



**REVISTA
MEXICANA DE
FITOSANIDAD**

Sección
Artículo científico.
Pp. 1–7
Fecha de publicación:
30-abril-2017.

Recibido:
30-01-2017
Aceptado:
12-04-2017

Correos electrónicos
^{1,2}conzalez@uach.mx
^{1,3}jahuertah@gmail.com

ISSN: 2448-9093

Edita
Sociedad Mexicana de
Fitosanidad.
Calle Amado Nervo
s/n, Tepatepec.
Francisco I. Madero,
Hidalgo. C. P. 42660

Índice, resúmenes,
abstracts, vols., en:
www.revimexfito.com.mx

© 2017 - Revista
Mexicana de Fitosanidad

CONTROL *in vitro* DE *Erwinia amylovora*¹, CON EXTRACTOS BIOACTIVOS DE *Ganoderma lucidum*²

Gabriela Perez-Holguin^{1,1}, Loreto Robles-Hernández^{1*}, Ana Cecilia González-Franco^{1,2} y
Jared Hernández-Huerta^{1,3}.

¹Universidad Autónoma de Chihuahua,
Cd. Universitaria s/n, entre calles Universidad, Pascual Orozco y Tecnológico,
Chihuahua, Chih., México. C. P. 31110.

*Autor de correspondencia: loreto.robles@gmail.com

RESUMEN:

La mancha de fuego, causada por *Erwinia amylovora*, reduce significativamente la producción de la manzana en México. En este estudio se determinó la efectividad de los extractos bioactivos de *Ganoderma lucidum* RHW sobre el control *in vitro* de 10 aislados de *E. amylovora*. Las bacterias se aislaron en CCT (cristal violeta-ciclohexamida-tergitol) a partir de brotes vegetativos colectados de árboles de manzano en huertos ubicados en el municipio de Cuauhtémoc, Chihuahua, y se identificaron morfológicamente y mediante pruebas bioquímicas. Se realizaron pruebas de patogenicidad para la confirmación de los aislados bacterianos. Se determinó la efectividad de los extractos bioactivos en placa, fruto y flores. Todos los aislados de *E. amylovora* causaron infección con un 100 % de incidencia en frutos, flores y brotes, con un índice de severidad de 33 a 100 % en frutos, de 37 a 100 % en flores, y de 61 a 100 % en brotes. Los extractos bioactivos de *G. lucidum* causaron una inhibición total de todos los aislados bacterianos en placas, frutos y flores después de 24 y 48 horas de incubación. Estos resultados muestran que los extractos bioactivos de *G. lucidum* podrían ser utilizados como una alternativa viable en la prevención de la mancha de fuego, pero se necesitan más estudios para su evaluación en condiciones de campo.

Palabras clave: Basidiomicetos, *Ganoderma*, inhibición de *Erwinia amylovora*

Control *in vitro* of *Erwinia amylovora*, with bioactive extracts from *Ganoderma lucidum*

ABSTRACT:

The fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, significantly reduces the apple production in Mexico. In this study, the effectiveness of bioactive extracts of *Ganoderma lucidum* RHW on the biocontrol *in vitro* of 10 *E. amylovora* isolates was determined. Bacteria were isolated on CCT (crystal violet-ciclohexamida-tergitol) from twigs collected from apple trees in orchards located in the municipality of Cuauhtémoc, Chihuahua, and identified morphologically and by biochemical tests. The pathogenicity tests were performed for confirmation of the bacterial isolates. The effectiveness of bioactive extracts in petri dishes, fruits and flowers was performed. All isolates of *E. amylovora* caused infection with a 100% incidence in fruits, flowers and twigs, with a severity index from 33 to 100% in fruits, from 37 to 100% in flowers, and from 61 to 100% in twigs. The bioactive extracts caused a total inhibition of all bacterial isolates in plates, fruits and flowers after 24 and 48 hours of incubation. These results show that the bioactive extracts of *G. lucidum* could be used as a viable alternative in the prevention of fire blight, but more studies are needed for their evaluation in field conditions.

Key words: Basidiomycetes, *Ganoderma*, inhibition of *Erwinia amylovora*.

INTRODUCCIÓN

El estado de Chihuahua ocupa el primer lugar en la producción de manzana a nivel nacional, con una producción de 684,669.91 t y un valor de producción superior a los 3,238 millones de pesos (SAGARPA, 2015). Sin embargo, el manzano se ve seriamente afectado por diversas enfermedades, siendo la mancha de fuego una de las más importantes, ya que afecta todas las partes del árbol, reduciendo la producción de hasta 4 años consecutivos si no se controla adecuadamente (Agrios, 2005; Beer, 2002). Los síntomas causados por *Erwinia amylovora* consisten en marchitamiento de flores, hojas, brotes y frutos, acompañado de un cambio de color evidente en todas las partes infectadas, causando necrosis total (Thomson, 2000). Para el manejo de esta enfermedad se utilizan compuestos a base de cobre y los antibióticos estreptomycin, gentamicina y oxytetraciclina (Agrios, 2005; Beer, 2002); sin embargo, la resistencia de *E. amylovora* a estreptomycin y oxitetraciclina ya ha sido reportada previamente (McGhee *et al.*, 2011; Russo *et al.*, 2008; Robles *et al.*, 2009). Otras alternativas que se han implementado en el manejo de la mancha de fuego son el desarrollo de péptidos antimicrobianos (Guell *et al.*, 2012), el uso de bacteriófagos (Born *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2011), y el empleo de microorganismos antagonistas (Niu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Fisher *et al.*, 2012; Robles, 2004). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad de extractos bioactivos de *Ganoderma lucidum* RHW como una alternativa para la prevención de la mancha de fuego.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se obtuvieron 16 aislados de *E. amylovora* obtenidos de árboles de manzano en huertos ubicados en el municipio de Cuauhtémoc, en el estado de Chihuahua. Para ello, se colectaron muestras de brotes vegetativos con sintomatología característica de la mancha de fuego. El aislamiento se realizó en el medio CCT (cristal violeta-ciclohexamida-tergitol) de acuerdo a la metodología propuesta por Schaad *et al.* (2001).

Los aislados fueron identificados morfológicamente y a través de las pruebas bioquímicas propuestas por Schaad *et al.* (2001).

Pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos inmaduros, brotes vegetativos y flores de 24 h de edad. Para las pruebas de patogenicidad en fruto, se siguió la propuesta de Ancona *et al.* (2014). Se utilizaron manzanas inmaduras de la variedad Golden Delicious de 3.5 cm de diámetro. La inoculación se realizó con soluciones bacterianas de *E. amylovora* ajustadas a una densidad óptica de 600 nm con una concentración de 1×10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). Las pruebas de patogenicidad en brotes se realizaron de acuerdo a la técnica de Brogginini *et al.* (2008), utilizando brotes vegetativos sanos de 15 cm de longitud, los cuales se inocularon con 10 μ l de las soluciones bacterianas con la misma concentración descrita previamente. Para las pruebas de patogenicidad en flores, se siguió lo propuesto por Chen *et al.* (2009), en la cual se emplearon racimos florales frescos en un estadio floral de “punta rosa”. Para inducir la apertura de las flores, los racimos se colocaron en un cuarto de crecimiento a 28° C por 24 horas. Las inoculaciones se realizaron con una jeringa aplicando 10 μ l en el ovario y sobre los estigmas de la flor. En todos los ensayos se determinó la incidencia, severidad e índice de severidad. La variable incidencia se estimó calculando el porcentaje de rodajas, brotes o racimos florales infectados en función del total de los mismos cuantificados en cada ensayo. La severidad se determinó utilizando una escala arbitraria de 5 categorías (0-4), en donde 0 = rodaja, brote o flor sin síntomas, 1 = 1 al 25 % de infección, 2 = del 25.1 al 50 %, 3 = 50.1 al 75 % y 4 del 75.1 al 100 %. El índice de severidad se calculó mediante la siguiente ecuación: $IS = (5n.v)/(5N) * 100$, donde IS = índice de severidad, n = número de rodajas, brotes o racimos infectados en cada categoría, v = valor numérico de cada categoría, 5 = número de categorías y N = número total de rodajas, brotes o racimos florales de cada ensayo. Todos los ensayos se establecieron bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento.

Evaluación *in vitro* de extractos bioactivos de *G. lucidum* sobre *E. amylovora*. Los extractos bioactivos se obtuvieron de acuerdo con la técnica propuesta por Robles (2004). Los tratamientos se prepararon con agar nutritivo doblemente concentrado (AN 2X) y los extractos bioactivos de *G. lucidum* en concentraciones de 0, 30, 35, 40, 45 y 50 %. Las soluciones bacterianas de los aislados identificados se prepararon a una concentración de 1×10^8 UFC/ml. En cada tratamiento se colocaron 20 μ l de cada aislado, utilizando una plantilla para colocar los aislados a una distancia similar entre ellos dentro de la caja. Las cajas se incubaron a 28° C durante 24 y 48 horas. Las variables de medición fueron: inhibición total (+), inhibición parcial (+/-) y sin inhibición (-). El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con seis tratamientos y 3 repeticiones.

Evaluación de extractos bioactivos en fruto. Para este ensayo se utilizaron los tratamientos: control negativo (C-, solución buffer), controles positivos (Ea 4, Ea 7 y Ea 10) y las concentraciones de los extractos bioactivos al 40 y 50 %. Los tratamientos se aplicaron sobre rodajas de manzana, las cuales primero se impregnaron con los extractos bioactivos durante dos minutos por cada lado. El bioensayo se realizó en una incubadora a una temperatura de 28° C y una humedad relativa de 95 % durante todo el experimento. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y tres repeticiones. Las variables de medición fueron incidencia, severidad e índice de severidad.

Evaluación de extractos bioactivos en flores. Para este ensayo se utilizaron los tratamientos EB1:5, EB1:10, EB1:50, control negativo (C-) y control positivo (+). Los bioensayos se realizaron en flores sanas de 24 horas de edad. Los tratamientos se asperjaron hasta humedecer por completo las flores y después se dejaron secar por 30 minutos. Pasando este tiempo, las flores se inocularon con los aislados de *E. amylovora* Ea 4, Ea 5, Ea 7 y Ea 10 de la misma forma como se realizó en las pruebas de patogenicidad. El experimento se estableció en condiciones controladas a una temperatura de 28° C y una humedad relativa del 95 %. Después se determinó

la necrosis en el ovario de la flor mediante observaciones microscópicas para evaluar la efectividad de los tratamientos biológicos. Se midieron las variables incidencia, severidad e índice de severidad. El ensayo se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar, con cinco tratamientos y tres repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas de patogenicidad se presentan en el cuadro 1, en donde se observa la patogenicidad de ocho de las cepas de *E. amylovora* en fruto con rangos de incidencia de 66 a 100 %, severidad de 2 a 4 y un índice de severidad de 33 a 100%, siendo Ea 8 (100 %), Ea 4 (90 %) y Ea 10 (90 %) las cepas más virulentas. Todas las cepas *E. amylovora* causaron infección en brotes con una incidencia del 100 %, un rango de severidad de 2.5 a 4 y un índice de severidad de 62.5 a 100 %; asimismo, casi todas las cepas (a excepción de la Ea 1) causaron un 100 % de índice de severidad. Por otro lado, todas las cepas de *E. amylovora* fueron infectivas con una incidencia del 100 %, un rango de severidad de 1.5 a 4 y un índice de severidad de 37 a 100 %, siendo Ea 2 (100 %), Ea 7 (100 %), Ea 4 (87.5 %) y Ea 8 (87.5 %) las cepas las más virulentas. Los resultados de las pruebas de patogenicidad, muestran una variación en los niveles de virulencia entre las cepas de *E. amylovora* evaluadas. Lo anterior podría estar relacionado con los diferentes factores de virulencia. En un estudio realizado por Ancona *et al.* (2014), reportaron que el factor *RpoN* y su proteína de modulación *YhbH* fueron indispensables para la virulencia de ocho cepas de *E. amylovora*. En otro estudio, Boqs *et al.* (2004), mostraron que la migración de *E. amylovora* dentro del tejido foliar y del fruto dependía del grado de virulencia. Otro aspecto importante es la densidad de inóculo bacteriano, ya que las infecciones normalmente requieren de bajas densidades para iniciar la infección de flores, brotes y frutos, mientras que en condiciones controladas es común utilizar concentraciones más altas que van desde 1×10^6 a 1×10^8 UFC/ml. En nuestro estudio se utilizó una densidad alta (1×10^8 UFC/ml), obteniendo resultados satisfactorios en los bioensayos.

Cuadro 1. Prueba de patogenicidad de 10 aislados de *E. amylovora* en frutos, brotes y flores de árboles de manzano de huertos localizados en el municipio de Cuauhtémoc, Chihuahua a las 24 horas después de la inoculación.

Aislados bacterianos de <i>Erwinia amylovora</i>	Incidencia (%)			Severidad (escala)			Índice de severidad (%)		
	Frutos	Brotes	Flores	Frutos	Brotes	Flores	Frutos	Brotes	Flores
Ea 1	0.66	100	100	3	2.5	3.5	50	62.5	87.5
Ea 2	0	100	100	0	4	4	0	100	100
Ea 4	100	100	100	3.6	4	3.5	90	100	87.5
Ea 5	100	100	100	3	4	1.5	75	100	37
Ea 6	0.66	100	100	2	4	2.5	33	100	62.5
Ea 7	100	100	100	3.5	4	4	87.5	100	100
Ea 8	100	100	100	4	4	3.5	100	100	87.5
Ea 9	100	100	100	3	4	2.5	75	100	62.5
Ea 10	100	100	100	3.6	4	3	90	100	75
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Evaluación *in vitro* de extractos bioactivos de *G. lucidum* sobre *E. amylovora*. En el Cuadro 2 se muestran los resultados del control biológico en placa, en donde se observa que todos los tratamientos tuvieron una inhibición total de las nueve cepas de *E. amylovora* utilizadas en este bioensayo en un periodo de exposición de 24 a 48

horas a 28° C. El tratamiento control no tuvo ningún efecto en la inhibición de las cepas bacterianas, en el cual las colonias crecieron con las características típicas de *E. amylovora*. Lo anterior muestra que estos extractos bioactivos tienen un alto potencial para su aplicación en la prevención de la mancha de fuego en manzano.

Cuadro 2. Evaluación *in vitro* de extractos bioactivos de *G. lucidum* sobre 10 aislados de *E. amylovora*. Las placas fueron incubadas a 28° C por 24 y 48 horas.

Trat.	Periodo de incubación (horas)																	
	24										48							
	Ea 1	Ea 2	Ea 4	Ea 5	Ea 6	Ea 7	Ea 8	Ea 9	Ea 10	Ea 1	Ea 2	Ea 4	Ea 5	Ea 6	Ea 7	Ea 8	Ea 9	Ea 10
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Evaluación de extractos bioactivos en fruto. Los resultados de estos bioensayos se presentan en la figura 1, en donde se observa una gran diversidad de síntomas entre los tratamientos. Los controles positivos (cepas Ea 4, Ea 7 y Ea 10) mostraron la sintomatología típica en fruto causada por la mancha de fuego, observándose lesiones circulares en el área donde se hicieron las inoculaciones. Este tipo de sintomatología se caracteriza por causar necrosis en el tejido y liberar un aroma característico a fermentación alcohólica. El control negativo no tuvo efectos adversos en el fruto solo se presentó la oxidación normal. La concentración de los extractos

bioactivos del 40 % fue mejor que la del 50 %, ya que inhibió totalmente la infección ocasionada por las cepas de *E. amylovora*. Con la concentración del 50 % también se obtuvo la inhibieron las cepas bacteriana; sin embargo, su efecto fue enmascarado por la oxidación causada por los extractos bioactivos, los cuales podrían estar relacionados con los mecanismos de defensa de la planta.

Evaluación de extractos bioactivos en flores. Los resultados de estos bioensayos se muestran en la figura 2, en la cual se observa que el control negativo es el que tiene menos necrosis comparado con los demás tratamientos; sin embargo,

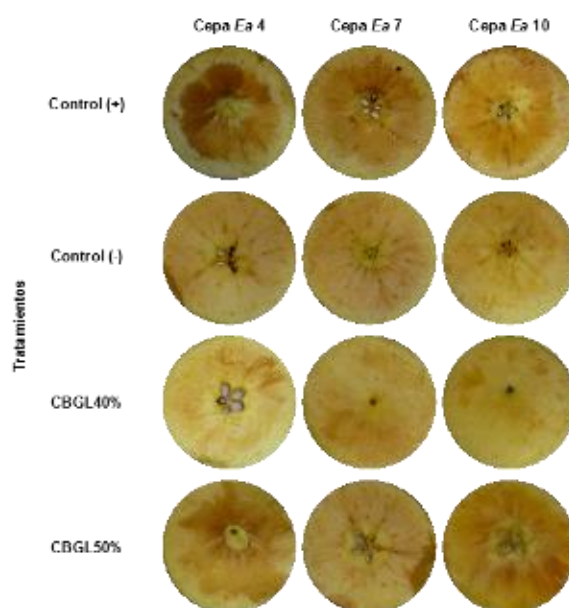


Figura 1. Evaluación de extractos bioactivos de *G. lucidum* en frutos inmaduros de manzana sobre tres aislados de *E. amylovora*.

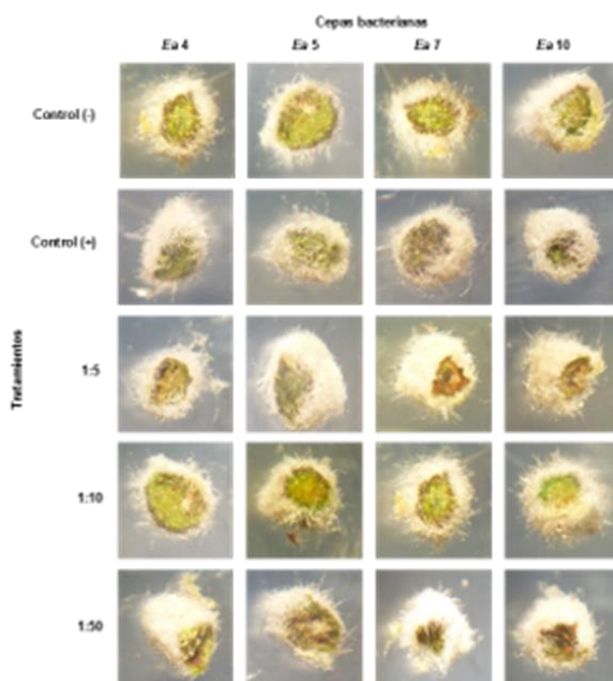


Figura 2. Evaluación de extractos bioactivos de *G. lucidum* en flores de manzano sobre cuatro aislados de *E. amylovora*.

la necrosis en este tratamiento podría estar relacionada con la oxidación fenólica como un proceso fisiológico normal. Por otra parte, en el control positivo se obtuvo una necrosis general y más intensa que en las flores no inoculadas con las cepas de *E. amylovora*. Todos los tratamientos que contienen los extractos bioactivos inhibieron la infección de las cepas bacterianas; sin embargo,

el tratamiento 1:10 fue mejor, mostrando una inhibición total de las bacterias y además no causó ningún daño aparente en el tejido. En el caso de los tratamientos 1:5 y 1:50 también mostraron una alta inhibición de las cepas bacterianas pero causaron un cambio de color de verde a rojizo y deshidratación tisular de la flor. La actividad antibacteriana de los extractos bioactivos de *G. lucidum*

contra *E. amylovora* no ha sido reportada previamente, por lo que este sería el primer estudio de este tipo. Aunque no se conocen los mecanismos de acción de estos extractos, existen evidencias que su actividad en la supresión de *E. amylovora* podría estar relacionado con la producción de glucósidos (glucanos), factores de inhibición o antibióticos. En un estudio similar, Robles (2004) identificó un polisacárido de bajo peso molecular compuesto principalmente de D-Glucosa y con residuos de D-Ribosa y β -D-Galactofuranosa a partir de extractos bioactivos de *G. lucidum* con actividad bactericida contra varias bacterias fitopatógenas, incluyendo las especies de *Agrobacterium tumefaciens*, *Acidovorax avenae*, *Brenneria quercina*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pantoea herbicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. En otros trabajos se reportó un alto poder de inhibición en el crecimiento de *E. amylovora* bajo condiciones controladas con los extractos bioactivos 4-formylaminoxyvinylglycine producido por *Pseudomonas fluorescens* WH6 (Halgren *et al.*, 2012) y L-2-amino-4-methoxy-trans-3-ácido butírico producido por *Pseudomonas aeruginosa* (Lee *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que los extractos bioactivos de *G. lucidum* RHW inhiben completamente el crecimiento de los aislados de *E. amylovora* en placa, frutos y flores, lo que pudiera permitir su empleo en campo como una alternativa viable para la prevención de la mancha de fuego en manzano. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar su aplicación en campo durante el periodo de floración y después de floración.

LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N. 2005. *Plant pathology*. Fifth Edition, ELSEVIER. San Diego, CA, USA. 922 p.
- ANCONA, V., LI, W. AND Y. ZHAO. 2014. Alternative sigma factor RpoN and its modulation protein YhbH are indispensable for *Erwinia amylovora* virulence. *Mol. Plant Pathol.*, 15: 58–66.
- BEER, S. V. 2002. *Fuego bacteriano (fire blight)*. *Compendio plagas y enfermedades del manzano y del peral*. APS. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 60 p.
- BORN, Y., FIESELER, L., MARAZZI, J., LURZ, R., DUFFY, B. AND M. J. LOESSNER. 2011. Novel virulent and broad-host-range *Erwinia amylovora* bacteriophages reveal a high degree of mosaicism and a relationship to Enterobacteriaceae phages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 5945–5954.
- BROGGINI, G. A., WÖHNER, T., FAHRENTAPP, J., KOST, T. D., FLACHOWSKY, H., PEIL, A. AND C. GESSLER. 2014. Engineering fire blight resistance into the apple cultivar ‘Gala’ using the FB_MR5 CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus × robusta* 5. *Plant Biotechnol. J.* 12(6): 728–733.
- CHEN, X. H., SCHOLZ, R., BORRIS, M., JUNGE, H., MÖGEL, G., KUNZ, S. AND R. BORRIS. 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* 140: 38–44.
- HALGREN, A., AZEVEDO, M., MILLS, D., ARMSTRONG, D., THIMMAIAH, M., MCPHAIL, K., KIM, I. Y., PUSEY, P. L., ZHAO, Y., KORBAN, S. S., CHOI, H. AND K. K. KIM. 2012. Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. *J. Control. Release*, 161: 109–115.
- MCGHEE, G. C. AND G. W. SUNDIN. 2011. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 101: 192–204.
- MÜLLER, I., LURZ, R., KUBE, M., QUEDENAU, C., JELKMANN, W. AND K. GEIDER. 2011. Molecular and physiological properties of bacteriophages from North America and Germany affecting the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microb. Biotechnol.*, 4: 735–745.
- NIU, B., VATER, J., RUECKERT, C., BLOM, J., LEHMANN, M., RU, J. J. AND R. BORRIS. 2013. Polymyxin P is the active principle in suppressing phytopathogenic *Erwinia* spp. by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1. *BMC microbiology*, 13: 137–149.
- ROBLES-HERNÁNDEZ, L. 2004. Novel antimicrobial activities of *Ganoderma lucidum* and *Laetiporus sulphureus* for agriculture. Ph.D. Dissertation. University of Idaho, USA. 113 p.

- ROBLES-HERNÁNDEZ, L., MATAS-BACA, M. A. AND A. C. GONZÁLEZ-FRANCO. 2009. Isolation and antibiotic characterization of *Erwinia amylovora* from flower samples from Chihuahua, México. *The International Journal of the American Phytopathological Society* 99: S109.
- RUSSO, N. L., BURR, T. J., BRETH, D. I. AND H. S. ALDWINCKLE. 2008. Isolation of streptomycin resistant isolates of *Erwinia amylovora* in New York. *Plant Dis.*, 92: 714–718.
- SAGARPA. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en www.siap.sagarpa.gob.mx (Fecha de consulta, septiembre 2016).
- SCHAAD, N. W., JONES, J. B. AND W. CHUN. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition. APS Press. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 373 p.
- THOMSON, S. V. 2000. Epidemiology of fire blight. In: Pp. 9–36. Vanneste, J. L. (Ed.). *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CAB Intl., Wallingford, UK.