

Caída de botón floral en kiwi causada por *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas syringae* en el Principado de Asturias

A. J. GONZÁLEZ, M. R. RODICIO

El cultivo del kiwi se introdujo en el Principado de Asturias en los años 70 y actualmente es un importante recurso frutal, junto con las manzanas de sidra y de mesa. Una de las enfermedades que mayores pérdidas ocasiona a este cultivo y que depende de las condiciones climatológicas, es la caída de botones florales, flor y frutos recién cuajados. En Asturias, se ha demostrado que la etiología de esta enfermedad es bacteriana, siendo originada por dos especies de *Pseudomonas* fluorescentes: *P. viridiflava*, descrita profusamente en la bibliografía como causante de esta patología en otras partes del mundo, y *Pseudomonas syringae*, que también ha sido asociada por algunos autores a esta enfermedad. Sin embargo, en nuestra región, los aislamientos de *P. viridiflava* pertenecen a una variante atípica, que se ha encontrado también en otros cultivos, y ambas bacterias presentan una elevada diversidad fenotípica.

A. J. GONZÁLEZ. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias. España.

M. R. RODICIO. Área de Microbiología, Dpto. de Biología Funcional e Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias (IUBA), Universidad de Oviedo, c/Julián Clavería 6, 33006, Oviedo. Asturias.

Palabras clave: *Actinidia deliciosa*, bacteriosis, daños, *Pseudomonas* fluorescentes.

INTRODUCCIÓN

El kiwi (*Actinidia deliciosa*) es originario de China y se cultiva en diferentes zonas del mundo como Nueva Zelanda, California, Chile y Europa. En España, se introdujo inicialmente en Galicia a finales de la década de los 60. Al Principado de Asturias (PA) no llegó hasta 1973, observándose un aumento importante en la producción a partir de la década de los años 80 (COQUE *et al.*, 1987). En la actualidad, se trata del tercer cultivo frutal de la región con una producción anual de 1.500 t y 1.172.000 euros, tras la manzana de sidra (44.000 t, 8.462.300 euros) y la de mesa (6.000 t, 3.245.500 euros) (ANÓNIMO, 2003). La zona de producción de kiwi en el PA se sitúa en la franja costera.

Tradicionalmente se ha considerado al kiwi como un cultivo sin graves problemas patológicos. A pesar de ello se han descrito daños causados por factores bióticos, tales como hongos, bacterias o nemátodos, y por factores abióticos como viento, heladas, calor, etc. Entre las bacterias patógenas de kiwi destacan distintas especies de *Pseudomonas* fluorescentes, concretamente *P. viridiflava* (WILKIE *et al.*, 1973; YOUNG *et al.*, 1988; VARVARO *et al.*, 1990; MANSILLA y ABELLEIRA, 1999; GONZÁLEZ *et al.*, 2003), *P. syringae* patovar (pv.) *syringae* (BALESTRA y VARVARO, 1997; GONZÁLEZ y ÁVILA, 2001), (SCORTICHINI y MARGARITA, 1989), *P. syringae* pv. *actinidiae* (SERIZAWA *et al.*, 1989; SCORTICHINI, 1994) y *P. marginalis* (MANSILLA y ABELLEIRA, 1999). Estas bacterias ori-

ginan fundamentalmente podredumbre y caída de botón floral, flor y fruto recién cuajado, lo que acarrea importantes pérdidas económicas, pero se han asociado también a muerte de ramas y chancros.

En el Laboratorio de Fitopatología del PA (LPPA) se empezó a trabajar en esta enfermedad en el año 2000, con el objetivo de identificar los agentes etiológicos de la caída de botón floral, enfermedad que afecta esporádicamente a cultivos de nuestra comunidad, originando importantes pérdidas. De este trabajo damos cuenta a continuación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se analizaron 28 muestras tanto sintomáticas como asintomáticas (en concreto, una rama, hojas y botones florales), recogidas durante los años 2000, 2001 y 2002 en distintas localidades del PA (Cuadro 1). La mayor parte fueron obtenidas el año 2000 en fincas situadas en las localidades de Villaviciosa y Llanes, que se habían visto seriamente afectadas por la enfermedad de la podredumbre y caída de botón floral durante el año anterior. El mismo año se recogieron también muestras de botones florales con los mismos síntomas en otras dos localidades: Grado y Pravia. En 2001 y 2002 se analizaron cuatro muestras sintomáticas que se recibieron en el LPPA, procedentes de Villaviciosa y Llanes.

Análisis bacteriológico

Pequeñas muestras del material de partida (hojas, rama o botones florales), se sometieron a una dislaceración de tejidos y posteriormente se sembraron en medio King B (KB, KING *et al.* 1954). Las placas se incubaron 48 h a 25°C, identificándose las colonias fluorescentes por exposición a luz UV. Los aislamientos fluorescentes se analizaron mediante tinción Gram, prueba de oxidación-fermentación aportando glucosa como sustrato (HUGH y LEIFSON, 1953), esquema determinativo LOPAT (LELLIOTT *et al.*, 1966), utilización de diferentes compuestos (manitol,

m-inositol, eritritol, homoserina, sorbitol, D-tartrato, sacarosa, L-lactato, trigonelina, quinato, betaina y adonitol) como única fuente de carbono en los medios de Hellmers y Ayers (JANSING y RUDOLPH, 1990; NOVAL, 1991, respectivamente), e hidrólisis de gelatina y esculina. Los aislamientos con las mismas características fenotípicas, procedentes de la misma muestra, fueron considerados como una única cepa. De esta manera se seleccionaron 29 cepas de *Pseudomonas* fluorescentes, designadas con las siglas LPPA seguidas de un número (Cuadro 1). Como control se incluyeron dos cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo: *P. viridiflava* CECT 458 y *P. syringae* pv. *syringae* CECT 4429.

Amplificación del ADN 16S mediante PCR y secuenciación

Los genes que codifican los ARN 16S de aislamientos problemáticos fueron amplificados usando los iniciadores pA y pH¹, diseñados por EDWARDS *et al.* (1989) para eubacterias. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MJ Research PTC 100 (Waltham, Mass., USA), utilizando un volumen de 50 µl que contenía 1 µl de ADN extraído de acuerdo con el método de DEENER y BOYCHUCK (1991), concentraciones 0,3 mM de cada iniciador, una concentración 0,2 mM de cada deoxynucleosido trifosfato, 2 U de DyNAzyme II DNA polimerasa (Finnzymes, Oy, Espoo, Finland), y 5 µl del tampón de reacción suministrado por la casa comercial. El volumen se llevó hasta 50 µl con agua estéril bi-destilada. Después de un paso de desnaturalización de 3 min a 94°C, la mezcla de reacción se sometió a 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 1 min, anillamiento a 61°C 1 min, y extensión a 72°C durante 90 s, seguido de un paso final a 72°C durante 10 min. El producto de amplificación, de aproximadamente 1.500 pb, fue purificado con el kit Ultraclean PCR clean up DNA purification (MO-BIO, Inc., USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados fueron secuenciados por Secugen (Madrid, España), con los iniciadores pA y

Cuadro 1. Origen, identificación y patogenicidad de cepas de *Pseudomonas* fluorescentes procedentes de muestras de kiwi.

Año	Localidad	Tipo de muestra	Cepas LPPA	Identificación	Botones inoculados/caídos	Características del fruto (n)
2000	Villaviciosa	Hoja asintomática	102	<i>P. viridiflava</i>	5/5	na
		Hoja asintomática	103	<i>P. viridiflava</i>	ne	
		Hoja asintomática	109	<i>P. marginalis</i>	5/1	normales (4)
		Hoja asintomática	-			
		Hoja asintomática	116	<i>P. marginalis</i>	5/0	normales (5)
		Hoja asintomática	117	<i>P. syringae</i>	5/4	pequeño (1)
					5/3*	nd
		Hoja asintomática	118	<i>P. viridiflava</i>	5/5	na
		Hoja asintomática	125	<i>P. viridiflava</i>	ne	
		Hoja asintomática	126	<i>P. viridiflava</i>	5/2	deformes (3)
		Hoja asintomática	127	<i>P. viridiflava</i>	ne	
		Hoja asintomática	133	<i>P. fluorescens</i>	8/0	normales (8)
			134	<i>P. viridiflava</i>	5/2	pequeños y deformes (3)
		Rama con síntomas	136	<i>P. viridiflava</i>	8/2	nd
		Botón con síntomas	138	<i>P. viridiflava</i>	8/8	na
		Botón con síntomas	139	<i>P. viridiflava</i>	11/11	na
					6/5*	pequeño y deforme (1)
	Botón con síntomas	161	<i>P. viridiflava</i>	ne		
	Botón con síntomas	162	<i>P. viridiflava</i>	ne		
2000	Llanes	Hoja asintomática	152	<i>P. syringae</i>	6/2	nd
			153	<i>P. viridiflava</i>	7/1	nd
		Botón asintomático	-			
		Hoja asintomática	158	<i>P. syringae</i>	5/1	nd
		Botón asintomático	159	<i>P. syringae</i>	5/1	pequeños (4)
		Hoja asintomática	150	<i>P. viridiflava</i>	ne	
		Botón asintomático	145	<i>P. syringae</i>	6/2	nd
		147	<i>P. viridiflava</i>	ne		
2000	Grado	Botón con síntomas	143	<i>P. viridiflava</i>	11/11	na
				7/5*	pequeños y deformes (2)	
2000	Pravia	Botón con síntomas	144	<i>P. viridiflava</i>	10/10	na
				7/4*	deformes (3)	
2001	Villaviciosa	Hoja asintomática	164	<i>P. syringae</i>	ne	
		Botón con síntomas	165	<i>P. syringae</i>	4/3	pequeño (1)
				5/1*	nd	
2002	Llanes	Fruto con síntomas	166	<i>P. syringae</i>	5/5	na
		Fruto con síntomas	167	<i>P. syringae</i>	ne	
			Cepas CECT			
na	na	na	4429	<i>P. syringae</i>	6/6	na
na	na	na	458	<i>P. viridiflava</i>	7/7	na

LPPA, Laboratorio de Fitopatología del Principado de Asturias; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; ne, no ensayado; *, inoculaciones realizadas por duplicado; (n), número de frutos con la(s) característica(s) indicada(s); na, no aplicable; nd, no determinado.

pH'. Las secuencias fueron comparadas con las depositadas en bases de datos utilizando BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov; ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Pruebas de patogenicidad

El poder patógeno de la mayoría de los aislamientos (20/29) se investigó mediante ino-

culación de botones florales de plantas de kiwi en producción, localizadas al aire libre en la plantación experimental del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA, Villaviciosa) del PA. El método empleado (GONZÁLEZ y ÁVILA, 2001) consistió en la realización de un corte en el botón floral con un bisturí impregnado en una suspen-

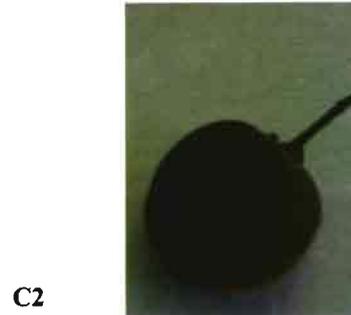


Figura 1. (A) Inoculación de botones florales mediante corte con bisturí impregnado con agua destilada estéril (A1) y con una suspensión bacteriana de LPPA 144 (A2). Nótese en el segundo caso el color marrón oscuro en la zona del corte, debido a la podredumbre de los botones. (B) Botones florales de kiwi afectados por la enfermedad. Inicialmente, ésta se manifiesta en la parte interna (B1), afectando posteriormente a toda la flor (B2). (C) Aspecto que presentan los frutos de kiwi producidos a partir de botones inoculados con la cepa LPPA 144 de *P. viridiflava* atípica (C1) y con la cepa LPPA 117 de *P. syringae*.

sión bacteriana de aproximadamente 10^8 ufc/ml, correspondiente al cultivo de una noche en caldo YPG (5 g de extracto de levadura, 5 g de proteasa peptona y 10 g de glucosa por litro). El número de botones inoculados varió entre 5 y 11, localizados en las partes terminales de las ramas (Figura 1A). Estas se cubrieron con bolsas de plástico transparentes durante 48 h, al cabo de las cuales se retiraron, observándose los síntomas a partir de entonces. Se utilizó como blanco agua destilada estéril, y como controles las dos cepas de colección. En estas últimas se tomaron precauciones para no contaminar la parcela, esterilizando en autoclave los botones inoculados, dentro de la misma bolsa con que se cubrieron. Las bacterias causantes de daño se reaislaron a partir del material afectado, y se identificaron como se describió anteriormente.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* fluorescentes procedentes de kiwi

En el presente trabajo se aislaron *Pseudomonas* fluorescentes a partir de todas las muestras de kiwi analizadas, excepto dos. Las excepciones fueron una hoja y un botón floral, ambos asintomáticos, recogidos en el año 2000, en Villaviciosa y Llanes, respectivamente. A partir de las 26 muestras restantes (tanto sintomáticas como asintomáticas) se obtuvieron 29 cepas de *Pseudomonas* fluorescentes, que fueron tentativamente identificadas en base al perfil LOPAT, complementado con pruebas bioquímicas adicionales (Cuadro 2). En casos dudosos se recurrió a la secuenciación del ADN_r 16S. Los resultados obtenidos pueden resumirse de la siguiente manera:

Cuadro 2. Caracterización bioquímica de las cepas incluidas en el estudio.

Biotipo (N)	L	O	P	A	T	S	G	LL	Ad	Cepas
<i>P. syringae</i>										
BT-1 (3)	+	-	-	-	+	+	+	+	-	CECT 4429 (pv. <i>syringae</i>); 164; 165
BT-2 (2)	+	-	-	-	+	+	-	+	-	158; 159
BT-3 (3)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	134; 117; 136
BT-4 (1)	+	-	-	-	+	+	+	-	+	152
BT-5 (3)	+	-	+	-	+	+	+	-	+	145; 166; 167
<i>P. viridiflava</i>										
BT-1 (1)	-	-	+	-	+	-	+	+	-	CECT 458
BT-2 (10)	+	-	+	-	+	-	+	+	-	103; 125; 127; 139; 143; 144; 147; 150; 161; 162
BT-3 (2)	+	-	+	-	+	-	-	+	-	126; 138
BT-4 (2)	+	-	-	-	+	-	+	+	-	102; 153
BT-5 (1)	+	-	-	-	+	-	-	+	-	118
<i>P. marginalis</i>										
BT-1 (2)	+	+	+	+	-	nd	nd	nd	nd	109; 116
<i>P. fluorescens</i>										
BT-1 (1)	+	+	-	+	-	nd	nd	nd	nd	125

N, número de cepas con el biotipo indicado (incluyendo las cepas control); BT, biotipo; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; nd, no determinado; L, producción de exopolisacárido en medio rico en sacarosa; O, oxidasa; P, actividad pectinolítica; A, arginina dihidrolasa; T, hipersensibilidad en tabaco; S, utilización de la sacarosa; G, hidrólisis de gelatina; LL, utilización de L-lactato; Ad, utilización de adonitol. Las cepas asignadas a *P. syringae* y *P. viridiflava* sólo se diferenciaron en la capacidad de utilizar sacarosa como única fuente de carbono y energía, coincidiendo en los resultados de las pruebas bioquímicas que no se muestran en el Cuadro.

i) Ocho cepas mostraron el perfil [+---+], característico de *P. syringae*, al igual que *P. syringae* pv. *syringae* CECT 4429, incluida como control. Estas cepas se caracterizaron por su elevada diversidad fenotípica (4 biotipos), encontrándose diferencias en cuanto a la capacidad de hidrólisis de la gelatina y en la utilización de L-lactato y adonitol. Sólo dos de estas cepas (LPPA 164 y LPPA 165) coincidieron con CECT 4429 en todas las propiedades analizadas.

ii) De acuerdo con lo esperado, la cepa control *P. viridiflava* CECT 458 presentó el perfil LOPAT [--++], que no fue compartido por ninguno de los aislamientos de kiwi.

iii) Dieciocho cepas presentaron el perfil [+±±+], previamente asignado por nuestro grupo a una variante atípica de *P. viridiflava*, caracterizada por la producción de exopolisacárido amarillo en medio rico en sacarosa y por una actividad pectinolítica variable (GONZÁLEZ *et al.*, 2003). La secuenciación del ADNr 16S de estas cepas confirmó su asignación a *P. viridiflava*, encontrándose variación intraespecífica (4 biotipos) no sólo en la actividad pectinolítica sino también en la capacidad de hidrolizar gelatina.

iv) Sorprendentemente, el análisis del ADNr 16S de tres cepas con perfil LOPAT [++++] reveló una mayor identidad con *P. syringae* que con *P. viridiflava*. Estas tres cepas (LPPA 145, LPPA 166 y LPPA 167) compartieron el mismo biotipo.

v) Tres cepas dieron positiva la prueba de la oxidasa y negativa la reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco. Dos de ellas (LPPA 109 y LPPA 116), con perfil LOPAT [++++], fueron asignadas a *P. marginalis*, mientras que la otra (LPPA 133) presentó el perfil [++-+], propio de *P. fluorescens*.

En cuanto a su origen, los aislamientos de *P. syringae* y *P. viridiflava* atípica se obtuvieron tanto de muestras sintomáticas como asintomáticas, apareciendo ambas bacterias en dos de estas últimas (una hoja y un botón asintomáticos de Llanes, 2000). Destaca la presencia de *P. viridiflava* atípica en todas las muestras de botones florales con síntomas de

podredumbre, excepto una, donde se encontró *P. syringae*. Es interesante destacar que una de las tres cepas de *P. syringae* cuyo perfil LOPAT se confunde con el de *P. viridiflava* atípica (LPPA 145), se obtuvo en 2000 a partir de un botón asintomático procedente de una finca de Llanes, mientras que las dos restantes (LPPA 166 y LPPA 167) se encontraron, dos años después, en frutos sintomáticos de la misma finca. Por último, *P. marginalis* y *P. fluorescens* sólo aparecieron en un número reducido de muestras asintomáticas.

Pruebas de patogenicidad

El potencial patogénico de las distintas cepas se investigó mediante inoculación artificial de botones florales de kiwi, utilizando el método de corte (Figura 1-A1 y A2). Estos experimentos demostraron la patogenicidad de todas las cepas analizadas de *P. syringae* y de *P. viridiflava* atípica. En ambos casos, los síntomas de la enfermedad consistieron en oscurecimiento y podredumbre blanda de los tejidos, que afecta inicialmente a la zona interna, evolucionando posteriormente hacia la podredumbre de todo el botón (Figura 1-B1 y B2). Como consecuencia de ello, un porcentaje más o menos elevado de botones (20-100% en *P. syringae* y 14-100% en *P. viridiflava* atípica) termina cayendo (Cuadro 1). Por otro lado, los frutos que se mantuvieron en el árbol, producidos a partir de botones inoculados con *P. viridiflava* atípica, fueron deformes (Figura 1-C1), observándose que los pétalos de las flores no se caían aunque ya estuvieran secos. Por el contrario, en inoculaciones con *P. syringae*, los frutos obtenidos fueron de pequeño tamaño pero no deformes (Figura 1-C2).

Es importante señalar que los síntomas descritos para las inoculaciones artificiales coinciden con los observados en el campo y que, cumpliendo los postulados de Koch, en todos los casos fue posible recuperar la bacteria inoculada a partir de los botones afectados. Estos resultados confirman a *P. syringae* y *P. viridiflava* atípica como importantes patógenos de kiwi en el PA. *P. viridiflava* CECT 458 y *P. syringae* pv. *syringae* CECT

4429 provocaron también la podredumbre de los botones, cayendo todos los inoculados. Además, CECT 4429 causó daños en la rama. Cabe destacar, finalmente, que las cepas correspondientes a las bacterias negativas para la reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco, e identificadas como *P. marginalis* y *P. fluorescens* no provocaron daño. Aunque en el caso de LPPA 109 cayó uno de los botones inoculados, este hecho se debió probablemente a causas mecánicas, ya que no se observó daño en el mismo.

DISCUSIÓN

El presente trabajo identificó a *P. syringae* y *P. viridiflava* como agentes etiológicos de la caída de botón floral de kiwi en el PA. Este resultado coincide con otros recogidos en la bibliografía, que atribuyen la enfermedad a las mismas bacterias (ver Introducción), aunque, en el caso de *P. viridiflava* se trata de aislamientos con características bioquímicas típicas, diferentes por tanto de la variante descrita exclusivamente en nuestros cultivos. Por otro lado, en la vecina comunidad de Galicia, se ha asociado la caída de flor y botón floral de kiwi a la presencia de *P. marginalis* (MANSILLA y ABELLEIRA, 1999). Sin embargo, las cepas de la serie en estudio, negativas para la reacción de hipersensibilidad en tabaco (*P. marginalis* y *P. fluorescens*), no se comportaron como patógenas en inoculaciones artificiales. Por ello, a pesar de la proximidad geográfica y de las similitudes climáticas, la epidemiología del cultivo de kiwi parece diferir en ambas Comunidades.

Las bacterias patógenas de kiwi caracterizadas en el presente trabajo, destacan por su elevada variabilidad fenotípica, lo que representa un problema para su identificación. La mayor parte de las asignadas a *P. viridiflava* (12/15) presentaron el perfil LOPAT [+--+], que no coincide con el descrito para esta especie [--++]. Por el contrario, la mayoría de las cepas de *P. syringae* (8/11) mostraron el perfil [+--+], característico de la especie. Ambos perfiles, sin embargo, fueron compartidos por aislamientos de los dos patógenos, cuya iden-

idad sólo pudo establecerse mediante secuenciación de los ADNr 16S. En cuanto a su origen, es posible que bacterias fitopatógenas con amplio rango de hospedador, ya presentes en el PA, pasaran a infectar el nuevo cultivo, a raíz de su introducción en 1973. De hecho, *P. viridiflava* atípica y *P. syringae* han sido identificadas como patógenos de otras muchas plantas cultivadas en nuestra región (por ejemplo, judía, lechuga, hebe, manzano y vid; GONZÁLEZ *et al.*, 2003; GONZÁLEZ y RODICIO, 2006). Hay que considerar, además, que ambas bacterias fueron recuperadas no sólo de muestras de kiwi con síntomas de enfermedad, sino también a partir de muestras aparentemente sanas. De acuerdo con ello, la supervivencia epífita en kiwi, y probablemente también en otras plantas, representa un peligro para el cultivo, que se agrava bajo determinadas condiciones climáticas, como son temperaturas cálidas y alta humedad relativa.

CONCLUSIONES

1ª En Asturias se ha establecido que la caída de botones florales de kiwi es de etiología bacteriana. Las bacterias implicadas en esta patología se han identificado como *P. viridiflava* atípica y *P. syringae*.

2ª Los síntomas producidos por ambas bacterias son indistinguibles, aunque se ha observado que cuando las cepas inoculadas eran de *P. viridiflava*, los escasos frutos que sobreviven muestran asimetría y deformidades en su totalidad y que cuando las cepas inoculadas correspondieron a *P. syringae* suelen ser de pequeño tamaño.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Agroalimentación del Principado de Asturias y por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (proyecto RTA2005-000-76-00-00). Agradecemos al Laboratorio de Sanidad Vegetal del Principado de Asturias la cesión de dos de las cepas incluidas en este estudio.

ABSTRACT

GONZÁLEZ, A. J., M. R. RODICIO. 2007. Disease of floral buds of kiwifruit caused by *Pseudomonas viridiflava* and *Pseudomonas syringae*. *Bol. San. Veg. Plagas*, **33**: 517-525.

The culture of kiwifruit was introduced in the 70s in the Principality of Asturias. Nowadays it has become a relevant fruit resource, preceded only by table and cider apple. The fall of floral buds, flowers and fruits is a disease that causes important losses to this culture, depending on the climatologic conditions. In Asturias, it has been established that the etiology of this disease is bacterial, being originated by two species of fluorescent *Pseudomonas*: *P. viridiflava*, widely described in the bibliography as cause of this pathology in other parts of the world, and *P. syringae*, that has been also associated to this disease by some authors. Nevertheless, in our region, the isolates of *P. viridiflava* belong to an atypical variant, which has also been in other cultures, and both bacteria display a high phenotypic diversity.

Key words: *Actinidia deliciosa*, bacteriosis, damages, fluorescent *Pseudomonas*

REFERENCIAS

- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402.
- ANÓNIMO. 2003. Producto neto de la agricultura asturiana 2001. Ed. Consejería de Medio Rural y Pesca. Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias, 225 pp.
- BALESTRA, G. M., VARVARO, L. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. *J. Phytopathology*, **145**: 375-378.
- COQUE, M., FUEYO, M. A., AMENÁBAR, R. 1987. La *Actinidia* en Asturias. Pags: 73-85. Jornadas Internacionales sobre *Actinidia* y pequeños frutos. Villaviciosa. ISBN: 84-606-0044-0. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca del Principado de Asturias.
- DEENER, H. H., BOYCHUCK, J. 1991. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 606-609.
- EDWARDS, U., ROGALL, T., BLÖCKER, H., EMDE, M., BÖTTGER, E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 7843-7853.
- GONZÁLEZ, A. J., ÁVILA, M. 2001. Disease of floral buds of kiwifruit in Spain caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.*, **85**: 1287.
- GONZÁLEZ, A. J., RODICIO, M. R., MENDOZA, M. C. 2003. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 2936-2941.
- GONZÁLEZ, A. J., RODICIO, M. R., 2006. *Pseudomonas viridiflava* Causing Necrotic Leaf Spots and Defoliation on *Hebe* spp. in Northern Spain. *Plant Dis.*, **90**: 830.
- HUGH, R., LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, **66**: 24-26.
- JANSING, H., RUDOLPH, K. 1990. A sensitive and quick test for determination of bean seed infestation by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **97**: 42-55.
- KING, E. O., WARD, M. K., RANEY, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Med.*, **44**: 301-307.
- LELLIOTT, R. A., BILLING, E., HAYWARD, A. C. 1966. A determinative scheme for fluorescent plant pathogenic bacteria. *J. of Appl. Bacteriol.*, **29**: 470-478.
- MANSILLA, J. P., VÁZQUEZ, R. A., ABELLEIRA, A., SALINERO, M. C. 1988. Problemática fitosanitaria de la *Actinidia* en Galicia. *Bol. San. Veg. Plagas*, **14**: 279-293.
- MANSILLA, J. P., ABELLEIRA, A. 1999. Presencia de *Pseudomonas marginalis* y *P. viridiflava* sobre kiwi en Galicia. *Bol. San. Veg. Plagas*, **25**: 175-180.
- NOVAL, C. 1991. Medios de cultivo y pruebas de diagnóstico. pags 379-410. En "Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacteria y nematodos fitopatógenos". Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- SERIZAWA, S., ICHIKAWA, T., TAKIKAWA, Y. 1989. Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **55**: 427-436.
- SCORTICINI, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Path.*, **43**: 1035-1038.
- SCORTICINI, M., MARGARITA, L. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall agente causale di secumi rameali su actinidia in Italia. *Informatore fitopatologico*, **10**: 49-52.
- VARVARO, L., MAGRO, P., MAINOLFI, P. 1990. Comparsa di *Pseudomonas viridiflava* su *Actinidia deliciosa* in Italia. *Informatore fitopatologico*, **6**: 49-53.

- WILKIE, J. P., DYE, D. W., WATSON, D. R. W. 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *N.Z.J. Agr. Res.*, **16**: 315-323.
- YOUNG, J. M., CHEESMUR, G. J., WELHAM, F. V., HENS-HALL, W. R. 1988. Bacterial blight of kiwifruit. *Ann. Appl. Biol.*, **112**: 91-105.

(Recepción: 23 julio 2007)
(Aceptación: 24 septiembre 2007)