

Caracterización de *Pseudomonas syringae*, Van Hall presentes en cerezo¹

B. A. Latorre² y M. E. Waissbluth²

INTRODUCCION

El cáncer bacteriano de los frutales de ca-rozo y el tizón bacteriano del peral son dos importantes enfermedades conocidas por muchos años en Chile (Cancino, Latorre y Lach, 1974; Romoli, 1963), y se encuentran ampliamente distribuidas entre Vallenar y Aysén (Romoli, 1963). Su importancia se reconoció luego de la epifitía observada en la zona central en la primavera de 1957.

Pseudomonas syringae van Hall es el agente causal del tizón bacteriano del peral (Baker, 1966; Crosse, 1966; Cancino *et al.*, 1974). En cambio el cáncer bacteriano puede ser provocado por *P. syringae* o por *P. morsprunorum*. Así en California y en Oregón, EE. UU., el cáncer bacteriano se atribuye a la acción de *P. syringae*. La misma enfermedad en Inglaterra se debe a *P. morsprunorum* (Cameron, 1962; Crosse, 1966). Sin embargo, en Michigan, EE. UU., lo mismo que en Ontario, Canadá, tanto *P. syringae* como *P. morsprunorum* son responsables del cáncer bacteriano en cerezos (Jones, 1971; Wayne y Dirks, 1978; Latorre y Jones, 1979a).

Especial importancia se ha concedido en estos últimos años a las poblaciones epifitas de *P. syringae* (*sensu* Leben, 1965) presentes en tejidos vegetales carentes de síntomas. Dichas poblaciones bacterianas se han encontrado en órganos aéreos de algunos frutales como cerezos y perales, y en malezas que crecen en los huertos (English y Davis, 1960; Waiss-

bluth y Latorre, 1978; Latorre y Jones, 1978, 1979a y 1979b). La patogenicidad de *P. syringae* aislada de tejidos sanos se ha demostrado tanto en perales como en cerezos y otras especies cultivadas, por lo cual se considera que estas poblaciones epifitas de *P. syringae* constituyen una importante fuente de inóculo del cáncer y tizón bacteriano.

Esta investigación tuvo por objeto establecer la existencia de poblaciones epifitas de *P. syringae* en cerezos, caracterizar las cepas obtenidas de tejidos sanos y comparar dichas cepas con las obtenidas de tejidos enfermos.

MATERIALES Y METODOS

Lugares de muestreo.

Se seleccionaron dos huertos de cerezos ubicados en los alrededores de Curicó y un huerto en Santiago. En estos huertos existía un número apreciable de árboles con síntomas atribuibles a cáncer bacteriano, consistentes en canchros subsuperficiales y gomosis en el tronco, ramas y ramillas. En Curicó, los huertos se muestrearon en cinco oportunidades: 4, 16 y 25 de octubre, y 15 y 29 de noviembre. En Santiago, los muestreos se realizaron el 29 de septiembre, el 13 de octubre y el 21 de noviembre. En cada oportunidad se seleccionó tejido enfermo de los márgenes de canchros desarrollados en ramas o ramillas como asimismo tejido carente de síntomas, tanto de árboles sanos como de árboles enfermos.

Aislamiento.

Todos los aislamientos se realizaron en medio de B de King (King, Ward y Raney, 1954), conteniendo $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida (cMB) y se incubaron a 20° C por 3 a 4 días.

¹Recepción originales: 22 de junio de 1979.

Trabajo realizado en el Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile, con aportes de COOPEFRUT, Curicó y del SECAR, Universidad de Chile, Santiago.

²Ingeniero Agrónomo PhD e Ingeniero Agrónomo, respectivamente. Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile.

Previo al aislamiento, las muestras de tejidos enfermos se esterilizaron superficialmente con etanol 95% por 1 minuto, NaOCl 1% por 1 minuto y luego se enjuagaron en abundante agua estéril. Pequeños trozos seleccionados desde los márgenes del avance de la lesión se maceraron en 1 ó 2 gotas de agua estéril. El triturado resultante se sembró en placas con medio cMB.

Los aislamientos desde tejido sano se efectuaron a partir de 25 g (peso fresco) de yemas, flores, hojas y ramillas, o a partir de 50 g de frutos carentes de síntomas de cáncer bacteriano. Cada muestra se lavó y agitó por alrededor de 60 segundos en 500 ml de agua estéril. La suspensión resultante se diluyó en series de 1:10 y luego se tomó 0,1 ml de cada dilución y se sembró en placas conteniendo medio cMB.

Caracterización bioquímica.

Primeramente se determinó la presencia de citocromo oxidasa de acuerdo a Kovacs (1956), y luego la presencia de pigmentación verde y fluorescencia bajo luz ultravioleta.

Más de 100 cepas correspondientes cada una a colonias fluorescentes en medio cMB y carentes de citocromo oxidasa se caracterizaron bioquímicamente en la forma siguiente: 1) licuación de la gelatina, para lo cual se sembró cada cepa en picadura profunda en tubos conteniendo 12% (peso/volumen) de gelatina y se incubó por 15 días a 20° C; 2) presencia de β -glucosidasa en 0,1% (p/v) aesculina, de acuerdo con Sneath (1956) e incubado por 24 a 36 h a 20° C; 3) determinación de tirosinasa en 0,1% (p/v) L-tirosina, incubado por 15 días a 20° C (Lelliott, Billing y Hayward, 1966) y 4) utilización de tartratos como única fuente de carbono, determinada de acuerdo con Latorre y Jones (1979a) en 0,2% (p/v) tartrato de sodio, incubado a 20° C por 2 a 3 días.

De acuerdo con los resultados obtenidos en estas cuatro determinaciones las cepas se clasificaron en dos grupos: GATTa⁺ y GATTa⁻ según el esquema propuesto por Latorre y Jones (1979a). Las cepas GATTa⁺ licuan la gelatina (G) y presentan actividad β -glucosídica en agar aesculina (A), pero carecen de tirosinasa (T) y no utilizan tartratos como única fuente de carbono (Ta); en cambio las cepas GATTa⁻ no licuan la gelatina, carecen de actividad β -glucosídica, pero presentan

tirosinasa y utilizan tartratos como única fuente de carbono.

Una muestra de 20 cepas GATTa⁺ se caracterizaron además con respecto a la presencia de actividad β -glucosídica en 0,5% (p/v) arbutina de acuerdo con Crosse y Garret (1963); utilización de ácido L (L) láctico de acuerdo con Latorre y Jones (1979a) en 0,2% (p/v) ácido L (L) láctico y determinación de las características del cultivo en caldo nutritivo, modificado con 5% (p/v) sucrosa, según el método propuesto por Latorre y Jones (1979a).

Patogenicidad.

La patogenicidad se determinó indirectamente por la capacidad de cada cepa de inducir hipersensibilidad en hojas de tabaco cv. White Burley (Klement, Farkas y Lovrekovich, 1964), y en cerezas de acuerdo con Latorre y Jones (1979a). Este método consistió en inocular cerezas inmaduras previamente esterilizadas en etanol 95%, 1 minuto, NaOCl 1%, 1 minuto y enjuagadas en agua estéril con una suspensión bacteriana equivalente a 10⁷ unidades formadoras de colonias (u.f.c.)/ml (aproximadamente 70-80% transmitancia, 0,1 - 0,15 absorbancia, determinada en un espectrofotómetro Spectronic 20, Bausch y Lomb a $\lambda=620$ nm). Previo a la inoculación, cada fruto se perforó con una aguja estéril y sobre las perforaciones se depositó aproximadamente 10 μ l de la respectiva suspensión bacteriana. Los frutos inoculados se incubaron en cámara húmeda por 3 a 4 días a 20° C. Tanto en la determinación de la hipersensibilidad, como en las determinaciones de patogenicidad en cerezas se utilizaron cultivos de 24 a 48 h en medio cMB.

Virulencia.

La virulencia (*sensu* Nelson, 1973) de 15 cepas GATTa⁺ recuperadas desde cerezas carentes de síntomas de cáncer bacteriano, se determinó por la lesión producida al inocular cerezas inmaduras. Cada cepa se incrementó en medio cMB por 24 a 48 h y a partir de estos cultivos se prepararon suspensiones bacterianas en agua estéril equivalentes a 10⁷, 10⁵, 10³ y 10¹ u.f.c./ml. Por cada cepa y por cada dilución del inóculo fueron inoculados seis frutos superficialmente esterilizados. Los frutos se perforaron y sobre la perforación se depositó aproximadamente 10 μ l de inóculo.

Posteriormente se incubaron por 48 - 72 h a 20° C, antes de determinar el diámetro de las lesiones producidas.

RESULTADOS

Aislamiento desde tejidos sanos.

En cada muestreo se aislaron desde yemas,

flores, hojas o ramillas sanas, obtenidas en Curicó, colonias bacterianas fluorescentes, citocromo oxidasa negativas, polihédricas, planas, con bordes enteros o ligeramente lobados, caracterizadas por presentar en medio cMB un aspecto vidrioso. En Santiago, sólo se aislaron colonias similares desde frutos y ramillas en una oportunidad, el 21 de noviembre (Cuadro 1).

Cuadro 1 — Caracterización fisiológica de bacterias gram negativas, fluorescentes, citocromo oxidasa negativas aisladas desde cerezos sanos durante la primavera 1978.

Localidad	Fuente de aislamiento	Número de cepas	GATTa ⁺ ¹		GATTa ⁻ ²		GATTa [±] ³	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%
Curicó	Yemas	7	5	71,4	0	0	2	28,6
	Flores	12	11	91,7	0	0	1	8,3
	Hojas	35	34	97,1	0	0	1	2,9
	Frutos	25	24	96,0	0	0	1	4,0
	Ramillas	16	15	93,7	0	0	1	6,3
Santiago	Frutos	17	17	100,0	0	0	0	0,0
	Ramillas	4	4	100,0	0	0	0	0,0
TOTAL	—	116	110	94,8 ⁴	0	0 ⁴	6	5,2 ⁴

¹Cepas GATTa⁺ son positivas a la licuación de la gelatina e hidrólisis de la aesculina, pero son negativas a la tirosinasa y no utilizan tartratos como única fuente de carbono.

²Cepas GATTa⁻ son negativas a la licuación de la gelatina e hidrólisis de la aesculina, pero son positivas a la tirosinasa y utilizan tartratos como única fuente de carbono.

³Cepas GATTa[±] son heterogéneas en su respuesta a una o más de las pruebas del GATTa.

⁴Representan la proporción entre 110 y 116, y 6 y 116, respectivamente.

Aislamiento desde tejidos enfermos.

Sólo se aislaron *Pseudomonas* fluorescentes, citocromo oxidasa negativas en 5 de 46 muestras, todas provenientes de Curicó. Los aislamientos realizados con el objeto de aislar *Pseudomonas* fluorescentes, citocromo oxidasa negativas desde tejidos enfermos colectados en Santiago, no tuvieron éxito.

Caracterización bioquímica.

Los resultados obtenidos en las cuatro pruebas diferenciales, GATTa⁺, indican que la mayoría de las cepas, 110 de 116 (94,8%), provenientes de tejidos sanos pertenecen al grupo GATTa⁺ (Cuadro 1). El 5% restante dió resultados variables para una o más de las pruebas consignadas como GATTa, por lo cual se consideraron GATTa[±]. No se encontraron cepas GATTa⁻.

En forma similar, 5 de las 14 cepas (36%) de *Pseudomonas* fluorescentes, citocromo oxidasa negativas provenientes de tejidos enfermos corresponden a GATTa⁺ y las 9 restantes a GATTa⁻.

Todas las cepas GATTa⁺, 16 provenientes de tejidos sanos y 4 de tejidos enfermos, presentaron actividad β -glucosídica en agar arbutina, y utilizaron ácido L (4) como única fuente de carbono. Estas 20 cepas se desarrollaron en caldo nutritivo modificado con 5% sucrosa. Al separar por centrifugación el crecimiento bacteriano del caldo nutritivo, se obtuvo un sobrenadante amarillo, de aspecto transparente o turbio.

Patogenicidad.

De 116 cepas GATTa⁺ provenientes de tejidos sanos, 110 indujeron hipersensibilidad en hojas de tabaco y 106 infectaron cerezas inma-

duras desarrollando lesiones necróticas de color café oscuro, ligeramente hundidas, al cabo de 3 a 4 días (Cuadro 2). Cinco cepas GATTa⁺ infectaron cerezas y cuatro de ellas indujeron hipersensibilidad en tabaco.

Nueve de las 14 cepas obtenidas desde tejidos enfermos indujeron hipersensibilidad en tabaco y 7 de las 9 cepas anteriores infectaron

cerezas inmaduras. De las 14 cepas, 5 fueron GATTa⁺ y patogénicas.

Virulencia.

Todas las cepas de *P. syringae* infectaron cerezas inmaduras al inocularlas con una suspensión bacteriana de 10^7 u.f.c./ml. El mayor

Cuadro 2 — Patogenicidad de cepas de *Pseudomonas fluorescens*, citocromo oxidasa negativas aisladas desde cerezos sanos durante la primavera de 1978 y determinadas en cerezas inmaduras e indirectamente a través de la capacidad para inducir hipersensibilidad en tabaco.

Localidad	Fuente de aislamiento	Número de cepas	Hipersensibilidad en tabaco		Patogenicidad en cerezas	
			Nº	%	Nº	%
Curicó	Yemas	7	7	100,0	7	100,0
	Flores	12	10	83,3	10	83,3
	Hojas	35	31	88,6	32	91,4
	Frutos	25	25	100,0	23	92,0
	Ramillas	16	16	100,0	16	100,0
Santiago	Frutos	17	17	100,0	15	88,2
	Ramillas	4	4	100,0	3	75,0
TOTAL	—	116	110	94,8¹	106	91,4¹

¹Representan la proporción entre 110 y 116, y 106 y 116, respectivamente.

desarrollo de las lesiones se obtuvo con 10^7 u.f.c./ml (Cuadro 3) y a medida que se diluyó el inóculo disminuyó el diámetro de las lesiones producidas, llegando, en la mayoría de los casos, a valores mínimos con una concentración de 10^1 u.f.c./ml. No obstante algunas cepas, H-2a-1, Fr-3a-6 ó H-1a-6, mostraron una significativa actividad patogénica con 10^1 u.f.c./ml (Cuadro 3); mientras que otras cepas, Y-1b-5, Y-1b-3 ó M-1b-4, perdieron totalmente su habilidad patogénica con inóculos equivalentes a 10^5 ó 10^4 u.f.c./ml (Cuadro 3).

A una misma concentración de inóculo, el tamaño de la lesión dependió directamente de la virulencia de la cepa. Las diferencias observadas en la habilidad patogénica en cada una de las concentraciones del inóculo son significativamente diferentes ($P \leq 0,01$) y de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Duncan ($P \leq 0,05$) es posible separar las cepas en grupos según los tamaños de las lesiones producidas (Cuadro 3).

En la figura 1 se presentan las rectas obte-

nidas por análisis de regresión lineal del diámetro de las lesiones (Y) sobre el \log_{10} de la concentración del inóculo (X) utilizadas. Las ecuaciones calculadas para cada cepa y los respectivos coeficientes de correlación, r, se indican en el Cuadro 3. Las pendientes, coeficientes de regresión b, del aumento de las lesiones en relación del inóculo, varían considerablemente entre cepas. La mayor pendiente, $b = 0,535$ se obtuvo con la cepa F-3a-1, aislada desde flores sanas en Curicó y la menor pendiente, $b = 0,143$, correspondió a la cepa Y-1b-3, obtenida desde yemas sanas de Curicó (Figuras 1A y C).

DISCUSION

La mayoría de las *Pseudomonas fluorescens* (94,8%), citocromo oxidasa negativas aisladas desde tejidos sanos fueron GATTa⁺ (Cuadro 1). De acuerdo con Latorre y Jones (1979a) *P. syringae* corresponde al grupo GATTa⁺; en cambio, *P. morsprunorum* es

Cuadro 3 — Virulencia de 15 cepas de *Pseudomonas syringae*, determinada a través del diámetro (mm) de las lesiones producidas al inocular cerezas inmaduras con 10 μ l/fruto de una suspensión bacteriana equivalente a 10⁷, 10⁵, 10³ y 10¹ u.f.c./ml.

Cepas	Diámetro (mm) de la lesión producida al inocular cerezas con				Regresión lineal	Ecuación	Coeficiente de correlación, r
	10 ⁷ u.f.c./ml	10 ⁵ u.f.c./ml	10 ³ u.f.c./ml	10 ¹ u.f.c./ml			
F-3a-41	3,83 a ²	2,44 ab	2,29 a	0,66 cd	Y = 0,378 + 0,457X ³	0,91***	
H-2a-1	3,42 ab	2,21 ab	1,88 ab	1,50 ab	Y = 1,034 + 0,304X	0,84**	
F-3a-1	3,38 ab	1,83 bc	1,25 bc	0,00	Y = -0,527 + 0,535X	0,95**	
Fr-3a-6	3,25 ab	2,38 ab	2,29 a	1,96 a	Y = 1,677 + 0,198X	0,72**	
F-1a-3	3,14 ab	2,09 abc	2,26 a	1,39 abc	Y = 1,204 + 0,254X	0,71**	
R-3a-4	3,10 abc	2,58 a	1,7 ab	0,41 cd	Y = 0,166 + 0,445X	0,85**	
H-2a-6	2,93 abcd	2,21 ab	1,39 abc	0,32	Y = -0,015 + 0,431X	0,89**	
H-1a-6	2,93 abcd	2,38 ab	1,96 a	1,63 ab	Y = 1,362 + 0,216X	0,66**	
Fr-3a-16	2,75 abcd	2,42 ab	1,46 abc	0,08	Y = -0,115 + 0,448X	0,92**	
F-1b-2	2,66 bcd	2,19 ab	0,63 c	0,00	Y = -0,543 + 0,478X	0,90**	
M-1b-4	2,03 cde	1,10 c	0,00	0,00	Y = -0,656 + 0,369X	0,80**	
M-1b-3	0,02 cde	2,21 ab	0,23	0,00	Y = -0,490 + 0,401X	0,79**	
H-2b-2	1,94 de	2,16 ab	1,52 ab	1,11 bcd	Y = 1,053 + 0,157X	0,60**	
Y-1b-5	1,28 e	0,00	0,00	0,00	Y = -0,449 + 0,193X	0,74**	
Y-1b-3	0,95	0,00	0,00	0,00	Y = -0,333 + 0,143X	0,77**	

¹F = flores, H = hojas, Fr = frutos, R = ramillas, M = malezas, Y = yemas.

²Los valores seguidos de una misma letra no difieren estadísticamente entre sí, de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Duncan ($P \leq 0,05$).

³Las ecuaciones se calcularon a partir de un análisis de regresión lineal donde X = log₁₀ de la concentración inóculo utilizada en unidades formadoras de colonias (u.f.c./ml) e Y = diámetro (mm) del avance de la lesión al cabo de 48 — 72 h a 20°C.

⁴**, coeficiente de correlación lineal, r, para 22 g de l., muy significativo, $P \leq 0,01$.

GATTA⁺. Por consiguiente, sólo *P. syringae* se encontraría asociada como epífita a la microflora del cerezo. Del mismo modo todas las cepas aisladas desde tejidos enfermos también fueron GATTA⁺ y corresponden por lo tanto a *P. syringae*. Ninguna de las cepas se identificó como *P. morsprunorum*, especie de real importancia como causante de cáncer bacteriano en cerezos (Crosse, 1966).

P. syringae se aisló con mayor frecuencia de las muestras provenientes de Curicó (Cuadro 1). En Santiago, *P. syringae* se aisló en una oportunidad el 21 de noviembre, y coincidió con una fuerte lluvia que, probablemente, favoreció el desarrollo de esta bacteria. Es posible que la mayor frecuencia con que se aisló *P. syringae* en Curicó se deba, en gran medida, a la mayor humedad, lluvia y rocíos, que normalmente caracterizan la zona de Curicó. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Freigoun y Crosse (1974) al demostrar que las poblaciones de *P. syringae* disminuyen bajo condiciones de baja humedad ambiental.

Los resultados de hipersensibilidad en tabaco y de las inoculaciones en cerezos (Cuadro 2) demuestran que la mayoría de las cepas son patogénicas. Sin embargo, existen diferen-

cias significativas ($P \leq 0,01$) en la virulencia de 15 cepas estudiadas (Cuadro 3), lo que sugiere que las poblaciones epifitas de *P. syringae* están constituidas por biotipos morfológicamente iguales, pero que presentan un comportamiento fisiológico en virulencia diferente.

Las cepas poseen, además, diferente habilidad para infectar cerezos según la concentración del inóculo. Las rectas obtenidas por análisis de regresión lineal, indican que en todos los casos la magnitud de las lesiones obtenidas aumentó al incrementar la concentración del inóculo (Figuras 1A, B, C y D). Sin embargo, se obtuvieron diferencias importantes en la magnitud de los incrementos de las rectas por unidad de incremento del inóculo, pendiente (b) de las rectas. De acuerdo con las pendientes obtenidas se pueden separar las cepas en dos grupos arbitrarios: cepas con una alta pendiente ($b = 0,369$) y cepas de baja pendiente ($b = 0,304$). Epidemiológicamente, la presencia de biotipos de alta o baja pendiente en una población epífita de *P. syringae* tiene especial importancia. Es posible que aquellos biotipos de menor pendiente pudieran, bajo condiciones de campo, iniciar una epífita con

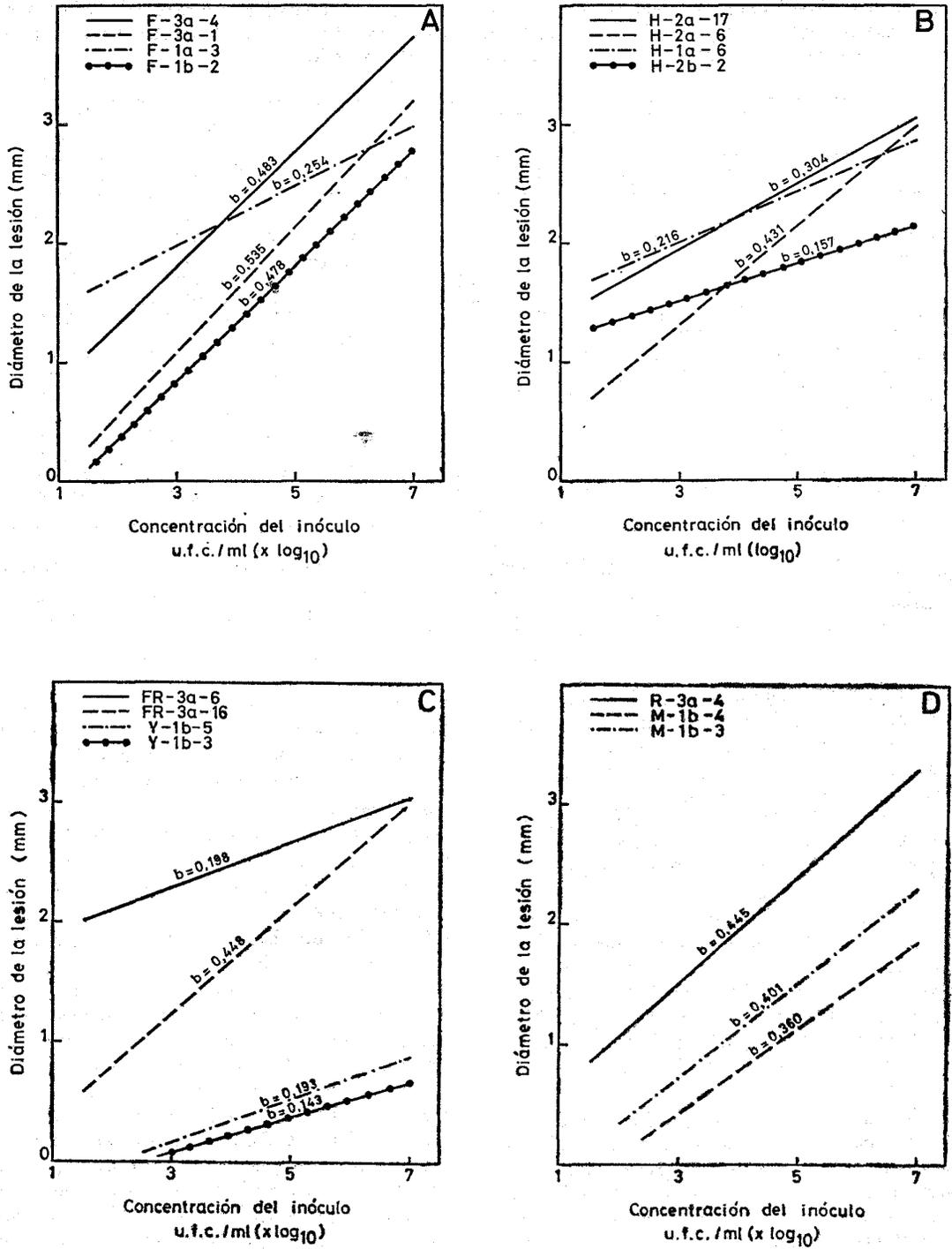


Figura 1 — Regresión lineal del diámetro de la lesión producida por *Pseudomonas syringae* en cerezas (Y), respecto del \log_{10} de la concentración del inóculo (X). A, cepas aisladas de flores (F). B, cepas aisladas de hojas (H). C, cepas aisladas de ramillas (R) y malezas (M).

niveles poblacionales inferiores a los requeridos por biotipos de gran pendiente.

El ajuste realizado sobre la base del modelo $Y = a + bx$ involucró asumir la existencia de una lesión de magnitud a cuando la concentración del inóculo $x = 0$. A pesar de este hecho, se prefirió este modelo respecto de $Y = bx$ por permitirnos una mejor visualización gráfica del fenómeno dentro del rango de las observaciones experimentales. Por este motivo, las extrapolaciones en ambos extremos de las rectas resultan imposibles y carentes de sentido biológico.

La imposibilidad de aislar *P. syringae* con una mayor frecuencia desde tejidos enfermos, sugiere que no existe correlación entre la presencia de canchales y gomosis, y la presencia de *P. syringae*. Por lo tanto, se concluye que los síntomas, canchales, gomosis y muerte de brazos y ramas, observados, no necesariamente se deben a cáncer bacteriano. Por el momento sería conveniente denominar "gomosis" y no cáncer bacteriano a dicho síndrome, hasta precisar el agente etiológico.

RESUMEN

En dos huertos de cerezos ubicados en Curicó y uno en Santiago se determinó la presencia epifita de *Pseudomonas syringae*, pero no de *P. morsprunorum*. La identificación se realizó esencialmente sobre la base de las pruebas consignadas como GATTA. La mayoría de las cepas provenientes de poblaciones epifitas fueron GATTA⁺, patogénicas en cerezas inmaduras e indujeron hipersensibilidad en hojas de tabaco. Diferencias significativas en virulencia se encontraron en 15 de estas cepas. Todas fueron patogénicas en cerezas a una concentración del inóculo equivalente a 10^7 u.f.c./ml. Sin embargo, difirieron significativamente en el tamaño de las lesiones producidas. La dilución del inóculo produjo una disminución progresiva en el tamaño de las lesiones. Algunas cepas perdieron rápidamente sus cualidades patogénicas en forma tal que a 10^5 u.f.c./ml no infectaron cerezas, mientras que otras cepas mantuvieron su capacidad patogénica aún a 10^1 u.f.c./ml. Estos resultados sugieren que las poblaciones epifitas de *P. syringae* estarían constituidas por biotipos diferentes en virulencia y con un comportamiento diferente a distintas concentraciones del inóculo. Epidemiológicamente, es de interés establecer la presencia de biotipos capaces de infectar cerezos a concentraciones de inóculo relativamente bajas los cuales podrían iniciar una epifitía, bajo condiciones de campo, con niveles poblacionales menores que los requeridos por biotipos que requieren concentraciones de inóculo relativamente altas.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas syringae* van HALL, FROM CHERRY TREES

Pseudomonas syringae, but not *P. morsprunorum* was detected as an epiphyte on two cherry orchards in Curicó and in other near Santiago, Chile. The identification of both species, was essentially made on the basis of the GATTA test. Most of the isolates recovered from plant surfaces were GATTA⁺, and they infected immature sweet cherry fruits and induced a hypersensitive reaction on tobacco. Significant differences ($P \leq 0.01$) were found in the size of the lesion produced by 15 GATTA⁺ isolates tested at 10^7 , 10^5 , 10^3 and 10^1 c.f.u./ml inoculum concentration. As the inoculum was diluted, the size of the lesion decreased. Some isolates did not infect fruits at 10^5 c.f.u./ml, in contrast with other isolates which were still pathogenic at 10^1 c.f.u./ml. These results suggest the presence of different biotypes within the epiphytic population of *P. syringae*. These biotypes are morphologically undistinguishable, but they are different in virulence and in their pathogenic behavior at different inoculum concentrations.

LITERATURA CITADA

- BAKER, L. A. E. 1966. Characteristics of the English isolates of *Pseudomonas syringae* van Hall from pear. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 292-300.
- CAMERON, H. R. 1962. Diseases of deciduous fruit trees incited by *Pseudomonas syringae* van Hall. *Technical Bulletin* 66, 64 p.
- CANCINO, L., LATORRE, B. and LARACH, W. 1974. Pear blast in Chile. *Plant. Dis. Repr.* 58: 568-570.
- CROSSE, J. E. 1966. Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. *Annu. Rev. Phytopathol.* 4: 291-310.
- and GARRET, C. M. E. 1963. Studies on the bacteriophage of *Pseudomonas mors-prunorum*, *P. syringae* and related organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 159-176.
- ENGLISH, W. H. and DAVIS, J. R. 1960. The source of inoculum for bacterial canker and blast of stone fruit trees. *Phytopathology* 50: 634 (Abstract).
- FREIGOUN, S. O. and CROSSE, J. E. 1974. Survival of bacteria on leaf surfaces. *Rep. East Malling Res. St. for 1973.* p. 133.
- JONES, A. L. 1971. Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant. Dis. Repr.* 55: 961-965.
- KING, E. O., WARD, M. K. and RANEY, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- KLEMENT, Z., FARKAS, G. L. and LOVREKOVICH, L. 1964. Hypersensitive 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.
- LATORRE, B. A. and JONES, A. L. 1978. Survival and pathogenicity to sour cherry of *Pseudomonas syringae* recovered from weeds and plant refuse. *Phytopathology News* 12: 137 (Abstract).
- and —————. 1979a. *Pseudomonas mors-prunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology* 69: 335-339.
- and —————. 1979b. Weeds and plant refuse as sources of inoculum for bacterial canker of cherry. *Phytopathology* 69 (Aceptado para publicación).
- LEBEN, C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 3: 209-230.
- LELLIOT, R. A., BILLING E. and HAYWARD, A. C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470-484.
- NELSON, R. R. 1973. Breeding plants for disease resistance, concepts and applications. *The Pennsylvania State University Press. University Park.* 401 p.
- ROMOLI, M. 1963. Cáncer bacterial de los frutales de hoja caduca. *Simiente.* 33: 25-28.
- SNEATH, P. H. A. 1956. Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 15: 70-98.
- WAISSBLUTH, M. E. and LATORRE, B. A. 1978. Source and seasonal development of inoculum for pear blast in Chile. *Plant Dis. Repr.* 62: 651-655.
- WAYNE, R. A. A. and DIRKS, V. A. 1978. Bacterial canker of sweet cherry in the Niagara peninsula of Ontario: *Pseudomonas* species involved and cultivar susceptibilities. *Can. J. Plant Sci.* 58: 363-369.