi indiquen el nombre de dies amb gelades i la temperatura mínima mensual (B).

Gironès els danys per gelades tardanes suaus (març-abril) i el percentatge d'arbres amb la simptomatologia típica de *Pseudomonas* són molt superiors que a l'Empordà.

Quant als tipus de fruiters on poden trobar-se *Pseudomonas*, podem dir que això ha succeït en tots els examinats. A la Taula 1 es pot observar com són presents en mostres de borrons florals i flors de diferents fruiters afectats per danys per gelada tardana (primeria de maig de 1987). Ara bé, sembla existir una especificitat d'hoste molt restringida, car soques aïllades de pomera, cirerer, albercoquer i presseguer no són fitopatògens de perera. D'altra banda les activitats INA més altes es troben sempre en mostres de perera.

Dinàmica poblacional durant un cicle anual

Es van observar dos períodes de creixement: el primer durant la primavera i el segon coincidint amb el final de l'estiu i el principi de la tardor. Durant la primavera *Pseudomonas* estava localitzat majoritàriament als borrons florals i a les flors, mentre que a la tardor ho estava a les fulles. El temps de duplicació durant la primavera va ésser d'un dia. Això significa que inòculs de l'ordre de 1000 ufc/g p.f. sols necessiten 10 dies per assolir les concentracions màximes trobades de 10^6 ufc/g p.f. Les poblacions van decreïxer fortament a mitjan estiu coincidint amb el període més sec del cicle anual. Com es pot observar a la Figura 2, aquest comportament es veu molt determinat per la pluviositat i la temperatura; els màxims coincideixen amb temperatures mitjanes suaus (al voltant de 10-15 °C) i amb pluviositats elevades (al voltant de 80 mm). Ambdós períodes de màxim creixement també coincideixen clarament amb les gelades tardanes i primerenques i, a causa de la seva activitat INA, sens dubte potencien els danys per gelada en òrgans sensibles, com ara borrons florals i corimbos florals.

Característiques de les soques aïllades

Al voltant de cent soques de *Pseudomonas* van ésser aïllades a partir de mostres de diferents òrgans, varietats, camps i zones geogràfiques, durant l'any 1987. Els resultats s'indiquen a la Figura 3. El percentatge de *Pseudomonas* respecte de la flora bacteriana total arribava fins al 90% en mostres fortament infectades. Un aspecte important observat durant la caracterització mitjançant les proves convencionals de fluorescència, levan, argininadihidrolasa, oxidasa, activitat INA i fitopatogenicitat va ésser que més del 90% de les colònies fluorescents i oxidasa negatives corresponien a *P. syringae*. Això va permetre d'estudiar l'evolució en mostres naturals i fer recomptes de forma senzilla i rutinària, tenint en compte solament ambdues proves.

Un 39% de les soques corresponia a *P. syringae*, 38% a *P. fluorescens*, 8% a *P. viridiflava*, i la resta eren formes intermèdies. D'entre les soques fitopatò-

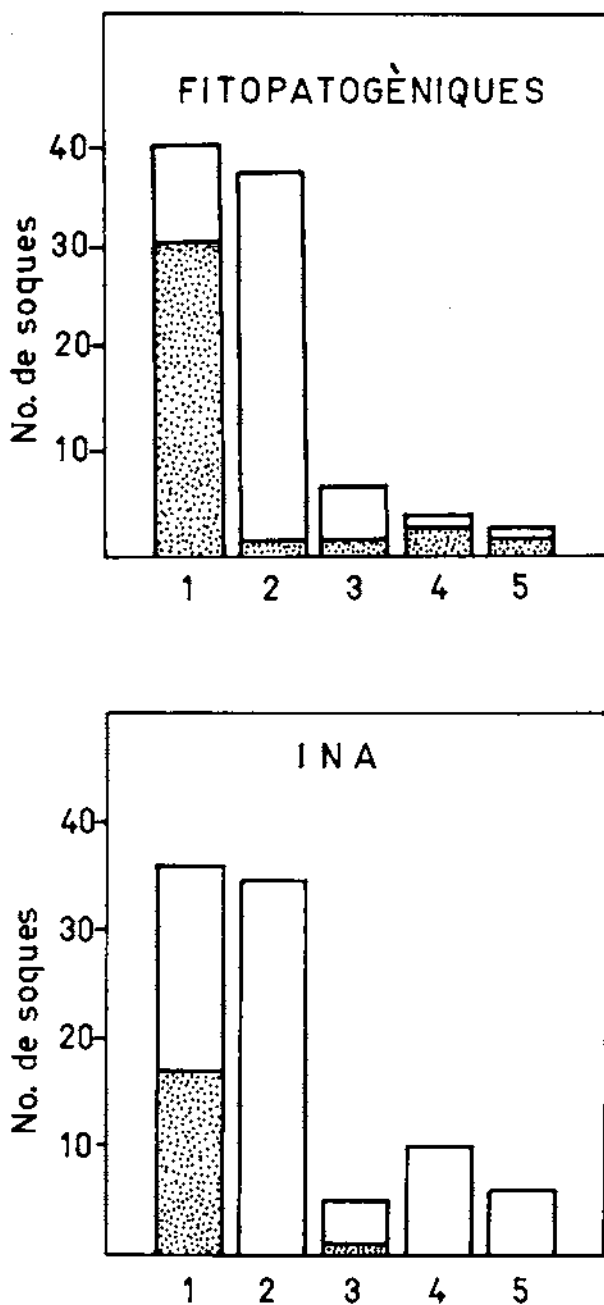


Figura 3. Freqüència de fitopatogenicitat (A) i activitat INA (B) a les diferents espècies de *Pseudomonas* aïllades de pereres a la província de Girona. 1) *P. syringae*; 2) *P. fluorescens*; 3) *P. viridiflava*; 4 i 5) altres *Pseudomonas*.

genes el 78% pertanyia a *P. syringae*, el 5% a *P. fluorescens*, el 4% a *P. viridiflava* i la resta, no identificades. D'entre les soques amb activitat INA, el 95% era *P. syringae* i el 5% *P. viridiflava*. Un 70% de *P. syringae* eren fitopatògenes i un 40% INA. Sols un 39% de *P. syringae* eren a la vegada INA i fitopatògenes. Això indicà que amb una gran probabilitat la potenciació de danys per gelada pot ésser un mecanisme de penetració i d'infecció dels teixits de l'hoste.

Taula 1. Mitjanes poblacionals de *Pseudomonas* F + Ox-, activitat formadora de nuclis de congelació i fitopatogenicitat en mostres de borrons florals i en flors procedents d'arbres fruiters amb símptomes de danys per gelada durant la primera setmana de maig de 1987.

Arbre	<i>Pseudomonas</i> F + Ox- (ufc/g p.f.)	Nuclis de gel per g p.f.a. -3 °C	ufc per nucli de gel a -3 °C	Fitopatogenicitat ^a
Pomera	$2,8 \times 10^4$	71	$3,9 \times 10^4$	-
Cirerer	$3,0 \times 10^6$	6	$5,0 \times 10^5$	-
Albercoquer	$2,1 \times 10^6$	7	$3,0 \times 10^5$	-
Presseguer	$1,3 \times 10^6$	106	$1,2 \times 10^4$	-
Perera (Lleida)	$2,6 \times 10^6$	2151	$8,2 \times 10^2$	+
Perera (Girona)	$1,3 \times 10^6$	444	$2,9 \times 10^3$	+

^a Sobre fruits immadurs de la varietat *Passe Crassane*.

Agraïments

Aquest treball és subvencionat en part per un ajut a la Recerca aplicada del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya per mitjà del Servei de Protecció dels Vegetals de Girona i de l'Associació de Defensa Vegetal de Productors de Pera de Girona. Agraïm la col·laboració dels membres de l'Associació de Defensa Vegetal de Productors de Pera de Girona i de la Fundació Mas Badia.

Bibliografia

- GROSS, D.C., CODY, Y.S., PROEBSTING, E.L., RADAMAKER, G.K. & SPOTTS, R.A. (1984). Ecotypes and pathogenicity of ice-nucleation active *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit tree orchards. *Phytopathology*, 74: 241-248.
- GROSS, D.C. & CODY, Y.S. (1985). Mechanisms of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. *Can. J. Microbiol.*, 31: 403-410.
- HIRANO, S.S., BAKER, L.S. & UPPER, C.D. (1985). The nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury. *Plant. Physiol.*, 77: 259-265.
- KING, E.O., WARD, M.K., & RANEY, D.E., (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 301-307.
- LINDOW, S.E., ARNY, D.C., & UPPER, C.D. (1978). Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice nucleation active bacteria. *Plant Disease*, 67: 327-333.
- (1978). Distribution of ice nucleation active bacteria on plants in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 831-838.

- LUISETTI, J. & PAULIN, J.P. (1972). Études sur les bactérioses des arbres fruitiers. III. Recherche du *Pseudomonas syringae* (van Hall) a la surface des organes aériens du poirier et étude de ses variations quantitatives. *Ann. Phytopathol.*, 4: 215-227.
- MAKI, L.R., GALYON, E.L., CHANG-CHIEN, M. & CALDWELL, D.R. (1974). Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol.*, 28: 456-459.
- ORSER, C.S., STASKWIZ, J.B., PANAPOULOS, N.J., DAHLBECK, D. & LINDOW, S.E. (1982). Cloning and expression of ice nucleation genes from *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola* in *Escherichia coli*. *Phytopathology*, 72: 1000-1009.
- ROVIRA, R. (1981). Un paràsit preocupant en els perers de Girona. *Bulletí del Col·legi d'Enginyers Tècnics Agrícoles de Catalunya*, pp. 22-23.
- VALI, G. (1971). Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. *J. Atmos. Sci.*, 28: 402-409.