

UNIVERSITAS SCIENTIARUM

REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

Volumen 4 N° 2, Julio-Diciembre de 1997

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA





CONTROL DE ERWINIA UREDOVORA CON MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS EN CULTIVOS DE PYRUS SP. (PERO)

Miryam E. de Rico, Diana P. Parra y Sandra L. Baquero

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana
Cra. 7ª N° 43-82. A.A. 56710 Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia (Suramérica)

RESUMEN

Con el fin de disminuir el empleo de altas dosis de sustancias químicas, empleadas para el control de la enfermedad de tizón de fuego (*Erwinia uredovora*) en cultivos de *Pyrus* sp. (pero), se aislaron microorganismos antagonicos a partir de suelo rizosférico y cultivos sanos de esta planta. Para determinar el antagonismo *in vitro* de los microorganismos aislados frente a *Erwinia uredovora*, se emplearon los métodos de canal, disco y franja. Los mejores resultados se obtuvieron con el método de disco. Los halos de mayor diámetro de inhibición, los presentaron los microorganismos *Pseudomonas fluorescens biovar I* (16 mm), *Enterobacter agglomerans* (15 mm), y *Erwinia stewartii* (14 mm).

PALABRAS CLAVES: antagonismo, halos de inhibición, fitopatógeno, *Pyrus* sp., tizón de fuego.

ABSTRACT

In order to diminish the use of high doses of the chemical substances employed for the control of fire blight (*Erwinia uredovora*) in pear crops (*Pyrus* sp.), antagonistic microorganisms were isolated from the soil near healthy trees, from the rhizosphere, leaves, and stems of the same trees. To determine the antagonism *in vitro*, of these microorganisms against *Erwinia uredovora*, the following methods were used: channel, disk and strip. The best results were obtained with the disk method. The microorganisms which produced the largest inhibition halos were: *Pseudomonas fluorescens biovar I* (16 mm), *Enterobacter agglomerans* (15 mm) and *Erwinia stewartii* (14 mm).

INTRODUCCIÓN

El tizón de fuego o chamusco, producido por la bacteria *Erwinia uredovora*, en frutales de hoja caduca, se caracteriza por la aparición de pequeñas lesiones aguanosas sobre la parte infectada. La bacteria penetra en las flores a través de los estomas, nectarios y estigmas (Agrios 1988). En las hojas y frutos, el microorganismo penetra a través de los estomas y en las ramas por heridas recientes. Una vez en el interior de la planta, la bacteria se moviliza intracelularmente mediante espacios esquizógenos originados por la bacteria

misma al colapsar con células adyacentes a la masa bacteriana. (Erazo 1989, Franco 1993, Mayea 1993, Walker 1993). Cuando la infección primaria ocurre y avanza a través de los tejidos, produce exudado o lama, especialmente durante la floración, causando el ablandamiento y ennegrecimiento de los tejidos de la planta, la momificación del fruto y la pérdida total el cultivo (Batjer 1990, Gamboa 1982, Gerhard 1997, González *et al.* 1993, López 1994).

La bacteria *Erwinia uredovora* se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo perteneciente a la

familia *Enterobacteriaceae* (Noel 1994). En la mayoría de los medios de cultivo presentan colonias de aspecto mucoso, con bordes irregulares y color amarillo tenue. Metabólicamente tienen la capacidad de fermentar carbohidratos, reducir nitratos a nitritos y crecer con facilidad en medios de cultivo que contengan nitrógeno; además carecen de la enzima citocromo oxidasa (Billing 1993, Franco 1993, Walker 1993).

La diseminación de *Erwinia uredovora*, a partir de plantas enfermas ocurre rápidamente por acción del viento e insectos a plantas no infectadas que normalmente poseen las siguientes características: 1) bajo contenido de carbohidratos y alto contenido de nitrógeno, 2) crecimiento en condiciones de alta humedad y temperaturas entre 18°C y 30°C, y 3) crecimiento en suelos arcillosos con pH bajo (Agrios 1988, Magness 1997, Meehan 1996, Peffer 1991, Reed 1994, Reil 1998, Rosen 1993, Smith 1992, Waite 1998).

La enfermedad de tizón de fuego producida por la bacteria *Erwinia uredovora*, ha sido una de las más destructoras de frutales de hoja caduca en Europa y Estados Unidos, causando una disminución entre el 52% y el 60% en la producción, y pérdidas económicas hasta de 93%. (Johnson 1993, Wrather 1993). La difícil erradicación de esta bacteria y su rápida diseminación han constituido un obstáculo para lograr el control de la enfermedad. (Zhong-Min 1992).

De acuerdo a investigaciones realizadas por el Instituto Colombiano para la Reforma Agraria INCORA, se calcula que en Colombia existen más de 50.000 hectáreas aptas para el desarrollo de frutales de hoja caduca, ubicados a lo largo de ocho departamentos en la cordillera Oriental que presentan condiciones óptimas de altura entre 1.800 y 3.000 metros y temperatura entre 12°C y 18°C con una producción de 11.400 kg/ha (Campos 1989).

La enfermedad de tizón de fuego producida por *Erwinia uredovora* encontrada en cultivos de *Pyrus sp.* en nuestro país, ha demostrado la agresividad del microorganismo, causando la pérdida total del cultivo (González *et al.* 1993, Baquero *et al.* 1996). Este problema fitopatológico se ha tratado de controlar infructuosamente, utilizando

dosis cada vez más altas de sustancias químicas, las cuales han generado: 1) selección de microorganismos más resistentes y patógenos para los cultivos, 2) acumulación y persistencia de la sustancia tóxica en el producto cosechado (Billing 1993, Boccara 1990), y 3) graves desórdenes genéticos, intoxicaciones e infecciones en el hombre (Borden 1996, Bruner 1993) al igual que en animales reduciendo su productividad y fertilidad. (Coxe 1997, Downing 1995, Fisher 1995, Joel 1992, Johnson 1993, Zhong-Min 1992).

El estudio sobre control biológico de *Erwinia uredovora* se ha incrementado en los últimos años en países como Estados Unidos, Canadá y Alemania. Sin embargo, en Colombia hasta ahora se está incursionando en este campo. (Baquero *et al.* 1996, González *et al.* 1993).

En el diagnóstico de necesidades del sector agrícola, el control de las enfermedades en las plantas por medio de microorganismos antagonistas, se presenta como una alternativa para mejorar la producción, sin causar alteraciones biológicas y aportando tecnología ambientalmente sana para el aprovechamiento sostenible de los recursos biológicos. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar microorganismos presentes en el suelo rizosférico, suelo y material de cultivos sanos de *Pyrus sp.*, que presentaran actividad inhibitoria para *Erwinia uredovora*, bacteria causante de la enfermedad de tizón de fuego.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reconocimiento fitosanitario

Se realizó el reconocimiento fitosanitario del cultivo de *Pyrus sp.*, conformado por 120 árboles, sembrados en un área de 200m², ubicado en la finca "Chuqua Puyana" en el municipio de Soacha, Cundinamarca, a 2.600 metros de la altura, con temperatura entre 8°C y 15°C.

Toma de muestras

De este cultivo de *Pyrus sp.*, se seleccionaron los 12 árboles más afectados por el fitopatógeno. De cada uno de los árboles seleccionados se tomaron muestras empleando

bisturí estéril a partir de racimos de flores de color pardo con marchitamiento y muerte, al igual que de raíz, brotes vegetativos, hojas y frutos inmaduros de aspecto aceitoso y color negro. Las muestras se transportaron en bolsas plásticas estériles dentro de neveras de icopor, para ser procesadas antes de tres horas.

Procesamiento de las muestras

Los fragmentos de material vegetal fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 5 minutos y lavados con agua estéril en tres pases, antes de ser colocados sobre la superficie de los medios de cultivo. Las muestras fueron sembradas en medios de: agar infusión cerebro corazón, agar nutritivo y agar extracto de levadura - dextrosa - carbonato de calcio (YDC), e incubadas a 32°C durante 48 horas.

Identificación de los microorganismos

Para el diagnóstico de los microorganismos obtenidos en los medios de cultivo, se observaron las características macroscópicas de las colonias, se realizaron frotis y coloración de Gram, como también una identificación metabólica. Para esta identificación metabólica, se emplearon pruebas para determinar la fermentación de maltosa, sorbitol, manitol, lactosa y xilosa, y se estableció si producían fermentación incompleta o butilenglicólica (Voges Proskauer) o fermentación ácido mixta (rojo de metilo). Se analizó la producción enzimática de Dnasa, catalasa, gelatinasa, ureasa, citocromo oxidasa, como también la producción de indol y H₂S. (Noel 1994). El inóculo de *Erwinia uredovora* se preparó en concentración de 1.2 x 10⁶ UFC/ml, empleando el tubo número cuatro de la escala de MacFarland. Se inocularon nueve plántulas de *Pyrus* sp. (pera), de tres meses de edad, 30 cm de altura, y certificadamente sanas, con 0.5 ml de la suspensión bacteriana de *Erwinia uredovora* empleando una jeringa de insulina. La inoculación se realizó a nivel de tallo y ramas con intervalos de tres días, hasta completar 2.0 ml. Como control del experimento, se

inocularon nueve plántulas de *Pyrus* sp. certificadamente sanas, con agua destilada estéril. Las plántulas se observaron diariamente hasta la aparición de las lesiones características de tizón de fuego, lo cual fue evidente a los veinte días de la inoculación. Se realizaron cultivos de las partes de las plántulas afectadas por el tizón de fuego en los siguientes medios: agar nutritivo, agar infusión cerebro corazón y medio de YDC. Los medios se incubaron a 32°C durante 24 horas. Las bacterias obtenidas en los medios de cultivo, se identificaron por medio de la observación macroscópica de las características de las colonias, frotis y coloración de Gram y el correspondiente estudio metabólico. (Tabla 1).

Reacciones bioquímicas	<i>Erwinia uredovora</i>
Citocromo Oxidasa	Negativa
Producción de H ₂ S	Negativa
Nitratos	Positiva
Indol	Negativo
Malonato	Positivo
LIA	K/K
TSI	K/A
Urea	Negativo
Gelatina	Negativo
Lactosa	Negativo
Sacarosa	Positivo
Glucosa	Positivo
Inositol	Negativo
Maltosa	Positivo
Xilosa	Positivo
Arabinosa	Positivo
OF	Fermentador
Dnasa	Positivo
Bilis Esculina	Negativo
Rojo de metilo	Negativo
Voges Proskauer	Positivo

Tabla 1. Identificación bioquímica de *Erwinia uredovora*

Obtención de antagonistas

Para la obtención de microorganismos antagonistas de *Erwinia uredovora*, se emplearon plantas sanas de *Pyrus* sp., a partir de las cuales se tomaron muestras de hojas y tallos, muestras de suelo rizosférico y muestras de suelo lejos de la raíz. Para las muestras de suelo rizosférico, se intro-

dujo una pala estéril en posición vertical alrededor de la raíz, a una distancia de 5 cm y una profundidad de 20 cm en tres partes equidistantes, obteniendo así una capa de suelo alrededor de la raíz de aproximadamente 1 mm de espesor.

Para tomar la muestra de suelo lejos de la raíz, se recogió una muestra con espátula estéril a una profundidad de 40 cm. y a una distancia de 5 cm del árbol. Todas las muestras tomadas se pusieron independientemente en bolsas plásticas estériles, selladas y marcadas para ser transportadas al laboratorio y luego ser procesadas antes de tres horas. Se pesaron 10 g de cada una de las muestras tomadas anteriormente, se suspendieron en 90 ml de agua destilada estéril y se agitaron durante 20 minutos. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones de hasta 10^{-7} . Se sembró 1.0 ml de cada una de las diluciones, comenzando por la dilución 10^{-4} en medios de Mac Conkey y agar nutritivo. El inóculo se distribuyó sobre toda la superficie del agar, se dejó secar durante media hora, y luego se incubó a 32°C por 24 horas. (Koneman 1985, Mayea 1993). Las colonias bacterianas obtenidas en los medios de Mac Conkey y agar nutritivo, se repicaron independientemente en medios de agar nutritivo y de Mac Conkey, para obtener cultivos puros.

Pruebas de antagonismo

Los microorganismos puros, fueron enfrentados a la cepa de *Erwinia uredovora*, en agar nutritivo (Neira 1995). Para el enfrentamiento de la *Erwinia uredovora* con los posibles microorganismos antagonicos se ensayaron los métodos de disco, canal y franja.

Para realizar el método de disco, se prepararon emulsiones de *Erwinia uredovora*, en concentración de 1.2×10^8 y 1.5×10^8 UFC/ml empleando para esto los tubos 4 y 5 del patrón de MacFarland. Se realizaron emulsiones de los posibles microorganismos antagonicos, en concentraciones de: 1.5×10^8 , 1.8×10^8 , 2.4×10^8 y 3.0×10^8 UFC/ml, comparados con los tubos 5, 6, 8 y 10 del patrón de MacFarland. Con una perforadora se hicieron discos de papel absorbente de 6 mm de diámetro, se empacaron en tubos de ensayo y se esterilizaron en horno durante dos horas a 160°C . Los discos estériles se sumergieron en cada

una de las emulsiones preparadas con los posibles microorganismos antagonicos, y se secaron en una estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas. Con las concentraciones 1.2×10^8 y 1.5×10^8 de *Erwinia uredovora*, se hicieron siembras masivas en agar nutritivo, y sobre la superficie sembrada se colocaron los discos impregnados con las concentraciones 1.5×10^8 , 1.8×10^8 , 2.4×10^8 y 3.0×10^8 , de los posibles microorganismos antagonicos. El medio de agar nutritivo se incubó a 32°C durante tres días. La lectura de inhibición del crecimiento de *Erwinia uredovora* por parte de los microorganismos antagonicos se hizo por observación macroscópica de halos de inhibición mayores de 10 mm de diámetro, al rededor de los discos impregnados con los antagonistas (Lennette 1994). Para realizar el método de canal, se realizó un orificio de 5 mm de ancho por 2 cm de longitud y 2 mm de profundidad con cuchilla de bisturí estéril sobre la superficie del medio de agar nutritivo. Se sembró masivamente sobre toda la superficie del medio con *Erwinia uredovora* en concentraciones de 1.5×10^8 y 1.8×10^8 , y a cada medio se adicionó en el canal 0.5 ml de los posibles microorganismos antagonicos en las siguientes concentraciones: 1.5×10^8 , 1.8×10^8 , 2.4×10^8 y 3.0×10^8 . Los medios se llevaron a incubar a 32°C durante dos días, hasta observar el desarrollo de *Erwinia uredovora* y las zonas de inhibición cercanas al canal.

Para realizar el método de franja, se sembró masivamente *Erwinia uredovora* en concentraciones de 1.2×10^8 y 1.5×10^8 en medio de agar nutritivo y se incubaron a 32°C durante media hora. Sobre la siembra masiva, se realizó una franja en el centro del medio de cultivo con un escobillón impregnado con los posibles microorganismos antagonicos en las concentraciones de 1.5×10^8 , 1.8×10^8 , 2.4×10^8 y 3.0×10^8 . Los medios se incubaron a 32°C durante dos días, hasta observar el crecimiento masivo de *Erwinia uredovora* y las zonas de inhibición del crecimiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar, con doce tratamientos, (tres microorganismos y cuatro concentraciones), tres repeticiones y dos unidades experimentales por repetición. La unidad experimental fue el medio de cultivo con

el patógeno. La variable de respuesta fue la inhibición del crecimiento, y la variable independiente fueron las bacterias antagonicas. Se efectuó un análisis de varianza factorial complementado con una prueba de comparación múltiple de Tukey utilizando un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó un análisis de χ_2 (chi - cuadrado) para comparar los resultados de los métodos de franja y canal (Daniels 1984).

RESULTADOS

Las nueve plántulas de *Pyrus* sp. inoculadas con *Erwinia uredovora* con sintomatología característica de tizón de fuego, presentaron los primeros síntomas de la enfermedad a los 20 días. Aparecieron manchas amarillas en las hojas, que a los pocos días se extendieron a las hojas de un mismo espolón o de las ramitas cercanas. El color de las manchas cambió a pardo a lo largo de la nervadura central y nervaduras principales así como en los bordes, entre las nervaduras y en el tallo, hasta producir enrollamiento y muerte de las hojas.

Al realizar los cultivos en agar nutritivo y YDC, a partir de muestras de hojas y tallos, que presentó sintomatología con crecimiento de colonias mucoides de bordes irregulares y color amarillo tenue. Al examen microscópico con coloración de Gram se observaron bacilos Gram negativos. La identificación metabólica de las colonias obtenidas correspondió a *Erwinia uredovora*, comprobándose así los postulados de Koch.

Identificación de los microorganismos antagonicos

En los cultivos de agar nutritivo y Mac Conkey, realizados de suelo rizosférico, suelo y cultivos sanos de *Pyrus* sp., crecieron varios tipos de colonias con características macroscópicas diferentes. De todas las colonias obtenidas en los cultivos y enfrentadas a *Erwinia uredovora*, para determinar antagonismo, sólo tres colonias presentaron halos superiores a 10 mm de diámetro. Estas colonias fueron seleccionadas y denominadas microorganismos I, II y III para su posterior identificación bioquímica.

Microorganismo I. El aspecto macroscópico del crecimiento fue de colonias de consistencia cremosa bordes irregulares y color amarillo tenue. Con la coloración de Gram, se observaron bacilos Gram negativos y se identificó bioquímicamente como *Erwinia stewartii* (tabla 2) (Noel 1994).

Microorganismo II. El aspecto macroscópico del crecimiento fue de colonias de aspecto seco, opacas, bordes irregulares y pequeñas. Con la coloración de Gram, se observaron bacilos Gram negativos, y se identificó bioquímicamente como *Pseudomonas fluorescens biovar I* (tabla 2) (Noel 1994).

Microorganismo III. El aspecto macroscópico del crecimiento fue de colonias mucoides, bordes irregulares y color amarillo tenue. Con coloración de Gram, se observaron bacilos Gram negativos y se identificó bioquímicamente como *Enterobacter agglomerans* (tabla 2) (Noel 1994).

Los resultados de la inhibición del crecimiento de *Erwinia uredovora*, en concentración 1.5×10^8 UFC/ml, por las bacterias antagonistas *Erwinia stewartii*, *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas fluorescens biovar I*, mostraron que el menor diámetro del halo de inhibición, lo presentó *Erwinia stewartii* en concentración de 1.8×10^8 UFC/ml, con un halo de inhibición de 14 milímetros, seguido por *Enterobacter agglomerans* en una concentración de 1.8×10^8 UFC/ml, con un halo de inhibición de 15 milímetros y *Pseudomonas fluorescens biovar I*, en una concentración de 1.8×10^8 UFC/ml, con un halo de inhibición de 16 milímetros (tabla 3).

Con los métodos de canal y franja, las lecturas no fueron reproducibles, y la inhibición producida por el microorganismo antagonico no se observó con claridad.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten establecer la existencia de microorganismos antagonicos contra *Erwinia uredovora*

Reacciones bioquímicas	<i>Pseudomonas fluorescens biovar I</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>
Hidrólisis de gelatina	Positivo	Negativo
Ureasa	Positivo	Negativo
H ₂ S	Negativo	Negativo
Fenilalanina	Negativo	Negativo
Lactosa	Negativo	Positivo
Maltosa	Negativo	Positivo
Manitol	Negativo	Positivo
Xilosa	Negativo	Positivo
Glucosa	Positivo	Positivo
Indol	Negativo	Positivo
Nitratos	Positivo	Negativo
Rojo de Metilo	Negativo	Positivo
Voges Proskawer	Negativo	Negativo
Movilidad	Positivo	Positivo

Tabla 2. Identificación bioquímica de los microorganismos antagonistas aislados

en el suelo rizosférico, en el suelo lejos de la raíz, y en el material vegetal de cultivo sanos de *Pyrus* sp.

Los microorganismos seleccionados en el presente trabajo que presentaron los mayores halos de inhibición de crecimiento frente a la bacteria *Erwinia uredovora*, cumplen una función de protección en la plantación, ya que fueron aislados de material de cultivos sanos. Estos mismos microorganismos estuvieron ausentes en las muestras tomadas en el cultivo de *Pyrus* sp. afectados

Microorganismo antagonista	halo de inhibición en mm + e.s. (n)
<i>Erwinia steewartii</i>	14 + 0 (24)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	15 + 0.6 (24)
<i>Pseudomonas fluorescens biovar I</i>	16 + 0.6 (24)

Tabla 3. Diámetro promedio de los halos de inhibición por la acción antagonista de los microorganismos aislados contra *Erwinia uredovora* a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml. La concentración de microorganismos antagonistas fue en todos los casos 1.8×10^8 UFC/ml

por el tizón de fuego (finca "Chuqua Puyana"). Es indispensable realizar una cuidadosa selección de los microorganismos antagonistas, ya que como se pudo determinar en este trabajo, existen numerosas especies microbianas presentes en el cultivo, pero su actividad inhibitoria es muy escasa presentando halos de inhibición menores de 10 mm, lo cual no garantiza un efectivo antagonismo cuando estos microorganismos son empleados a nivel de campo (Neira 1995).

Por lo tanto recomendamos el uso de los siguientes microorganismos como potenciales controladores del tizón de fuego, ya que presentaron halos de inhibición a partir de 14 mm: *Erwinia steewartii*, con 14 mm, *Enterobacter agglomerans* con 15 mm y *Pseudomonas fluorescens biovar I*, con 16 mm.

Se pudo determinar que el mejor método, para investigar el antagonismo bacteriano, fue el de disco, por producir halos de inhibición claramente definidos y fáciles de medir. Por el contrario, los métodos de canal y de franja, resultaron inexactos y poco confiables debido a que la técnica de abertura del canal con cuchillas de bisturí, no produce uniformidad conllevando a inexactitudes en la cantidad de inóculo.

El método de franja tampoco presentó resultados confiables, debido a que probablemente,

Efectos principales	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
A: Tipo bacteria	58333	2	29167	512	
B: Con antagonista	301.8333	3	100.61111	176.683	0001
C: Con <i>Erwinia uredovora</i>	256.88889	1	256.88889	451.122	0001
Interacciones					
AxB	6.08333	6	1.013889	1.780	.1232
AxC	3.86111	2	1.930556	3.390	.0420
BxC	133.00000	3	44.333333	77.854	.0001
AxBxC	7.91667	6	1.319444	2.317	.0480
Residuo	27.33333	48	.569444		
Total	737.500000				

Tabla. 4 Análisis de varianza para los halos de inhibición de los microorganismos antagonicos contra *Erwinia uredovora*

en el momento de realizar la siembra o franja con el microorganismo antagónico, se retiró una fracción de la población de *Erwinia uredovora*. Esto puede alterar las proporciones entre los dos microorganismos, presentando líneas de inhibición de crecimiento de *Erwinia uredovora*, poco definidas, irregulares y difíciles de medir a lo largo de la franja del microorganismo antagónico. Finalmente, con los tres métodos ensayados, se pudo establecer claramente que entre mayor es la concentración del microorganismo antagónico, menor es el halo de inhibición.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana, a las doctoras Cielo Orozco (fitopatóloga del INDERENA) y Ana Beatriz Bustillo (docente de Microbiología Agrícola de la Pontificia Universidad Javeriana), por su constante asesoría. También queremos agradecer a la Dra. Isabel Wilianson, propietaria de la finca, "Chuqua Puyana", en la que se encuentra la plantación de *Pyrus* sp., afectada con tizón de fuego, por permitir el reconocimiento fitosanitario y la toma de las muestras.

LITERATURA CITADA

AGRIOS, G. 1988. Fitopatología. Segunda edición, Editorial, Academic Press, Nueva York, págs. 322-525.

BAQUERO S., PARRA, D. Y ESCÓBAR, M. 1996. Control biológico con microorganismos antagonicos causantes de tizón de fuego en caducifolios. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

BATJER, C. 1990. Cultivo comercial de la pera. Frutales. *Revista del ICA* 15: 165-169.

BILLING, E. 1993. Laboratory diagnosis fire blight and bacterial blossom blight of pear. *Plant* 71: 185-216.

BOCCARA, V. 1990. Regulation and role in pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology* 38: 408-415.

BRUNER, E. 1993. Studies of the resistance of twenty - five pear varieties to fire blight, with special reference to methods of inoculation and evaluation. Cornell Univ. M.S. Thesis.

- CAMPOS, T. 1989. Historia de los frutales de hoja caduca en Colombia, *Memorias del seminario de caducifolios*, Bogotá, SIAC, 6 págs.
- COXE, W. 1997. Pears and his cultivation. *Phythopatology* 32: 175-176.
- DANIELS, W. 1984. Bioestadística. Segunda edición, Editorial. Interamericana, México, págs. 126-133.
- DOWNING, A. 1995. Pear diseases. *Fruits var. Journal* 23: 322-329.
- ERAZO, B. 1989. Factores de clima en Colombia y su influencia en la producción de caducifolios, *Memorias seminario caducifolios*, Bogotá, 20 págs.
- FISHER, G. 1995. Fisiología del reposamiento invernal de los frutales caducifolios. *Frutales de clima frio* 71: 759-771.
- FRANCO, A. 1993. Enfermedades infecciosas de los cultivos. Primera edición, Editorial. Trillas. México, págs. 165-184.
- GAMBOA, F. 1982. Respuesta agronómica del cultivo del peral *Pyrus* sp., a niveles y grados comerciales de fertilizantes en Nuevo Colón. Trabajo de grado. UPTC, Tunja, Colombia.
- GERHARD, H. 1997. Frutales de clima frío. *Revista del ICA*. 11: 43-48.
- GONZÁLEZ G., MONTAGUT, M. Y ESCOBAR, M. 1993. Determinación de *Erwinia* sp. causante de tizón de fuego en *Malus* sp. (manzana) y *Pyrus* sp. (pera), en el altiplano cundiboyacense. *Memorias XIV Congreso Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines*. ASCOLFI, Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia, 8 págs.
- JOEL, L. 1992. Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh 252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology* 174: 2785 - 2996.
- JOHNSON, K. 1993. Effect antagonistic bacteria on establishment of honey bee - dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. *Phytopathology* 83: 995-1002.
- KONEMAN, A. 1985. Microbiología. Segunda edición, Editorial. Interamericana. México. Págs. 120-122.
- LENNETTE, E. 1994. Manual of clinical microbiology. Segunda edición, Editorial American Society for Microbiology, Washington, págs. 126-132.
- LÓPEZ, O. 1994. Empleo químico y micorrizas en la recuperación del peral (*Pyrus* sp.), en Sotaquirá, Boyacá, segunda parte, trabajo de grado UPTC, Tunja, Colombia.
- MAGNESS, J. 1997. Breeding apples and pears. *American Journal Society* 21: 57-60.
- MAYEA, S. 1993. Introducción a la microbiología del suelo. Primera edición, Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, págs. 20-35.
- MAYEA, S. 1993. Bacterias y hongos patógenos. Segunda edición, Editorial Pueblo y Educación, La Habana, 156 págs.
- MEEHAN, T. 1996. Diseases of pear. *Amer. Pomol. Soc. Proc.* 11: 57-60.
- NEIRA, S. 1995. Control de agalla de corona en *Eucaliptus globulus labill* con microorganismos antagonicos nativos. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
- NOEL, R. 1994. Bergey's manual of systematic bacteriology. Family Enterobacteriaceae. Octava edición, Editorial. Williams & Wilkins, Baltimore, págs. 469-476.
- OROZCO, T. 1989. Historia de los frutales de hoja caduca en Colombia. *Memorias seminario caducifolios*, Bogotá, SIAC, 21 págs.
- PEFFER, G. 1991. Apple tree blossoms blight. *Phytopathology* 5: 32-48.
- REED, G. 1994. An unusual outbreak of apple blossom blight. *Phytopathology* 4: 27-30.

ROSEN, H. 1993. Overwintering of the fire blight pathogen. *Ark. Agr. Exp. Sta.* 244: 301-302.

WAITE, M. 1998. Pear blight and its treatment life history of the disease. *Phytopathology* 54: 38-49.

WALKER, J. 1993. Patología vegetal. Cuarta edición, Editorial Omega, Barcelona, España, págs. 123-179.

WRATHER, J. 1973. Protection of apple and pear fruit tissue against fire blight with non pathogenic bacteria *Phytopathology* 21: 1075-1077.

ZHONG-MIN, R. 1992. Elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 257: 85-88.