

Estudio de la posible relación entre la caída de yemas en peral y la capacidad bacteriana para formar núcleos de hielos u originar podredumbre blanda

C. NOVAL, M. T. SEISDEDOS y J. I. DE LA CRUZ

Se ha estudiado la población bacteriana existente en el exterior de las yemas y en el interior de los brotes de peral (*Pyrus communis*, L.), en cuatro fincas de las Vegas Bajas del Guadiana (Badajoz), donde se ha observado, además de un quemado de inflorescencias, una abundante caída de yemas a final de invierno y principios de primavera.

En las variedades de peral analizadas (Ercolini, Mantecosa y Blanquilla) se identifican *Pseudomonas syringae* y otras bacterias, algunas de las cuales son causantes de podredumbres blandas o presentan actividad INA +. Sin embargo ninguno de los organismos mencionados aparece asociado consistentemente con la caída de las yemas.

C. NOVAL, M. T. SEISDEDOS. Subdirección General de Sanidad Vegetal. Juan Bravo 3-B. 28006 MADRID.

J. I. DE LA CRUZ. Servicio de Protección de los Vegetales. Consejería de Agricultura y Comercio. Junta de Extremadura. Plaza de la Soledad, 5 06001 BADAJOZ.

Palabras clave: *Pseudomas syringae*, podredumbre blanda, INA, caída de yemas, peral.

INTRODUCCION

El Marchitamiento o Tizón bacteriano del peral (*Pyrus communis* L.) está producido (BARKER y GROVE, 1914) por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, bacteria fitopatógena que se encuentra viviendo como epífita sobre la superficie de numerosas plantas, tanto herbáceas como leñosas (LINDOW *et al.*, 1978).

La enfermedad puede producir importantes pérdidas económicas cuando las condiciones climáticas (lluvias y fríos) especialmente en el período de floración, favorecen la multiplicación de la bacteria (PANAGOPOULOS y CROSSE, 1964; WAISSBLUTH y LATORRE, 1978; MANSUELT y HATTINGH, 1986). En España hemos observado que algunos años motiva perjuicios de cierta consideración en zonas frutícolas tradicionales

como, por ejemplo, en el Valle del Ebro (Aragón y Cataluña), zona de El Bierzo (León) o en Extremadura. Sus síntomas pueden ser confundidos con los del Fuego bacteriano (*Erwinia amylovora* Burrill), especialmente cuando la infección de las inflorescencias, que conlleva su atizamiento, comienza a progresar en sentido descendente hacia los pedúnculos (BILLING *et al.*, 1960). Otras manifestaciones de la enfermedad son manchas o necrosis en hojas y frutos o chancros, a veces papiráceos, en los brotes.

La zona de Vegas Bajas del Guadiana, en la provincia de Badajoz, está siendo muestreada sistemáticamente desde 1980, época en la que comenzó la campaña para la Detección y el Diagnóstico Precoz del Fuego Bacteriano. Desde entonces los análisis de laboratorio confirman la presencia de la



Fig. 1.—Arboles sanos y atacados (S. P. V. Badajoz).

!.—Yema a punto de caerse (S. P. V. Badajoz).



bacteria *P.s. pv. syringae* en las plantaciones de peral.

Una de las alteraciones que con mayor frecuencia se observan en esta importante área frutícola es la caída prematura de las yemas que afecta de forma especial a determinadas variedades, como ocurre con la variedad Ercolini.

Las figuras 1 a 5 muestran diversos daños en la zona.

Durante varios años se han efectuado análisis de yemas en los meses de Diciembre, Enero o Febrero y el diagnóstico más frecuente ha sido la identificación sólo esporádica de *P.s. pv. syringae*, *Erwinia herbicola* o *Pseudomonas* sp.

Se sabe que algunas bacterias asociadas con las plantas pueden contribuir a incrementar los daños del frío debido a su capacidad de inducir la formación de cristales de hielo a temperaturas cercanas a los 0° C (ARNY *et al.*, 1976; LINDOW *et al.*, 1982; MAKI *et al.*, 1974). Esta capacidad reside en el genoma bacteriano y se conoce como acti-



Fig. 3.—Brotes afectados por ataque de bacteriosis. Obsérvese desprendimiento de la epidermis y caída de yemas (J. I. de la Cruz).

vidad INA+ (Ice Nucleation Activity). Se cree que algunas cepas INA+, al causar daños de heladas, facilitan su propia penetración y la de otras bacterias dentro de los tejidos de la planta.

Entre las bacterias que con mayor frecuencia presentan actividad INA figuran: *Pseudomonas syringae* van Hall, *P. fluorescens* Migula, *P. viridiflava* (Burkholder) Dowson, *Erwinia herbicola* (Lonis) Dye y *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (Jones, Johnson and Reddy) Dye.

En lo que se refiere a plantas leñosas, bacterias INA+ han sido involucradas en daños de diversos frutales como albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), cerezo (*Prunus avium* L.), ciruelo (*Prunus domestica* L.) melocotonero (*Prunus persica* L. Batsch), peral (*Pyrus communis* L.) (PROEBSTING *et al.*, 1982), almendro (*Prunus amygdalus* L.) (LINDOW y CONNELL, 1984), cítricos (YANKOFSKY *et al.*, 1981), o, incluso en vid (LUISETTI *et al.*, 1991). Pero en otros traba-





Fig. 4.—Desecamiento de inflorescencias (Miguel A. Martínez).



Fig. 5.—Caída de yemas y brotación a partir de las latentes (J. I. de la Cruz).

jos se sugiere una implicación de agentes no bacterianos como causa primordial de la aparición de núcleos de hielo (ANDREWS *et al.*, 1983; ANDERSON *et al.*, 1987).

En este trabajo se ha intentado averiguar si *P. syringae* u otras bacterias con capacidad para formar núcleos de hielo u originar podredumbres blandas, estaban relacionadas con la caída de las yemas de perales en la zona de las Vegas Bajas del Guadiana.

MATERIAL Y METODOS

Toma de muestras

Se eligieron cuatro fincas situadas en las Vegas Bajas del Guadiana, cuyas plantaciones de perales habían presentado problemas durante los últimos años por la abundante caída de yemas en el período de finales de invierno y principios de primavera.

Dentro de cada finca se escogieron las parcelas según la edad de los árboles y el muestreo se centró sobre la variedad Ercolini, al ser la más afectada. En algunos casos, para ver diferencias poblacionales, el análisis se realizó también sobre las variedades Mantecosa Precoz Morettini y Blanquilla, que actuaban como polinizantes y, en general, no acusaban caída de yemas.

Cada muestra estaba constituida por 10-15 brotes procedentes de 2-3 árboles. Además de muestras tomadas al azar —muestreo general—, en circunstancias concretas, los brotes fueron seleccionados de acuerdo con su altitud sobre el suelo y/o su orientación en el árbol. El muestreo se realizó durante la primera quincena de marzo de 1991, antes de iniciarse la brotación de los perales, es decir en el estado fenológico C.

Las particularidades de las 18 muestras, aparecen reflejadas en los cuadros 1, 2, 3 y 4.

Las muestras, cuidadosamente empaquetadas, fueron enviadas al laboratorio, donde se procesaron en las primeras 24 horas.

Extracción bacteriana

Cada muestra fue sometida a dos protocolos de análisis para determinar la población bacteriana colonizadora de las yemas y la existente en el interior de los brotes.

Población colonizadora de yemas (análisis externo)

En matraces de 100 ml. de capacidad conteniendo 25 ml. de agua estéril, fueron introducidas 50 yemas de cada muestra, con un

Cuadro 1.-Toma de muestras en plantaciones de peral. Finca *Las Veguitas*
(Término Municipal de Barbaño)

Parcela N.º	Edad Arboles	Variiedad	Caída Yemas*	Zona Muestreo**	Muestreo N.º
1-1	3 años	Ercolini	3	General	1-1-a
		Ercolini	2	General	1-1-b
		Ercolini	3	h < 1 m	1-1-c
		Ercolini	3	h > 1 m	1-1-d
		Mantecosa	3	General	1-1-e
1-2	24 años	Ercolini	2	General	1-2-a
1-3	7 años	Ercolini	1	General	1-3-a

* 0 no apreciable 1 baja 2 media 3 alta

** Altura sobre el suelo

Cuadro 2.-Toma de muestras en plantaciones de peral. Finca *La Vera*
(Término Municipal de Valdelacalzada)

Parcela N.º	Edad Arboles	Variiedad	Caída Yemas*	Zona Muestreo**	Muestreo N.º
2-1	5 años	Ercolini	3	General	2-1-a
		Mantecosa	0	General	2-1-b
2-2	5 años	Ercolini	2	General	2-2-a
		Mantecosa	1	General	2-2-b

* 0 no apreciable 1 baja 2 media 3 alta

** Altura sobre el suelo

Cuadro 3.-Toma de muestras en plantaciones de peral. Finca *La Herradura*
(Término Municipal de La Garrovilla)

Parcela N.º	Edad Arboles	Variiedad	Caída Yemas*	Zona Muestreo**	Muestreo N.º
3-1	3 años	Ercolini	3	General	3-1-a
		Ercolini	3	h < 1 m	3-1-b
		Ercolini	2	h > 1 m	3-1-c
		Mantecosa	0	General	3-1-d

* 0 no apreciable 1 baja 2 media 3 alta

** Altura sobre el suelo

Cuadro 4.-Toma de muestras en plantaciones de peral. Finca *El Hinojal*
(Término Municipal de Torremayor)

Parcela N.º	Edad Arboles	Variiedad	Caída Yemas*	Zona Muestreo**	Muestreo N.º
3-1	3 años	Ercolini	2	General Or-sur	4-1-a
		Ercolini	3	h < 1 m Or-norte	4-1-b
		Ercolini	2	h > 2 m Or-norte	4-1-c

* 0 no apreciable 1 baja 2 media 3 alta

** Altura sobre el suelo

Or Orientación en el árbol

peso que oscilaba entre los 3,62 g y los 4,50 g. Los matraces fueron colocados sobre un agitador en vaivén durante 30 minutos. De cada matraz se tomaron 5 ml de la suspensión y se prepararon cuatro series de diluciones decimales en agua destilada estéril. En placas Petri, conteniendo medio B de King (KING *et al.*, 1954), se sembraron gotas de 9 ul de la suspensión madre y de cada dilución, utilizando placas individuales para cada dilución y muestra. Se efectuaron dos repeticiones de cada muestra. Las placas se dejaron en incubación a 25° C durante 3-4 días.

Población interna de brotes

Para determinar qué bacterias se encontraban en el interior de los brotes, fueron seleccionados como lugares de análisis los puntos de inserción de las yemas con los brotes y, en los casos existentes, pequeños chancros papiráceos o áreas con ligera necrosis. Las zonas de análisis fueron desinfectadas mediante el paso de un algodón embebido en alcohol, seguido de un ligero flameado, previo a la separación de la capa externa. Pequeños fragmentos del tejido subcortical fueron colocados en placas de Petri, dilacerados en unas gotas de agua esteril, y sometidos a un ligero movimiento de vaivén durante 15 minutos. Unas gotas de la suspensión resultante fueron sembradas en placas conteniendo medio B de King (KB) y colocadas en las mismas condiciones de incubación que en el caso de las yemas.

Cultivos bacterianos

Fueron seleccionadas colonias que se consideraron representativas de la población bacteriana en base al tiempo de visualización sobre la placa de cultivo, tamaño, forma, color u otros caracteres ópticos. Se desecharon algunos tipos debido a que su bajo número parecía indicar una existencia ocasional.

Las colonias fueron transferidas a tubos de ensayo conteniendo KB y los cultivos obtenidos, después de comprobar su pureza, fueron mantenidos mediante resiembra periódica en KB y conservados bajo aceite mineral.

Además de los aislados procedentes del material vegetal estudiado, se utilizaron como referencia cultivos de las siguientes bacterias: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (PD 1704; 20-89-1) *Erwinia herbicola* (PD 295), *Pseudomonas viridiflava* (PD 1705), *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (71-5), *P. cichorii* (PD 1701), *P. fluorescens* (PD 1702). y *P. corrugata* (PD 1707), pertenecientes a la colección del Servicio de Protección de las Plantas de Wageningen, Holanda (PD), o a nuestra colección.

Caracterización de los aislados

Todos los aislados fueron testados para observar la fluorescencia bajo luz ultravioleta (350 nm) después de ser subcultivados en KB durante 48 horas a 25 C. Aquellos que dieron fluorescencia positiva fueron caracterizados según su reacción Lopat (LELLIOT *et al.*, 1966):

- Para la producción de Levano se sembraron en agar nutritivo sacarosa (5 % p/v) y se consideró resultado positivo la aparición de colonias abombadas después de 72 horas de incubación.

- La existencia de citocromo c Oxidasa se puso de manifiesto con el reactivo de Kovacs (KOVACS, 1956) y, en algún caso, con el oxalato de NN'dimetil parafenilendiamino, anotándose resultado positivo si en menos de 30 segundos aparecía un color púrpura o rosa, según el reactivo utilizado.

- La podredumbre de los tejidos de Patata se observó a las 48-72 horas de haber efectuado la inoculación en rodajas de patata.

- Para estudiar la degradación de la Arginina se siguió el método de Thornley (THORNLEY, 1960). Evaluando como positivo el viraje en anaerobiosis a un color rosa más fuerte que el testigo en un período comprendido entre 2-10 días.

– La reacción de hipersensibilidad sobre Tabaco (KLEMENT *et al.*, 1964) se consideró positiva si aparecía un colapso celular de la zona infiltrada a las 24-48 horas.

Los aislados cuya fluorescencia sobre KB era negativa, fueron caracterizados según su reacción Gram (RYU, 1939) y su metabolismo respiratorio en el medio H-L (HUGH y LEIFSON, 1953), además de ser sometidos a las pruebas especificadas en el Lopat que se consideraron precisas. En general todos los ensayos fueron realizados siguiendo las indicaciones de Noval (NOVAL, 1991).

De cada aislado y de las cepas utilizadas como referencia, se determinó su capacidad de inducir la formación de núcleos de hielo, según el método aconsejado por Hirano (HIRANO, 1988), siendo los tubos con tampón fosfato PBS 0,01 M, pH 7,0 chequeados previamente, por la posibilidad de existir núcleos de hielo heterogéneos. Los tubos se colocaron en nevera a -15°C durante 30 minutos antes de comenzar la experiencia. A lo largo de la misma se mantuvieron dentro de un baño de hielo y alcohol a temperaturas que oscilaban entre -10°C y -3°C . La suspensiones bacterianas ($c = 10^8$ cel/ml) preparadas para los ensayos, se mantuvieron en refrigerador a 4°C con objeto de minimizar la posible pérdida de actividad INA debida a la temperatura ambiente.

RESULTADOS

Los resultados de los análisis aparecen recogidos en los Cuadros 5, 6, 7 y 8. En la columna relativa a clasificación, no se menciona la de los microorganismos considerados sin importancia para este trabajo. En el caso de las bacterias que mostraron fluorescencia positiva en KB, *Pseudomonas* fluorescentes, especificamos el grupo en el que se clasifican según la propuesta de Lelliot (LELLIOT. *et al.*, 1966) mencionando la especie o patovar representativo.

La actividad formadora de núcleos de hielo en cepas usadas como referencia dio positiva en *P.s. pv syringae*, *Xanthomonas*

campestris pv, *translucens* y *P. cichorii*; negativa en *Erwinia herbicola* y *P. fluorescens* y variable, en función de la temperatura, en *P. corrugata*.

Finca Las Veguitas

Los resultados se exponen en el cuadro número 5. En líneas generales, la situación que presentan los árboles de la variedad Ercolini enclavados en la parcela 1-1 (muestras n.º 1-1-a, 1-1-b, 1-1-c y 1-1-d) puede considerarse similar: ausencia o al menos, no detección de *P. syringae* y colonización, tanto interior como exterior de bacterias dotadas de un elevado poder de descomposición de los tejidos, puesto de manifiesto sobre rodajas de patata, que han sido clasificadas como *Erwinia* spp o *Pseudomonas* de los grupos IVa, IVb o Va de LELLIOT. En relación con el grupo Va, precisamos que la especie representativa del mismo es *P. tolaassii*, patógeno del champiñón, pero en ningún momento queremos decir que se haya encontrado *P. tolaassii*. Los análisis correspondientes a la variedad polinizadora Mantecosa (1-1-e) revelan la presencia de un *Pseudomonas* del grupo la, probablemente *P. syringae* pv. *syringae*.

En la parcela 1-2 no aparecen bacterias en el interior de los brotes y no se localiza nada de interés en las yemas.

Una situación diferente se plantea en la parcela 1-3, donde además de *P. syringae* aparecen agentes de podredumbres como *Erwinia* spp y *Pseudomonas* del grupo IVb.

La actividad INA ha resultado positiva para los aislados de *P. syringae*, negativa para *Erwinia* spp, e incierta en el caso de algunos *Pseudomonas* de los grupos IVb y Va.

Finca La Vera

Los resultados se exponen en el Cuadro número 6. En la parcela 2-1, sobre la variedad Ercolini (muestra n.º 2-1-a) hemos encontrado una bacteria que, por su levano

Cuadro 5.—Población bacteriana. Finca Las Veguitas

Muestra N.º	Lo. (1)	Principales caracteres de los aislados									Clasificación
		KB (2)	L (3)	O (4)	P (5)	A (6)	T (7)	INA (8)	GRAM	H-L (9)	
1-1-a	I	+	+	+	+	+	-	-	-	Ox	IVa. <i>P. marginalis</i> (<i>P. fluorescens</i>)
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	Ox	
E	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Ox	
1-1-b	I	+	-	+	+	+	-	-	-	Ox	IVb. <i>P. fluorescens/putida</i> . Va. <i>P. tolaassii/fluorescens</i> . <i>Erwinia</i> spp.
	E	+	-	+	+	+	-	+/-	-	Ox	
	E	+	-	+	-	+	-	+/-	-	Ox	
1-1-c	I										IVb. <i>fluorescens/putida</i> .
	E	+	-	+	+	+	-	-	-	Ox	
1-1-d	I										
	E	-			+	-		-		Ox	
1-1-e	I	-	-	+	-	-		-		-	
	E	-	-	-	-	-		-		Ox	
	E	+	+	-	-	-	+	+		Ox	
1-2-a	I										
	E	-	-	-	-	-	-	-		Ox	
1-3-e	I	-	-	+	-	-		-		Ox	Ia. <i>P. syringae</i> . <i>Erwinia</i> spp.
	E	-	-	-	+	-		-		F	
	E	-	-	-	-	-		-		F	
		+	-	+	+	+	-	+/-		Ox	IVb. <i>P. fluorescens/putida</i> .

- (1) Lo = Localización: (I) Interior brotes. (E) Exterior Yemas.
(2) KB = Fluorescencia en KB (+) Positiva. (-) Negativa.
(3) L = Colonias tipo levano: (+) Positiva. (-) Negativa.
(4) O = Reacción de oxidasa: (+) Positiva. (-) Negativa.
(5) P = Podredumbre en patata: (+) Positiva. (-) Negativa.
(6) A = Arginina. (+) Positiva. (-) Negativa.
(7) T = Hipersensibilidad sobre tabaco: (+) Positiva. (-) Negativa.
(8) INA = Actividad INA. (+) Positiva. (-) Negativa.
(9) H-L = Utilización glucosa: Ox = Oxidativo. F = Fermentativo.

negativo, se ha clasificado en el grupo Ib; sin embargo, es probable que se trate de un aislado de *P.s. pv syringae*, con ese carácter anómalo; también se detectan agentes de podredumbre blanda. En los análisis de la variedad polinizadora Mantecosa (muestra n.º 2-1-b) se aislan bacterias sin interés.

En la segunda parcela se ha encontrado *P.s. pv syringae* en el interior y en el exterior de ambas variedades, y agentes de podredumbre blanda en las yemas de la variedad Ercolini (muestra 2-2-a).

La actividad INA sólo ha resultado positiva para algunos aislados de los *Pseudomonas* enclavados en el grupo 1.

Cuadro 6.—Población bacteriana. Finca La Vera

Muestra N.º	Lo. (1)	Principales caracteres de los aislados									Clasificación
		KB (2)	L (3)	O (4)	P (5)	A (6)	T (7)	INA (8)	GRAM	H-L (9)	
2-1-a	I										
	E	+	-	+	+	+	-	-	-	Ox	IVb. <i>fluorescens/putida</i> .
		+	-	-	-	-	+	+		Ox	Ib.
2-1-b	I	-	+			-	-	-			
	E	-	-	-	-	-	-	-		Ox	
		-	+	-	-	-	-	-		Ox	
2-2-a	I	-	-	-	-	-	-	-		Ox	
	E	+	+	-	-	-	+	+	-	Ox	Ia. <i>P. syringae</i> .
		-	-	+	+	+	-	-		Ox	
		+	+	-	-	-	+	-	-	Ox	Ia. <i>P. syringae</i> .
2-2-b	I	+	+	-	-	-	+	-		Ox	Ia. <i>P. syringae</i> .
	E	+	+	-	-	-	+	+		Ox	Ia. <i>P. syringae</i> .
		-	-	-	-	-	-	-		Ox	

- (1) Lo = Localización: (I) Interior brotes. (E) Exterior Yemas.
(2) KB = Fluorescencia en KB (+) Positiva. (-) Negativa.
(3) L = Colonias tipo levano: (+) Positiva. (-) Negativa.
(4) O = Reacción de oxidasa: (+) Positiva. (-) Negativa.
(5) P = Podredumbre en patata: (+) Positiva. (-) Negativa.
(6) A = Arginina. (+) Positiva. (-) Negativa.
(7) T = Hipersensibilidad sobre tabaco: (+) Positiva. (-) Negativa.
(8) INA = Actividad INA. (+) Positiva. (-) Negativa.
(9) H-L = Utilización glucosa: Ox = Oxidativo. F = Fermentativo.

Finca La Herradura

Los resultados se recogen en el Cuadro 7. Se pone de manifiesto la existencia de *P.s. pv syringae* en todas las muestras analizadas, encontrándose además *Erwinia* spp, causante de podredumbre blanda, en la muestra n.º 3-1-a. Al igual que en el caso anterior aparece una bacteria perteneciente al grupo Ib.

La actividad INA ha resultado positiva tanto en los aislados del grupo I, como en *Erwinia* spp.

Finca El Hinojal

Los resultados se muestran en el Cuadro 8. En dos de las tres muestras analizadas aparece *P. syringae* dotada, de capacidad INA+.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La capacidad de algunas bacterias para producir enfermedades en las plantas, inducir la formación de núcleos de hielo, o descomponer con rapidez los tejidos vegetales podría haber motivado o influido en la caída de yemas que se presenta de forma muy acusada sobre alguna variedad de las estudiadas de peral, en la zona de las Vegas Bajas del Guadiana.

Estudios realizados en una importante zona frutícola de Cataluña (MONTESINOS y VILLARDELL, 1991) correlacionan el quemado de las yemas durmientes en peral con la existencia de *P. syringae* y su capacidad de formar núcleos de hielo. Precisan los autores que, incluso en ausencia de frío, *P. syringae* puede producir el quemado de las yemas siempre que exista en una cantidad suficientemente elevada.

Cuadro 7.—Población bacteriana. Finca *La Herradura*

Muestra N.º	Lo. (1)	Principales caracteres de los aislados									Clasificación
		KB (2)	L (3)	O (4)	P (5)	A (6)	T (7)	INA (8)	GRAM	H-L (9)	
3-1-a	I	+	+	-	-	-	+	+	-	Ox	1a. <i>P. syringae</i> .
	E	-	-	-	-	-	-	+/-	-	F	<i>Erwinia</i> sp.
3-1-b	I	+	+	-	-	-	+	+	-	Ox	1a. <i>P. syringae</i> .
	E	+	-	+	-	+	-	-	-	Ox	Va. <i>P. tolaassii</i> .
3-1-c	I	+	+	-	-	-	+	+	-	Ox	1a. <i>P. syringae</i> .
	E	+	+	-	-	-	+	+	-	Ox	1a. <i>P. syringae</i> .
3-1-d	I	+	+	-	-	-	+	+	-	Ox	1a. <i>P. syringae</i> .
	E	-	+	+	-	-	-	-	-		1a. <i>P. syringae</i> .

- (1) Lo = Localización: (I) Interior brotes. (E) Exterior Yemas.
 (2) KB = Fluorescencia en KB (+) Positiva. (-) Negativa.
 (3) L = Colonias tipo levano: (+) Positiva. (-) Negativa.
 (4) O = Reacción de oxidasa: (+) Positiva. (-) Negativa.
 (5) P = Podredumbre en patata: (+) Positiva. (-) Negativa.
 (6) A = Arginina. (+) Positiva. (-) Negativa.
 (7) T = Hipersensibilidad sobre tabaco: (+) Positiva. (-) Negativa.
 (8) INA = Actividad INA. (+) Positiva. (-) Negativa.
 (9) H-L = Utilización glucosa: Ox = Oxidativo. F = Fermentativo.

Aunque más adelante se discutirán los resultados en cada una de las fincas, de forma general se ha encontrado *P. syringae* —probablemente *pv. syringae*—, en todas las fincas. Esta bacteria es un organismo que se puede localizar en la superficie de muchas plantas sin producirles daño alguno, conviviendo en perfecta armonía con los restantes componentes de la flora epífita; circunstancias aún desconocidas inducen su rápida proliferación y comienza a comportarse como agente nocivo para las plantas. Es por ello que su localización en el interior o en el exterior de la planta no tiene la misma importancia ya que la presencia interior normalmente indica un comportamiento patógeno, mientras que su existencia en superficie puede, y es función del número de bacterias existentes, carecer de importancia o indicar la proximidad de un ataque como

agente patógeno. Esta situación no es exclusiva de *P. syringae*, sino que afecta a patógenos que presentan fases epífitas, como es el caso de *Erwinia amylovora*. El conocer los momentos en que comienza a producirse el incremento poblacional o los lugares de la planta donde se alberga la bacteria, reviste gran importancia desde un punto de vista práctico, puesto que la lucha contra los agentes nocivos será más efectiva y económica, al saber dónde y cuándo hay que aplicar las medidas oportunas de control.

La situación que hemos encontrado en las cuatro fincas estudiadas es la siguiente:

Finca Las Veguitas

En las muestras de la parcela 1-1, relativas a la variedad Ercolini y, tomadas al azar

Cuadro 8.-Población bacteriana. Finca *El Hinojal*

Muestra N.º	Lo. (1)	Principales caracteres de los aislados									Clasificación
		KB (2)	L (3)	O (4)	P (5)	A (6)	T (7)	INA (8)	GRAM	H-L (9)	
4-1-a	I	+	+	-	-	-	+	+	-	Ox	Ia. <i>P. syringae</i> .
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	Ox	
4-1-b	I	-	-	-	-	-	-	-	-	Ox	Ia. <i>P. syringae</i> .
	E	+	+	-	-	-	+	+	-	Ox	
4-1-c	I	-	-	-	-	-	-	-	-	Ox	
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	Ox	

- (1) Lo = Localización: (I) Interior brotes. (E) Exterior Yemas.
 (2) KB = Fluorescencia en KB (+) Positiva. (-) Negativa.
 (3) L = Colonias tipo levano: (+) Positiva. (-) Negativa.
 (4) O = Reacción de oxidasa: (+) Positiva. (-) Negativa.
 (5) P = Podredumbre en patata: (+) Positiva. (-) Negativa.
 (6) A = Arginina. (+) Positiva. (-) Negativa.
 (7) T = Hipersensibilidad sobre tabaco: (+) Positiva. (-) Negativa.
 (8) INA = Actividad INA. (+) Positiva. (-) Negativa.
 (9) H-L = Utilización glucosa: Ox = Oxidativo. F = Fermentativo.

de los árboles (1-1-a y 1-1-b) parece ser que la presencia y uniformidad de bacterias tipo *P. marginalis*, desencadena una caída de yema más intensa que cuando este organismo está ausente y existe una competencia de otras bacterias con menor capacidad destructiva de los tejidos vegetales.

En cuanto a la distribución relacionada con la altitud a la que se tomó la muestra sobre el árbol (1-1-c y 1-1-d), se ha encontrado una población de *Pseudomonas* del grupo IVb (*P. fluorescens/putida*) en la zona baja del árbol mientras que en la zona alta aparecen organismos no representativos.

Los análisis correspondientes a la variedad polinizadora Mantecosa (1-1-e) revelan la presencia de *P. syringae*. Su localización en el exterior de la planta y la ausencia de bacterias con poder pectinolítico, explicaría la no caída de yemas en estos árboles.

Podría concluirse que el problema de caída de yemas en esta parcela no está inicialmente motivado por una acción bacteriana y que las bacterias asociadas a la caída de

yemas son, en este caso, agentes oportunistas que aceleran, por medio de su poder de descomposición de los tejidos, el desprendimiento de las mismas.

Un interrogante se presenta sobre el significado de la detección de *P. syringae* sobre la variedad polinizadora. Por una parte podría haber ocurrido una dispersión inicial a partir del foco localizado en la variedad Mantecosa y originado lesiones por su capacidad de incrementar los daños del frío; su no localización en los análisis externos de las muestras con caída de yemas sería quizás, debido a su enmascaramiento en las placas de cultivo por el desarrollo más rápido de los oportunistas. Por otra parte podría considerarse que es precisamente sobre la variedad polinizadora donde se encuentra el mayor foco de *P. syringae*, que va a producir posteriormente, el quemado de las inflorescencias en los perales en esta parcela.

Los análisis de la parcela 1-2, plantación de árboles de bastante edad, no revelan bacterias en el interior, y en el exterior se en-

cuentra una población pectinolítica. La duda es si la caída de yemas podría deberse al envejecimiento de la planta.

En la tercera parcela analizada (1-3), que no presenta prácticamente caída de yemas, aparece *P. syringae* en el interior de los brotes, y agentes de podredumbre blanda en el interior y en el exterior. Concurren en ella todas las circunstancias para que se hubiese producido un desprendimiento masivo de yemas, con la única circunstancia en contra de que se trata de árboles más viejos que los analizados en la parcela 1-1.

Finca La Vera

Se han estudiado mediante un muestreo general tanto de la variedad Ercolini como de la polinizadora Mantecosa, dos parcelas bastante similares y en todos los casos en que hay caída de yemas, se ha encontrado *P. syringae* acompañada, en los análisis de la variedad Ercolini, de agentes de podredumbre blanda.

En esta finca parece estar asociada la caída de yemas con la existencia de *P. syringae*.

Finca La Herradura

Esta finca presentaba una importante caída de yemas en la variedad Ercolini, aparentemente más acusada en la zona baja de los árboles, mientras que sobre la variedad polinizadora Blanquilla no se apreciaba desprendimiento.

Aunque se encuentra *P. syringae* tanto en la zona baja del árbol (3-1-b), como en la zona alta (3-1-c), la localización interna, en el primero de los casos presupone, un mayor riesgo de daños a la plantación.

Tampoco en esta finca parece estar asociada la caída de yemas con la existencia de *P. syringae*.

Finca El Hinojal

Esta finca presentaba un problema general de caída de yemas, siendo aparentemente más acentuado en las zonas más bajas del árbol y con orientación norte.

Los resultados de los análisis indican la presencia de *P. syringae* en el interior de la planta en la muestra 4-1-a, y en el exterior en la muestra 4-1-b.

El hecho de no haber encontrado agentes causantes de podredumbres blandas en ninguna de las tres muestras analizadas, parece confirmar que la actuación de estos organismos se produce tras la caída de las yemas, debida inicialmente a otras causas.

No se ha estimado oportuno debatir en esta discusión el papel que tiene la actividad formadora de núcleos de hielo de algunos aislados, al cuestionar que la caída de yemas sea debida a la actuación bacteriana o a otras causas. De hecho en este trabajo se pone de manifiesto la incierta incidencia de las bacterias en la caída prematura de yemas.

Se observa una presencia, a veces muy abundante de *P. syringae* sobre las variedades polinizadoras, Mantecosa y Blanquilla, a pesar de no presentar caída de yemas. En general, la presencia de *P. syringae* y de la población bacteriana causante de descomposición de tejidos es mucho más frecuente en las zonas bajas del árbol, debido tal vez, a una mayor concentración de la humedad. En las zonas altas del árbol, su presencia es escasa y, en muchos casos, sólo de localización externa.

ABSTRACT

NOVAL, C.; SEISDEDOS, M. T. y DE LA CRUZ, J. I. (1993). Estudio de la posible relación entre la caída de yemas en peral y la capacidad bacteriana para formar núcleos de hielos u originar podredumbre blanda. *Bol. San. Veg. Plagas*, **19**(4): 649-661.

The Bacterial population has been studied on buds and in shoots of pear (*Pyrus communis*, L), grown in four zones of the Guadianas Vegas Bajas (Badajoz), which, in

addition to burnt inflorescences, there exists a significant falling of buds at the end of winter time and at the beginning of spring.

Pseudomonas syringae and other bacteria, some of which are causal agents of soft decay, and/or have INA+ activity were identified in the analyzed varieties: Ercolini, Mantecosa and Blanquilla. None of the named organisms appear consistently associated with the falling of buds.

Key words: *Pseudomonas syringae*, soft decay, INA, fallen buds, pear tree.

REFERENCIAS

- ANDERSON, J. A.; ASHWORTH, E. N. y DAVIS, G. A., 1987: Non bacterial ice nucleation in Peach shoots. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **112**(2): 215-218.
- ANDREWS, P. K.; PROEBSTING, E. L. y GROSS, D. C., 1983: Differential thermal analysis and freezing injury of deacclimating peach and sweet cherry reproductive organs. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **108**(5): 755-759.
- ARNY, D. C., LINDOW, S. E. y UPPER, C. D., 1976: Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature*, **262**: 282-284.
- BARKER, B. T. P. y GROVE, O., 1914: A bacterial disease of fruit blossom. *Annals of Applied Biology*, **1**: 85-97.
- BILLING, E.; CROSSE, J. E. y GARRETT, C. M. E., 1960: Laboratory diagnosis of fireblight and bacterial blossom blight of pear. *Plant Pathology*, **9**: 19-25.
- HIRANO, S. S., 1988: Frost injuri and Ice nucleating bacteria. In: *Teacher's Manual*. Laboratory Exercises in Plant Pathology: An Instructional Kit. Editor A.B.A.M. BAUDOIN APS PRESS. St. Paul. Minnesota: 119-122.
- HUGH, R. y LEIFSON, E., 1953: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram bacteria. *J. Bact.*, **66**: 24-26.
- KING, E. O.; WARD, M. K. y RANEY, D. E., 1954: Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, **44**: 301-307.
- KLEMENT, Z.; FARKAS, G. L. y LOVREKOVICH, L., 1964: Hipersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, **54**: 474-477.
- KOVACS, N., 1956: Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, **178**: 703.
- LELLIOT, R. A.; BILLING, E. y HAYWARD, A. C., 1966: A determinative scheme for fluorescens plant pathogenic bacteria. *J. Appl. Bact.*, **29**: 470-478.
- LINDOW, S. E.; ARNY, D. C. y UPPER, C. D., 1978: Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**(6): 831-838.
- LINDOW, S. E.; ARNY, D. C. y UPPER, C. D., 1982: Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. *Plant Physiol.*, **70**: 1.084-1.089.
- LINDOW, S. E. y CONNELL, J. H., 1984: Reduction of frost injury to Almond by control of ice nucleation active bacteria. *J. Amer. Proc. Hort. Sci.*, **109**(1): 48-53.
- LUISETTI, J.; GAIGNARD, J. L. y DEVAUX, M., 1991: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* as one of the factors affecting the ice nucleation of Grapevine buds in controlled conditions. *J. Phytopathology*, **133**: 134-344.
- MAKI, L. R.; GALYAN, L.; CHANG-CHIEN, M. M. y CALDWELL, D. R., 1974: Ice nucleation induce by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiol.*, **28**: 456-459.
- MANSUELT, E. L. y HATTINGH, M. J., 1986: Pear blossom blast in South Africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology*, **35**: 337-343.
- MONTESINOS, E. y VILARDELL, P., 1991: Relationships among populations levels of *Pseudomonas syringae*, amount of ice nuclei, and incidence of blast of dormant flower buds in comercial pear orchards in Catalunya, Spain. *Phytopathology*, **81**: 113-119.
- NOVAL, C., 1991: Medios de cultivo y pruebas de diagnóstico. In: *Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos*. MAPA. Secretaría General Técnica, 379-410.
- PANAGOPOULOS, C. G. y CROSSE, J. E., 1964: Frost injury as a predisposing factor in blossom blight of pear caused by *Pseudomonas syringae* van Hall. *Nature*, **202**: 1.352.
- PROEBSTING, E. L.; ANDREWS, P. K. y GROSS, D. C., 1982: Supercooling young developing fruit and floral buds in deciduous orchards. *Hortscience*, **17**(1): 67-68.
- RYU, E., 1938: On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *J. Japan. Veter. Sci.*, **17**: 31.
- THORNLEY, M. J., 1960: The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**: 27-52.
- WAISSBLUTH, M. E. y LATORRE, B. A., 1978: Source and seasonal development of inoculum for pear blast in Chile. *Plant Disease Reporter*, **62**: 651-655.
- YANKOVSKY, A.; LEVIN, Z. y MOSHE, A., 1981: Association with Citrus of ice-nucleatin bacteria and their possible role as causative agents of frost damage. *Current Microbiol.*, **5**: 212-217.