



2022
Lleida

27·1
junio · juny
julio · juliol

Cataluña
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Cataluña | Catalunya · 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022
ISBN 978-84-941695-6-4
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Conservación y mejora genética de *Pyrus bourgaeana* y otras rosáceas frente al fuego bacteriano en la provincia de Toledo

ÁVILA, A.¹, SANCHO, R.², SANTACRUZ, F.², ÁLVAREZ, B.³, ESPINOSA, M.⁴, LÓPEZ-CARRASCO, C.⁵ y PÉREZ, A.⁵

¹Montarsa medioambiente S.L.

²Laboratorio Regional Agroalimentario y Ambiental de Castilla-La Mancha. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

³Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario. IMIDRA.

⁴Dirección General del Medio Natural y Biodiversidad. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

⁵Delegación Provincial de la Consejería de Desarrollo Sostenible en Toledo. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

Resumen

En 2010 fue detectada la enfermedad denominada fuego bacteriano, causada por la bacteria fitopatógena *Erwinia amylovora*, en *Pyrus bourgaeana* (peral silvestre), en distintos términos municipales de Castilla-La Mancha. Debido a que esta enfermedad se ha descrito también en otros géneros de árboles silvestres como *Malus* (manzano), *Crataegus* (majuelo), *Cydonia* (membrillo) y *Sorbus*, en 2018 se realizó una prospección por toda la provincia de Toledo para evaluar la extensión e incidencia de la enfermedad en las distintas especies silvestres de rosáceas. Solo los análisis de las muestras de piruétanos resultaron ser positivos a la enfermedad.

Las medidas de control del fuego bacteriano para evitar su expansión y erradicación en condiciones naturales son muy complicadas. Por lo que la alternativa más prometedora a medio y largo plazo para el control de la enfermedad y la conservación de los piruétanos es, sin duda, la selección de individuos resistentes o tolerantes a la bacteria.

En este sentido se han seleccionado árboles candidatos de piruétanos con posible tolerancia al fuego bacteriano, para su conservación *ex situ* y para su posible incorporación en un programa de mejora genética adaptado a las condiciones particulares de una zona y con tolerancia al fuego bacteriano.

Palabras clave

Erwinia amylovora, piruétanos, selección, resistencia, tolerancia.

1. Introducción

La conservación de la biodiversidad forestal, que comprende los recursos genéticos forestales, es fundamental para el mantenimiento del valor productivo de los bosques, del estado sanitario y de la vitalidad de los ecosistemas forestales y, con ello, mantener sus funciones protectoras, ambientales y culturales.

La Estrategia Española para los Recursos Genéticos Forestales (ERGF) establece en su Anexo 1 como especies prioritarias para la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos forestales, dentro de la familia de las Rosáceas, a *Amelanchier ovalis*, *Pyrus* spp., *Cotoneaster* spp., *Crataegus* spp., *Prunus* spp., *Malus sylvestris* y *Sorbus* spp. En España, las especies silvestres de los géneros *Crataegus*, *Sorbus*, *Rubus* y *Pyrus* presentan un alto interés paisajístico, son importantes para la fauna y, en algunos casos, son especies endémicas.

Actualmente la conservación de las poblaciones de especies silvestres de estas rosáceas se encuentra gravemente comprometida debido al cambio climático, a la conversión de los terrenos donde se asientan para otros usos y, sobre todo, a la enfermedad denominada fuego bacteriano.

Esta enfermedad está causada por la bacteria denominada *Erwinia amylovora* (Burril.) Winslow et al., que es considerada como organismo de cuarentena de zonas protegidas en la Unión Europea (UE), ha sido identificada en la mayoría de los países del centro y norte de Europa y, en los últimos veinte años, también se ha extendido por los países del Mediterráneo. En España se han detectado diversos focos desde 1995 en distintos huéspedes en varias Comunidades Autónomas y, en todos los casos, se han aplicado programas intensivos de erradicación, siguiendo las directrices de la UE, no obstante, la mayor parte de la península se encuentra fuera de zona protegida. En Castilla-La Mancha se detectó en 2010 en terrenos forestales y actualmente toda la comunidad se considera zona no protegida para la enfermedad.

Así, en un esfuerzo por conservar los recursos genéticos, se inició un programa de conservación y mejora genética de *Pyrus bourgaeana* y otras rosáceas al fuego bacteriano en la provincia de Toledo.

2. Objetivos

Los objetivos fueron los siguientes:

- 2.1. Realizar un muestreo de poblaciones de distintas especies de rosáceas silvestres para detección y análisis de la enfermedad
- 2.2. Seleccionar ejemplares de piruétanos con posible resistencia o tolerancia a *E. amylovora* para su conservación *ex situ*

3. Metodología

3.1. Muestreo y selección de árboles tolerantes

Teniendo en cuenta la coexistencia de huéspedes y patógenos se buscaron individuos tolerantes en diversas áreas de la provincia de Toledo, considerando que existiera una amplia variación intraespecífica. Para ello se realizaron prospecciones en diversas zonas donde se observaron síntomas de la enfermedad o previamente se había detectado la presencia de la bacteria. La selección también se centró en individuos asintomáticos o con síntomas leves de fuego bacteriano (Figura 1). Los individuos seleccionados fueron fotografiados, etiquetados con una ficha y marcada su localización GPS. Además, se recogieron datos sobre su morfología, tales como altura y diámetro basal.



Figura 1. Selección de individuos tolerantes en focos de enfermedad.

3.2. Conservación, multiplicación y mantenimiento de piruétanos seleccionados en campo

De los piruétanos candidatos, se recogieron frutos y se extrajo la semilla para su siembra en alveolos forestales en invernadero para conservación *ex situ* y para realizar ensayos de inoculación y así, confirmar o descartar su tolerancia a la enfermedad. La recolección de los frutos se realizó en la época de maduración, cuando el vigor, la tolerancia a la desecación y la longevidad de las semillas se encontraban en los niveles más altos. Las semillas fueron extraídas de los frutos inmediatamente después de la recolección. Una vez extraídas, se colocaron en una malla de nylon y se desinfectaron con lejía al 10 % durante 12 h. Transcurrido el tiempo se aclararon con abundante agua y se secaron hasta el punto de equilibrio, en un ambiente controlado entre 5-20 °C y con una humedad relativa del 10-25 % durante al menos 3 d. Las semillas, una vez secas, se depositaron en un recipiente hermético y, tras un periodo de estratificación en caliente 20 °C (2-4 semanas) + en frío 5 °C (12-16 semanas), fueron sembradas en alveolos forestales de 200 cc con mezcla de turba y sustrato 1:1 y se dispusieron las bandejas en el invernadero a una temperatura entre 20-22 °C.

3.3. Toma y análisis de muestras

En algunos ejemplares de rosáceas tales como piruétanos, majuelos, sorbus y membrillos, localizados en focos con síntomas de fuego bacteriano, se recogieron brotes, frutos, tallos y hojas en bolsas estériles en verano y a principios del otoño y se conservaron en frío hasta la llegada al laboratorio para la detección del agente causal.

3.3.1. Elaboración de los extractos vegetales

Las muestras se conservaron a una temperatura entre 4–8°C hasta su procesado en el laboratorio. Para la elaboración de los extractos vegetales se seleccionaron cuidadosamente en condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica, brotes, ramillas u hojas procedentes de las muestras con síntomas típicos de fuego bacteriano. El tejido vegetal de cada una de estas muestras se cortó del frente de avance de las lesiones de la enfermedad, hasta un peso final entre 0,5–1,0 g y se machacó suavemente en un tampón de maceración antioxidante (20 g de polivinilpirrolidona [PVP]-10, 10 g de manitol, 1,76 g de ácido ascórbico, 3 g de glutatión reducido y 1 litro de solución salina tamponada [PBS] 10 mM, pH 7,2; esterilizado por filtración) (GORRIS et al., 1996), PBS estéril pH 7,2 (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,9 g de Na₂HPO₄·12H₂O, 0,2 g de KH₂PO₄ y 1 litro de agua destilada). Se transfirieron al menos tres alícuotas de cada extracto a tubos de microcentrífuga estériles: uno de los tubos se almacenó a –20 °C para realizar posteriormente extracción de ADN y análisis mediante PCR; en otro de los tubos se añadió glicerol hasta un contenido del 30 % (v/v) y se almacenó a –20 °C para usarlo en una prueba de confirmación en caso necesario. El tercer tubo se conservó en hielo para llevar a cabo el aislamiento en los medios de cultivo sólidos y el enriquecimiento en medio líquido.

3.3.2. Aislamiento en placa

Se prepararon dos medios de cultivo: el medio semiselectivo CCT según ISHIMARU & KLOS (1984) y el medio general B de King (KB) según KING et al. (1954). Para el aislamiento en placa, se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 de cada extracto vegetal en PBS, y se sembraron 100 µl tanto del extracto vegetal como de las dos diluciones decimales seriadas, en cada uno de los dos medios, que se incubaron a 25 °C durante 72–96 h. Tras la incubación se realizó la purificación e identificación de las colonias con morfología típica y/o similar a *E. amylovora* mediante la obtención de cultivos puros por dilución y siembra en triple estría en medio KB y PCR cromosómica de detección específica. En este tipo de PCR, el gen que se detecta está localizado en el cromosoma de la bacteria y, por lo tanto, su presencia es estable, a diferencia de los genes localizados en plásmidos, que pueden ganarse o perderse en las diferentes generaciones celulares.

3.3.3. Enriquecimiento en medio líquido

Los extractos vegetales fueron incubados en medio líquido de enriquecimiento semiselectivo CCT, preparado con caldo nutritivo en lugar de agar nutritivo (GORRIS et al., 1996). De esta manera, volúmenes de 1 ml de cada uno de los extractos se añadieron a volúmenes de 1 ml de medio CCT líquido en tubos estériles de 10–15 ml, para obtener unas buenas condiciones de aireación. Los tubos se incubaron a 25 °C durante 48–72 h sin agitación, tras lo cual se sembraron placas de cultivo de CCT sólido por el procedimiento de la triple estría, tanto a partir de los tubos de enriquecimiento como de sus diluciones 1:10, 1:100 y 1:1.000 preparadas en PBS, por triplicado, para obtener colonias aisladas. Las placas de cada muestra se incubaron a 25 °C durante 72–96 h y se realizó la purificación e identificación de las colonias con morfología típica y/o similar a *E. amylovora* mediante la obtención de cultivos puros por dilución y siembra en triple estría en medio KB y PCR cromosómica de detección específica.

3.3.4. Extracción de ADN de las colonias

Tras las lecturas de las placas de cultivo en los dos medios sólidos y la selección y purificación de las colonias con morfología típica y/o similar a *E. amylovora*, dichas colonias se prepararon para la realización posterior de PCR específica. Para ello, se tomaron masas bacterianas de cada una de las colonias y se realizaron suspensiones en 500 µl de agua ultrapura estéril libre de nucleasas, que se calentaron a 100 °C durante 10 min. Este tratamiento térmico favorece la creación de poros en las paredes celulares de las bacterias y la salida de su ADN al medio exterior.

3.3.5. Extracción de ADN de los extractos vegetales

La extracción de ADN se realizó por el método de LLOP et al. (1999). Para ello, 1 ml de cada uno de los extractos vegetales obtenidos y 1 ml de cultivo líquido de medio de enriquecimiento de cada una de las muestras se centrifugaron separadamente a 10.000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se desecharon y los sedimentos se resuspendieron en 500 µl de tampón de extracción (24,2 g de Tris-HCl, pH 7,5; 14,6 g de NaCl; 9,3 g de ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]; 5 g de dodecilsulfato sódico [SDS]; 20 g de PVP-10 y 1 litro de agua destilada; esterilizado por filtración). Los tubos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4.000 g durante 5 min. Se mezclaron aproximadamente 450 µl de cada sobrenadante con el mismo volumen de isopropanol invirtiendo los tubos de la mezcla, y se dejaron a temperatura ambiente entre 30 min y 1 h. Los ADNs precipitados se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min y se dejaron secar tras descartar los sobrenadantes. Si se observó algún precipitado de color pardo o verde, se retiró con cuidado con el fin de obtener un sedimento de ADN más limpio. Los ADNs se resuspendieron en 200 µl de agua ultrapura estéril libre de nucleasas y se conservaron a -20 °C hasta la realización de la PCR.

3.3.6. Detección molecular por PCR a tiempo final

Los ensayos de PCR se realizaron con ADNs de cuatro orígenes, para cada una de las muestras: (1) suspensiones de las colonias de morfología típica y/o similar a *E. amylovora* aisladas en los dos medios de cultivo sólidos por siembra directa de los extractos vegetales y sus diluciones, (2) suspensiones de las colonias de morfología típica y/o similar a *E. amylovora* aisladas en los dos medios de cultivo sólidos tras siembra del medio líquido de enriquecimiento, (3) ADN extraído de los extractos vegetales, (4) ADN extraído de las suspensiones obtenidas en los tubos de enriquecimiento.

Se utilizaron controles positivos de amplificación, con ADN de *E. amylovora* (cepa de referencia CFBP 1430) y controles negativos, sin ADN. Los controles positivos se utilizaron para determinar la eficiencia de la amplificación. Se utilizaron ADNs genómicos previamente preparados y conservados a -20°C. Los controles negativos se utilizaron para descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. Se realizó la PCR según TAYLOR et al. (2001).

3.3.7. Comprobación de la tolerancia *in vitro* en la generación FO

El nivel de tolerancia de los individuos seleccionados en campo se comprobó mediante inoculaciones con el agente patógeno en condiciones controladas. Los cultivos bacterianos fueron cultivados en KB y CCT a 25 °C durante 3 d antes de la inoculación. De algunos de los individuos seleccionados, se recogieron ramas con hojas de 4 orientaciones del árbol, se metieron en bolsas de plástico etiquetadas con la fecha y el número del ejemplar y se mantuvieron en frío hasta el momento de la inoculación. En el laboratorio, se tomaron 5 hojas por individuo. Estas fueron desinfectadas en superficie durante 30 s en lejía comercial al 1 % y aclaradas con agua destilada estéril. Luego se colocaron en un recipiente de plástico con tapa sobre una rejilla para que el peciolo estuviera en contacto con el agua. En el haz de la hoja se practicaron dos heridas con una aguja, una a cada lado del nervio central y se depositó 1 ml de una suspensión bacteriana con 10^8 ufc x ml^{-1} de la cepa. Para cada uno de los individuos se colocaron 3 hojas de testigo inoculadas con agua destilada estéril. Los recipientes se incubaron a 22-25 °C con un fotoperiodo 16/8 h (día/noche). La sensibilidad al fuego bacteriano se evaluó mediante la cuantificación de la evolución y extensión de la necrosis 10 d después de la inoculación por el porcentaje de necrosis NSI (Necrosis Severity Index) (DURON et al., 1987). Con el NSI correspondiente a cada repetición se calculó el promedio correspondiente a cada genotipo.

4. Resultados

Durante el verano-otoño de 2018-2021, fueron prospectados 9 términos municipales de la provincia de Toledo: Los Yébenes, Los Cerralbos, El Casar de Escalona, Espinoso del Rey, Las Ventas con Peña Aguilera, Retamoso, Robledo del Mazo, Torrecilla de la Jara y Velada. En estas zonas se recogieron muestras para el análisis de *E. amylovora* en distintas especies de rosáceas silvestres. Los síntomas más típicos en los piruétanos observados fueron el color entre pardo (marrón) y negro de las hojas de las ramas afectadas y el característico curvado en “cayado de pastor” de los brotes terminales. Normalmente, el síntoma inicialmente visible en las hojas es la necrosis del nervio principal, que puede ir acompañada de otras manchas necróticas por los márgenes y la superficie de la hoja. Ambas lesiones se van extendiendo y, cuando *E. amylovora* alcanza la base de una rama, se produce rápidamente la marchitez de todas sus hojas, que se necrosan y se desecan, aunque sin desprenderse de la rama, y permanecen de esta manera a lo largo de todo el periodo vegetativo, hasta el otoño. Una vez desprendidas, en los años siguientes aparecen las ramas secas en el árbol. Los frutos se necrosan y adquieren una coloración oscura, pudiendo desarrollar síntomas desde que empiezan a formarse hasta que comienzan a madurar. Finalmente, quedan momificados en el propio árbol. Cuando los ataques son muy intensos en un año o durante varios años consecutivos, pueden causar la muerte del árbol. De todas las muestras recogidas sólo se detectó *E. amylovora* en *Pyrus bourgaeana* y *Malus sylvestris*. No fue detectada la presencia ni en membrillo (*Cydonia oblonga*), ni en majuelo (*Crataegus monogyna*), ni en *Sorbus* spp.

En 2018 fueron seleccionados 63 individuos de piruétanos por su posible tolerancia al fuego bacteriano. En 2020-2021 fueron evaluados nuevamente para comprobar o descartar su tolerancia a la enfermedad y se marcaron nuevos ejemplares con el fin de abarcar o conservar la mayor variabilidad posible. De algunos de los árboles candidatos por su tolerancia al fuego bacteriano se recogió germoplasma para su conservación *ex situ* y para su comprobación en condiciones de laboratorio. De esta forma, se consiguió una colección de 31 genotipos distintos procedentes de 7 zonas diferentes de la provincia de Toledo (Figura 2). De cada uno de los genotipos se mantienen 1-2 ejemplares, en macetas de 1.000 cc, en umbráculo. Aunque no se ha realizado un estudio en profundidad sobre *Pyrus bourgaeana*, se ha observado una gran variabilidad morfológica (en hoja y en fruto). Por este motivo, se ha intentado incluir en la colección distintos individuos de cada zona en base, no sólo a su tolerancia al fuego bacteriano, sino también a las diferencias morfológicas entre ellos.



Figura 2. Colección de individuos tolerantes al fuego bacteriano por evaluación en campo.

Los ensayos de sensibilidad de los piruétanos al fuego bacteriano se deben realizar mediante la inoculación del material vegetal con la bacteria. Debido a las limitaciones que impone el manejo de *E. amylovora*, y para agilizar la selección de individuos poco susceptibles, se realizó un ensayo rápido de sensibilidad en hoja (NORELLI et al., 1988; DONOVAN, 1991; CHEVREAU et al., 1998). Por ello, la inoculación se realizó depositando una suspensión bacteriana sobre hojas separadas de los individuos seleccionados en campo. Estas fueron mantenidas en condiciones favorables para el desarrollo de la infección, de manera que el grado de progresión de la necrosis permitiera comparar la sensibilidad entre los distintos genotipos (Figura 3).



Figura 3. Inoculación en hojas separadas.

Los síntomas comenzaron a desarrollarse a los 10 d después de la inoculación en las hojas y, en las más sensibles, la necrosis progresó rápidamente desde el punto de inoculación hacia el tejido internerval. Finalmente, la necrosis cubrió toda la hoja, siendo visibles exudados bacterianos en algunos casos. Los ensayos en hoja permitieron clasificar 29 genotipos en 3 categorías o niveles arbitrarios de sensibilidad en función del NSI obtenido. Como se puede observar en la Figura 4, el rango de variación media del NSI fue del 1-60 %. La mayor parte de los individuos estudiados presentaron un NSI inferior al 50 %, lo que correspondería a una sensibilidad media-baja al fuego bacteriano según el código GRIN (Germplasm Resources Information Network) (THOMAS & JONES, 1992). Sin embargo, dado que el testigo sensible dio un valor medio del 60 %, solamente los genotipos que dieron valores de NSI menores al 12 % fueron seleccionados para estudios posteriores de sensibilidad mediante ensayos en brote.

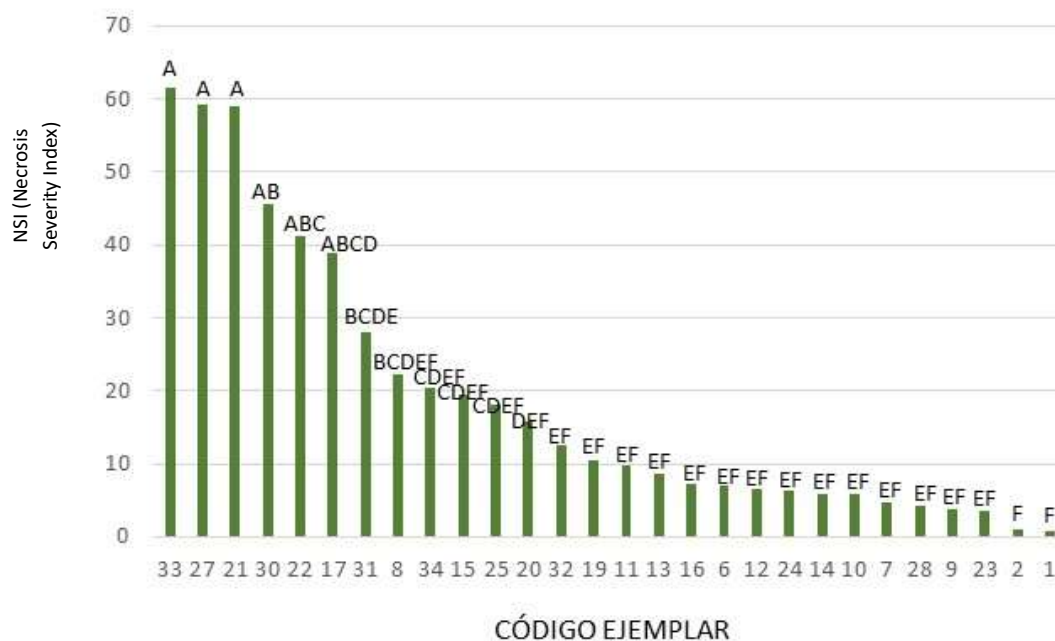


Figura 4. Índice de severidad de la necrosis.

5. Discusión

La sensibilidad a esta enfermedad en individuos aparentemente asintomáticos o con bajo nivel de severidad en campo se ha evaluado tanto por observación en focos o posibles focos en campo como por ensayo de inoculación en hojas separadas. Para confirmar la tolerancia próximamente se inocularán brotes jóvenes de plántones procedentes de semillas de los árboles seleccionados en campo (ensayos en plántones). Los plántones para inocular procederán de los genotipos guardados en colección que presenten un número suficiente de replicados manteniendo los de colección para el banco de germoplasma. Una vez evaluados mediante ambos métodos, la determinación de la sensibilidad se correlacionará entre los resultados con hojas y con plantas completas. La realización de ambos ensayos con los mismos genotipos nos permitirá evaluar la validez del ensayo en hojas y facilitar la identificación de individuos potencialmente menos sensibles para continuar con el programa de mejora.

La conservación de los recursos genéticos de los piruétanos se ha realizado mediante la propagación sexual de los ejemplares seleccionados en campo, para su posterior plantación en bancos de conservación *ex situ*. En este trabajo están representados ejemplares de todas las zonas de distribución de Toledo, con la intención de no perder diversidad genética. El material vegetal actualmente está constituido por 1-2 ejemplares de 31 genotipos diferentes con tolerancia al fuego bacteriano. El proceso de mejora para obtener algún grado de resistencia a este patógeno forestal comenzó con la búsqueda, en focos de piruétanos infectados, de árboles supervivientes que permanecen sanos mientras que los de su alrededor han ido sucumbiendo a la enfermedad. Además, la búsqueda cubrió la mayor variabilidad genética de la especie en la provincia de Toledo, para conseguir un material genético capaz de adaptarse a diversas situaciones ambientales. De esta forma, se han seleccionado por su tolerancia en campo 42 genotipos. De estos, se ha evaluado su grado de resistencia mediante inoculaciones en hojas separadas en 26 genotipos, presentando 14 de ellos alta resistencia a la enfermedad en comparación con las variedades comerciales resistentes utilizadas como referencia. Sin embargo, no todos los árboles son infectados al mismo tiempo y la enfermedad tampoco se desarrolla en todos al mismo ritmo. Por este motivo, es necesario seguir las evaluaciones en campo durante varios años consecutivos y confirmar estas observaciones en condiciones controladas mediante inoculaciones artificiales.

6. Conclusiones

A partir de los muestreos realizados por diversas zonas de la provincia de Toledo se detectó la presencia de *E. amylovora* solamente en los géneros *Pyrus* y *Malus*. En los focos de enfermedad se marcaron algunos ejemplares con posible resistencia/tolerancia al fuego bacteriano y se evaluaron durante varios años consecutivos. La tolerancia de algunos de estos individuos fue comprobada mediante inoculaciones artificiales en laboratorio. De esta forma, se mantienen en colección para futuros programas de mejora genética o de conservación de recursos genéticos, 14 genotipos con posible resistencia al fuego bacteriano.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Programa de Desarrollo Rural de Castilla-La Mancha, periodo 2014-2020, Submedida: 15.2: Conservación y promoción de los recursos genéticos forestales.

8. Bibliografía

CHEVREAU, E.; BRISSET, M.N.; PAULIN, J.P.; JAMES, D.J.; 1998. Fire blight resistance and genetic trueness-to-type of four somaclonal variants from the apple cultivar Greensleeves. *Euphytica* 104, 199-205.

DONOVAN, A.; 1991. Screening for fire blight resistance in apple (*Malus pumila*) using excised leaf assays from *in vitro* and *in vivo* grown material. *Ann. Appl. Biol.* 119, 59-68.

DURON, M.; PAULIN, J.P.; BRISSET, M.N.; 1987. Use of *in vitro* propagated plant material for rating fireblight susceptibility. *Acta Hort.* 217, 317-324.

GORRIS, M.T.; CAMBRA, M.; LLOP, P.; LÓPEZ, M.M.; LECOMTE, P.; CHARTIER, R.; PAULIN, J.P.; 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Hort.* 411, 41-45.

ISHIMARU, E.S.; KLOS, E.J.; 1984. New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* 74, 1342-1345.

KING, E.O.; WARD, M.; RANEY, D.E.; 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301-307.

LLOP, P.; CARUSO, P.; CUBERO, J.; MORENTE, C.; LÓPEZ, M.M.; 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods* 37, 23-31.

NORELLI, J.L.; ALDWINKLE, H.S.; BEER, S.V.; 1988. Virulence of *Erwinia amylovora* strains to *Malus* sp. Novole plants grown *in vitro* and in the greenhouse. *Phytopathology* 78, 1292-1297.

TAYLOR, R.K.; GUILFORD, P.J.; CLARK, R.G.; HALE, C.N.; FORSTER, R.L.S.; 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.* 29(1),35-43.

THOMAS, T.M.; JONES, A.L.; 1992. Severity of fire blight on apple cultivars in Michigan. *Plant Dis.* 76,1049-1052.