

# **UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Facultad de Ingeniería

**Evaluación de la presencia sistémica de *Erwinia carotovora* en aguacate *Persea americana* Mill var. 'Hass', su patogenicidad en la caída de flores y frutos y su control químico en la región de San José Chacayá, Sololá.**

Trabajo de investigación presentado por Jose Eduardo Tschen Molina  
para optar el grado de Ingeniero Agrónomo

Guatemala  
2007



**Evaluación de la presencia sistémica de *Erwinia carotovora* en aguacate *Persea americana* Mill var. ‘Hass’, su patogenicidad en la caída de flores y frutos y su control químico en la región de San José Chacayá, Sololá.**

# **UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

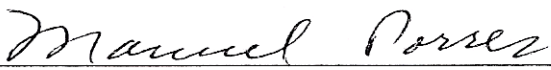
Facultad de Ingeniería

**Evaluación de la presencia sistémica de *Erwinia carotovora* en aguacate *Persea americana* Mill var. 'Hass', su patogenicidad en la caída de flores y frutos y su control químico en la región de San José Chacayá, Sololá.**

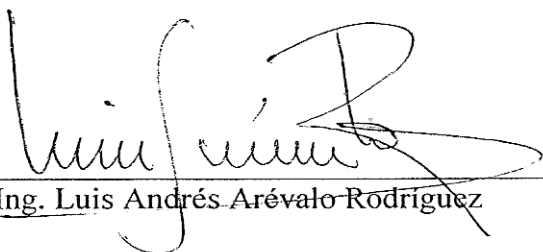
Trabajo de investigación presentado por Jose Eduardo Tschen Molina  
para optar el grado de Ingeniero Agrónomo

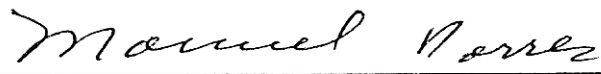
Guatemala  
2007

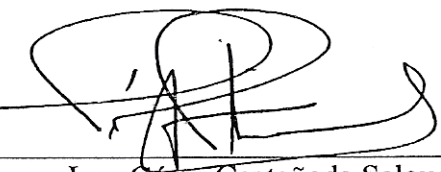
Vo.Bo.:

(f)   
Dr. Manuel Antonio Porres Arreaga

Tribunal Examinador:

(f)   
Ing. Luis Andrés Arévalo Rodríguez

(f)   
Dr. Manuel Antonio Porres Arreaga

(f)   
Ing. César Castañeda Salguero

Fecha de aprobación: Guatemala, 29 de mayo de 2007

## PREFACIO

Este estudio es producto de una inquietud respecto a la causa de la enfermedad llamada “anillamiento del pedúnculo”. Esta es una enfermedad que causa grandes pérdidas a los productores de aguacate por la caída de los frutos en desarrollo. Su agente causal aún no se conoce, pero se mencionan algunos hongos y bacterias como posibles causas.

En esta investigación, se estudió la patogenicidad de la bacteria *Erwinia carotovora* en la caída de frutos, asimismo, se evaluaron algunos productos bactericidas ofertados en el mercado, a nivel de laboratorio y campo para analizar su efectividad en el control.

Se espera que el contenido de esta investigación pueda aportar información para los estudios que se realicen en el futuro sobre el anillamiento del pedúnculo y se agradece la participación de los integrantes del departamento de entomología aplicada de la Universidad del Valle de Guatemala, Dr. Manuel Antonio Porres y el Ing. Luis Andrés Arévalo, por su invaluable ayuda en el desarrollo de este trabajo.

## CONTENIDO

Página

PREFACIO .....	ii
LISTA DE CUADROS .....	v
LISTA DE GRÁFICAS .....	vi
LISTA DE ILUSTRACIONES .....	vii
RESUMEN .....	viii

### Capítulos

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. JUSTIFICACIÓN .....	3
III. OJETIVOS .....	4
A. General .....	4
B. Específicos .....	4
IV. HIPÓTESIS .....	5
V. MARCO TEÓRICO .....	6
A. Aguacate .....	6
B. Anillamiento del pedúnculo .....	6
1. Distribución .....	6
2. Síntomas .....	7
3. Control .....	8
4. Etiología .....	8
C. <i>Erwinia</i> sp. ( <i>Erwinia carotovora</i> ) .....	9
D. Pruebas de susceptibilidad .....	11
1. Métodos de pruebas de susceptibilidad .....	12
E. Pruebas de patogenicidad .....	12
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
A. Área de estudio .....	14
B. Métodos .....	14
1. Pruebas de laboratorio .....	14

a.	Aislamiento de bacterias .....	14
b.	Identificación de <i>E. carotovora</i> .....	14
c.	Pruebas de susceptibilidad .....	15
2.	Pruebas de campo .....	16
a.	Selección de área y muestra .....	16
b.	Pruebas de patogenicidad .....	17
c.	Evaluación de tratamientos bactericidas .....	17
3.	Variables de respuesta .....	18
4.	Análisis estadístico .....	18
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	19
VIII.	CONCLUSIONES .....	24
IX.	RECOMENDACIONES .....	25
X.	BIBLIOGRAFÍA .....	24
XI.	ANEXOS .....	27

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Descripción de los tratamientos de productos bactericidas evaluados a nivel de laboratorio .....	16
2. Categorías de susceptibilidad para prueba de difusión por discos en bacterias fitopatógenas .....	16
3. Tratamientos evaluados en campo .....	17
4. Interpretación de pruebas de susceptibilidad de <i>E. carotovora</i> a bactericidas .....	19
5. Análisis de varianza de caída de frutos según tratamientos .....	20
6. Cantidad de frutos y su porcentaje en los diferentes tratamientos .....	20
7. ANDEVA. Presencia de <i>E. carotovora</i> en tratamientos evaluados .....	22
8. Presencia de <i>E. carotovora</i> en primer muestreo .....	23
9. Presencia de <i>E. carotovora</i> después de tratamientos químicos .....	23
10. Prueba de susceptibilidad para Kilol .....	28
11. Prueba de susceptibilidad para Phyton 27 .....	28
12. Prueba de susceptibilidad para Timsen .....	28
13. Prueba de susceptibilidad para Vanodine .....	28
14. Prueba de susceptibilidad para Kocide .....	29
15. Prueba de susceptibilidad para Agrimycin .....	29
16. Prueba de susceptibilidad para Terramicina Agrícola .....	29
17. Prueba de susceptibilidad para Agry-Gent .....	29
18. Presencia de <i>E. carotovora</i> en muestras analizadas para cada tratamiento .....	30

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Porcentaje de caída de frutos en lecturas realizadas .....	21

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cronograma de actividades .....	31
2. Cultivo de <i>E. carotovora</i> en agar nutritivo .....	31
3. Prueba de HL .....	32
4. Prueba de susceptibilidad para Kilol .....	32
5. Prueba de susceptibilidad para Agrimycin .....	34
6. Árbol sano en fructificación .....	35
7. Árbol con síntoma de anillamiento .....	35
8. Daño del anillamiento a nivel del pedúnculo .....	35
9. Procedimiento para aislamiento de bacterias .....	36
10. Procedimiento de Prueba de Gram .....	37
11. Identificación de <i>E. carotovora</i> .....	37
12. Pruebas de susceptibilidad: Método de difusión por discos .....	38
13. Metodología de inoculación en campo .....	39

## RESUMEN

El anillamiento del pedúnculo en aguacate (*Persea americana* Mill) es una enfermedad que causa la caída prematura de los frutos, que en ocasiones se presenta con alta incidencia y causa serios daños al agricultor. El patógeno causal de esta enfermedad no ha sido aclarado, aunque se ha asociado con varios géneros de hongos y bacterias, dentro de las cuales se encuentra a *Erwinia carotovora*. La patogenicidad de esta bacteria aún no se conoce, por lo que en este estudio se evaluó su relación con el anillamiento y caída de frutos, y su control químico con agentes bacteriostáticos.

Para evaluar la patogenicidad de *E. carotovora* en la caída de frutos, se utilizó un diseño de bloques al azar de ocho tratamientos, en el cual se determinó que éste patógeno no era el agente causal de la enfermedad ya que luego de las pruebas de patogenicidad, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

De igual manera, ninguno de los tratamientos bactericidas estudiados ejercieron control sobre la bacteria, ya que se conoce que la bacteria se encuentra sistémicamente en la planta. Tampoco hubo reducción en la incidencia del anillamiento del pedúnculo, por lo que la aplicación de los bactericidas evaluados no es una solución para esta enfermedad.

Se recomienda la realización de más investigaciones sobre el problema del anillamiento del pedúnculo para encontrar cuál o cuáles son los agentes causales de esta enfermedad y de esta manera poder determinar un tratamiento adecuado para su control.

## XII. INTRODUCCIÓN

El aguacate constituye un cultivo de gran potencial para su producción en Guatemala, por la demanda de consumo que representa en el país como también en el extranjero.

El aguacate se ve afectado por diversas enfermedades, entre las que encontramos el anillamiento del pedúnculo, cuyo efecto principal es una abundante caída prematura de los frutos. Este problema empieza a representar grandes pérdidas para el productor, pues reduce la cantidad de cosecha e incentiva la aplicación de controles recomendados por técnicos, casas comerciales, y experiencias personales de los productores, que muchas veces no llegan a solucionar el problema debido a que la causa o agentes causales de este problema aún no se han definido.

Se han encontrado una diversa cantidad de hongos y bacterias patógenos en frutos con síntomas de anillamiento. Dentro de estos patógenos se encuentra la bacteria *Erwinia carotovora*, por lo cual se estudiará la patogenicidad de este organismo en la caída de frutos, su relación con la enfermedad del anillamiento del pedúnculo en el aguacate y los posibles tratamientos bactericidas para su control en campo.

Se evaluó la susceptibilidad de *E. carotovora* a bactericidas por difusión con discos. Los productos bajo estudio fueron: Agrimycin, Agry-Gent, Kocide, Terramicina Agrícola, Vanodine, Kilol, Phyton y Timsen, de los cuales los primeros cinco presentaron mayor susceptibilidad hacia la bacteria *E. carotovora*, por lo cual se utilizaron para las pruebas de patogenicidad realizadas posteriormente en campo.

Para evaluar la patogenicidad de la bacteria en el aguacate, así como la efectividad del control químico, se inocularon ramas con frutos sin síntomas de la enfermedad del anillamiento, y posteriormente se le realizaron las aplicaciones de los bactericidas utilizando las dosis recomendadas para cada agroquímico: Agrimycin (2.0 g/l), Agry-Gent (2.0 g/l), Kocide (2.0 g/l), Terramicina Agrícola (2.0 g/l) y Vanodine (4 cc/l).

El diseño experimental empleado en este estudio fue un diseño de bloques completos al azar, con ocho tratamientos (incluyendo un testigo absoluto –sin inoculación de bacteria–) y cinco repeticiones donde cada unidad experimental consistía de dos árboles de aguacate de cinco años de edad.

### XIII. JUSTIFICACIÓN

El anillamiento de pedúnculo es una enfermedad que causa serios problemas y pérdidas económicas a los productores de aguacate. En Guatemala no ha sido estudiado el problema, algunas evaluaciones han demostrado la presencia de *Erwinia carotovora* en frutos y pedúnculos sintomatológicos y en algunas plantaciones hasta el 40 % de frutos recién formados se caen del árbol (Arévalo y Porres, 2007).

*Erwinia carotovora* es una bacteria que se presenta sistémicamente, por lo que es necesario evaluar esta condición en campo para proveer al agricultor de las condiciones patológicas de su plantación y de esta manera, se puede promover la producción de plantas certificadas libre de enfermedades para reducir desde sus inicios la incidencia de la bacteria y otros patógenos en el campo.

Es necesario evaluar las principales opciones de bactericidas en el mercado para establecer alternativas para el control de la enfermedad a medida de reducir las pérdidas de los agricultores.

## XIV. OBJETIVOS

### A. Generales

- Evaluar la patogenicidad de *Erwinia carotovora* en fruto y su relación con la enfermedad llamada “anillamiento del pedúnculo”.
- Detener la caída de frutos del árbol de aguacate.

### B. Específicos

- Determinar la presencia sistémica de la bacteria *Erwinia carotovora* en aguacate, *Persea americana*, Mill var. ‘Hass’.
- Evaluar bactericidas comerciales a nivel de laboratorio y campo para el control de *Erwinia carotovora*.
- Establecer el mejor tratamiento entre bactericidas comerciales para el control de la caída de flores y frutos en aguacate.

## XV. HIPÓTESIS

1. La bacteria *Erwinia carotovora* se encuentra sistémicamente en las plantas de aguacate 'Hass'.
2. La bacteria *Erwinia carotovora* es la causante del anillamiento del pedúnculo en aguacate.
3. Al menos uno de los bactericidas presenta diferencias en el control del anillamiento del pedúnculo en aguacate.

## XVI. MARCO TEÓRICO

### A. Aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill) es uno de los frutales nativos de mayor potencial para su cultivo en el país, ya que se desarrolla en diferentes áreas ecológicas y el consumo nacional y demanda de los mercados del extranjero promueven la producción de este producto. En el país se estima que existen alrededor de 3200 has de árboles nativos diseminados en todas las áreas ecológicas aptas para este cultivo que producen alrededor de 70 000 T/año. Por el potencial que tiene este cultivo en el país, desde el año de 1996 ha habido un incremento en el área de cultivo, hasta llegar a la señalada anteriormente (Vásquez, 2005).

La productividad del aguacate se ve limitada por factores bióticos y abióticos. Estas pueden ser de tipo: a) bióticas, causadas por microorganismos como los hongos, bacterias, nemátodos y virus y viroides; o b) abióticas, debidas a causas ambientales como heladas, precipitación, viento, deficiencias nutrimentales, salinidad y acidez en el suelo, etc. (Téliz, 2000).

Entre las enfermedades principales del aguacate, causadas por agentes bióticos que afectan la productividad de este cultivo están la antracnosis, roña, la tristeza del aguacatero y el anillamiento del pedúnculo. Problemas, en el cual su principal efecto en el árbol es una merma en la producción y en la calidad del fruto.

### B. Anillamiento del pedúnculo

1. Distribución. La enfermedad tiene una amplia distribución y ha adquirido niveles epidémicos; en algunas huertas se han llegado a contar hasta 200 frutos caídos por árbol. Se ha observado en California, E.U.A., Israel, Australia, Sudáfrica y Perú; así como en Puerto Rico, India y Argentina; en México se ha registrado en los Estados de Veracruz, Puebla, Morelos Colima y San Luis Potosí. En Michoacán se le considera como una enfermedad endémica presente en toda la zona aguacatera (Téliz, 2000). En Guatemala, se ha encontrado en las regiones aguacateras, principalmente en Sololá y Suchitepéquez (Porres, 2007).

Este es un problema que en ocasiones se presenta con alta incidencia y causa daños serios al agricultor ya que causa la caída de fruto en diversos estados de desarrollo. El problema se presenta en el cultivar 'Hass'; más del 98% de las casi 90 000 ha del Estado de Michoacán, México están plantadas con este cultivar, constituyendo un potencial importante de daño y es una de las causas de mayor pérdida económica. Actualmente, algunos productores y técnicos se han acostumbrado a la caída de la fruta (10 al 15% de fruta amarrada), otros creen controlarla en forma casual; sin embargo, aún no se ha cuantificado el efecto del anillamiento del pedúnculo sobre el rendimiento (Téliz, 2000).

2. Síntomas. El síntoma característico es la formación sobre el pedúnculo de un anillo café rojizo en el lugar de la unión, abarcando un tamaño desde 2 mm hasta 2 cm, completo o incompleto, con una zona seca y descortezada; algunas veces el anillo es superficial y el fruto se retiene hasta la madurez. Sin embargo, en la mayoría de las veces el fruto tiende a tomar forma redonda y una coloración púrpura en el pericarpio; en algunos casos, bajo este aspecto, se presenta una caída abundante de frutos o bien el fruto queda retenido pero comienza a deshidratarse rápidamente y toma un aspecto momificado. En frutos parcial o totalmente momificados, la cáscara muestra una coloración oscura y en un corte, se puede observar que dentro de la pulpa se producen cavidades que contienen micelio abundante, mientras que el hueso generalmente presenta una infección muy grande y en casos severos, la total pudrición de la semilla. De este último síntoma se ha aislado consistentemente a *Fusarium* sp., sin embargo, su patogenicidad aun no se demuestra (Téliz, 2000).

Esta enfermedad ocurre durante los dos a tres primeros meses de vida del fruto, aunque se encontró que el anillamiento se inicia cuando los frutos son relativamente grandes, de cuatro a cinco meses después de la cuaja, hasta poco antes de la cosecha. Aquellos frutos en los que el anillamiento se presentó más temprano, se desprendieron más rápidamente y aquellos otros en los que apareció dos meses antes de la cosecha, no se cayeron, pero presentaron menor crecimiento los dos últimos meses antes de la cosecha (Wilhelmy, 1995). Esto merma la producción desde porcentajes apenas perceptibles, y considerados como un aborto de frutos de razones naturales, hasta la pérdida total de la cosecha (Téliz, 2000).

3. Control. Por la indefinición de su etiología, el control de este problema aún no se ha fijado. La

aspersión de fungicidas, bactericidas o de elementos menores se ha recomendado; sin embargo, la metodología y solidez de los resultados no fundamenta la recomendación.

Se aconseja en forma generalizada, por desconocer el agente causal, mantener las plantaciones con fertilización de elementos mayores y menores, con distancias de siembras adecuadas que permitan buena ventilación, podas de ramas y podas de ventaneo para evitar microclimas dentro de la copa con mayor humedad relativa; suministro de riego en la época seca, recolectar y destruir frutos enfermos (Anacafé, 2004).

Se ha sugerido la aplicación de la mezcla de Agrimycin 100 más sulfato tribásico de cobre a dosis de 60 a 600 gramos, respectivamente por 100 litros de agua. También la mezcla de 60 gramos de Tecto 60 más 60 gramos de estreptomycin en 100 litros de agua. En algunas ocasiones, la aplicación de elementos menores como el zinc y el manganeso ayudan a evitar dicha caída, en dosis de 1 kg de sulfato de zinc o de manganeso por árbol, aplicándose en la base (Campos, 1996).

4. Etiología. Las causas que se han mencionado de la literatura originando este problema, son muy diversas, muchas de ellas apoyadas por hipótesis lógicas y basadas en observaciones reales, pero que desgraciadamente carecen de apoyo técnico y/o científico, más no por ello los debemos de considerar erróneas, más bien deben ser motivo de observaciones más detalladas, comparaciones más exactas y análisis más profundos de sus posibles causas, entre las causas que podemos mencionar se encuentran las siguientes: a) El anillamiento puede ser causado por cambios bruscos del clima, por ejemplo: las altas temperaturas de la estación de verano, o bien el inicio de la temporada de lluvias así como los nublados, bajas temperaturas y lluvias extemporáneas. b) causas fisiológicas originadas por excesos de nitrógeno o deficiencias, tanto de elementos mayores como de algunos microelementos. c) Mal manejo de agua por exceso o escasez de riego. d) Daños causados por algunos insectos y por último; e) Daños causados por agentes patógenos (Martínez *et al*, 1975).

En Michoacán, México, se hicieron estudios tendientes a identificar las causas del anillamiento. Se encontraron los siguientes organismo: *Alternaria*, *Helmithosporium*, *Diplodia*, *Colletotrichum* y *Fusarium*, sin embargo al realizar algunas pruebas de patogenicidad con cada uno de los hongos y con

la mezcla de dos o más de ellos, los resultados fueron negativos, por lo que no se considera a ninguno de ellos como causa directa de la enfermedad. (Martínez *et al* 1975).

Otros investigadores han encontrado la presencia los hongos de los géneros *Dothiorella*, *Collecotrichum* y *Pestalotia* (Vásquez y Acevedo, 1970); *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Helmithosporium*, *Alternaria*, *Diplodia*, *Botryodiplodia* y *Phomopsis*, ocasionando lesiones a nivel del pedúnculo (Téliz 2000), y la incidencia de *Hyalodendron*, *Sthemphyllium*, *Penicillium* y *Glomerella*; así como, los géneros de bacterias *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas* (Martínez, 1977) y *Erwinia* (Téliz, 2000).

### C. *Erwinia* sp. (*Erwinia carotovora*)

El género *Erwinia* se caracteriza ser una bacteria sistémica de tipo Gran negativa, en forma de bastones rectos, con dimensiones de 0.5 a 1.0 × 1.0 a 3 μm. Se desplazan por medio de varios a muchos flagelos peritricos. Las *Erwinias* son las únicas bacterias fitopatógenas que son anaeróbicas facultativas. Algunas especies de *Erwinia* no producen enzimas pécticas y causan marchitamientos o enfermedades necróticas (como el grupo “*amylovora*”), mientras que otras presentan una notable actividad pectolíticas y causan pudriciones blandas en las plantas (como el grupo “*carotovora*”) (Agrios, 2002).

El grupo de *Erwinias* “*carotovora*” o de las “pudriciones blandas”, produce la pudrición blanda de numerosos frutos carnosos, hortalizas y plantas de ornato (*E. carotovora* pv. *carotovora*), la pierna negra de la papa (*E. carotovora* pv. *atroseptica*) y la pudrición blanda, menos común de varios cultivos (*E. chrysanthemi*). (Agrios, 2002)

No hay literatura respecto a los síntomas característicos que provoca la bacteria *Erwinia* sp. en el aguacate. A pesar de ello, se ha aislado esta bacteria en frutos sanos y enfermos, en el pedúnculo de éstos, hojas y corteza de árboles. En estas partes vegetativas, los síntomas se caracterizan por manchas oscuras necróticas en tallos, hojas y frutos, y también su presencia en frutos en pudrición y en aquellos con síntomas de anillamiento del pedúnculo (Porres, 2007).

- Control químico de bacterias

De los productos químicos aplicados en forma de aspersiones foliares, los compuestos de cobre han dado los mejores resultados. Sin embargo, rara vez dan un control satisfactorio de la enfermedad cuando las condiciones ambientales favorecen el desarrollo y la propagación del patógeno. El caldo bordelés, los compuestos de cobre fijados y el Kocide son los que con mayor frecuencia se utilizan en el control de los tizones y manchas foliares bacterianas. El Zineb se utiliza también para el mismo fin, especialmente en plantas jóvenes que pudieran ser dañadas por los compuestos de cobre (Agrios, 2002).

Los antibióticos se han utilizando en los últimos años para combatir algunas enfermedades bacterianas y los resultados obtenidos son alentadores. Algunos antibióticos son absorbidos por la planta y distribuidos sistemáticamente. Pueden aplicarse en forma de aspersiones o como baños para transplantes. Los antibióticos antibacteriales más importantes en la agricultura son las formulaciones de estreptomina o de estreptomina (antibiótico aminoglucósido) y oxytetracyclina (antibiótico tetracíclico) (Agrios, 2002), los cuales se han comprobado ser activos y efectivos contra los principales géneros de bacterias fitopatógenas. Las sustancias químicas de los compuestos cúpricos como de los antibióticos y otros compuestos poseen, son capaces de inhibir en pequeñas cantidades los procesos vitales de estos microorganismos, destruyendo e impidiendo su desarrollo y reproducción (Promotora Técnica Industrial, 2007).

Los químicos comerciales utilizados para el control de bacterias tienen un efecto bacteriostático y bactericida. Acceden de la bacteria a través de difusión pasiva y transporte activo, llegando hasta el citoplasma celular donde actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Tienen la capacidad de formar quelatos con cationes metálicos como el cobre, y de esta forma bloquear enzimas que intervienen en la síntesis proteica, provocando la muerte de la célula bacteriana (Promotora Técnica Industria, 2007).

Tienen amplio espectro, controlan bacterias micoplasmas. Estos antibióticos actúan de forma sistémica y de contacto, protegiendo a la planta interna y externamente del daño causado por los géneros de bacterias: *Agrobacterium* spp., *Clavibacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Curtobacter* spp., *Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Streptomyces* spp., y *Xanthomonas* spp. (Promotora Técnica Industria, 2007).

#### D. Pruebas de susceptibilidad

La determinación de las susceptibilidades antimicrobiales hacia aislamientos bacteriales es una de las principales funciones de los laboratorios de microbiología clínica, aunque estas técnicas también pueden ser aplicadas en patología vegetal. El objetivo principal de las pruebas de susceptibilidad es predecir el resultado del tratamiento con los agentes antimicrobiales evaluados. Lo que implica el resultado de “susceptible” es determinar la probabilidad que el paciente u objetivo de estudio responderá el tratamiento con la dosis apropiada del agente antimicrobiano. El resultado “resistente” implica que el tratamiento con el agente antimicrobiano es probable a fallar. La mayoría de los métodos también incluyen una categoría “intermedia” de susceptibilidad (Jorgensen *et al*, 2000).

Otro objetivo de las pruebas de susceptibilidad es guiar al investigador en la selección del agente más apropiado para un problema clínico en particular. En la mayoría de metodologías clínicas, los resultados de las pruebas de susceptibilidad son obtenidos usualmente luego de 24 a 48 horas. Estos resultados pueden confirmar la susceptibilidad del organismo a la droga inicialmente recetada o pueden indicar la resistencia, para este último caso, una terapia alternativa puede ser necesaria. Los resultados de susceptibilidad deberían incluir agentes antimicrobianos alternativos, del cual el patógeno sea susceptible (Jorgensen *et al*, 2000).

1. Métodos de pruebas de susceptibilidad. Laboratorios de microbiología clínica pueden escoger dentro de una serie de tipos de pruebas antibacteriales de susceptibilidad. Estos incluyen microdilución en caldo, difusión por disco, gradiente antibiótico y métodos con instrumentos automatizados. En años recientes, ha habido una tendencia al uso de microdilución en caldo y los métodos con instrumentos automatizados, aunque ha habido un interés renovado en las pruebas por difusión por disco por su inherente flexibilidad en la selección de drogas y su bajo costo. También es uno de los mejor establecidos y más experimentados de todas las pruebas de susceptibilidad y continúa siendo actualizada por diferentes publicaciones de las ciencias clínicas. Además, las categorías cualitativas de interpretación con los resultados de “susceptible”, “intermedia”, y “resistente” obtenidos por la prueba de disco son claramente comprendidos e interpretados por los laboratoristas (Jorgensen *et al*, 2000).

## E. Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizan para evaluar el daño que provoca un patógeno en un organismo. Existen diferentes métodos tales como: Aspersión de inóculo (Contreras *et al*, 1993; Hernández *et al*, 1992), causando heridas en el tejido vegetal con diferentes métodos utilizando agujas o cuchillas, lesionando con una suspensión de bacteria con un abrasivo tal como carborundum, entre otras técnicas. Luego se le aplica el inóculo con atomizador, con asa microbiológica, jeringa, micropipeta, palillo de madera o con hisopo. Otras maneras de inocular es rociando el inóculo con atomizador o inyectando el inóculo con una aguja o jeringa (Schaad, 2001).

Se espera que al realizar una prueba de patogenicidad exista un potencial de producirse una variedad de reacciones tal como necrosis, clorosis, decoloración, erupciones o alguna reacción hipersensitiva a altas concentraciones de inóculo. Algunas de las reacciones de plantas inoculadas pueden ser interpretadas como una respuesta patógena positiva (Schaad, 2001).

Principios para realizar pruebas de patogenicidad:

1. Crecer plantas libres de patógeno bajo condiciones favorables a su crecimiento y las cuales se aproximan a las condiciones para el desarrollo de la enfermedad en el campo.
2. Seleccionar la técnica de inoculación que simula el método natural de inoculación o infección.
3. Utilizar bajas dosis de bacteria en la inoculación ( $10^5$  a  $10^6$  CFU/ml) cuando se rocíe o infiltre la planta.
4. Los síntomas obtenidos de la inoculación deben parecerse a aquellos ocurridos en el campo (Schaad, 2001).

Las especies del grupo *Erwinia* pueden ser inoculadas en plantas al rociar el inóculo con atomizador (Contreras *et al*, 1993), causar heridas en el tejido vegetal y aplicar inóculo, o inyectando el inóculo con una aguja o jeringa. Un rango de concentraciones del inóculo ( $10^4$  –  $10^8$  CFU/ml) debería ser evaluada (Schaad, 2001).

## XVII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Área de estudio

La investigación se llevó a cabo durante el mes de febrero 2007 en un bloque de 10 árboles de la finca El Retiro, ubicada en San José Chacayá, Departamento de Sololá, con coordenadas 14° 46.655' latitud Norte y 91° 12.860' latitud Oeste, a una altitud de 2215 msnm. La finca consta de un área aproximada de 15 manzanas, dedicadas en su mayoría a la producción de aguacate. La plantación tiene una edad de entre 5 y 6 años, y cuenta con 4000 árboles sembrados.

### B. Métodos

#### 1. Pruebas de laboratorio

- a. Aislamiento de bacterias. Utilizando un bisturí estéril, se removió una porción de tejido vegetal

dañado. El tejido se desinfectó por 3 minutos en una dilución de 1:10 de cloro doméstico (5.25% hipoclorito de sodio) y luego se lavó en agua estéril. El tejido se maceró sobre una gota de agua con un bisturí en una caja de Petri. El macerado se estrió en un medio de agar nutritivo con un asa microbiológica. Se incubó durante 24 a 48 horas y se observó si hubo crecimiento bacteriano. En este caso, las colonias diferentes se purificaron, estriándose nuevamente en una caja de Petri con agar nutritivo para asegurar la pureza de la bacteria, ver diagrama no. 1 (ANEXO G) (Schaad, 2001).

- b. Identificación de *E. carotovora*. En un portaobjetos limpio, se colocó una película fina de la bacteria y se flameó el envez del portaobjetos en un mechero para fijar la bacteria. Se añadió una solución de cristal violeta sobre la película y luego de un minuto se lavó con agua y se dejó secar el exceso. Se añadió una solución de lugol y luego de un minuto se lavó con agua. Se decoloró con etanol durante 30 segundos y lavó con agua. La película se tiñó durante 10 segundos con solución de safranina, y lavó con agua y dejó secar. En un microscopio, se observó la morfología de la bacteria y color de éstas. Si la bacteria tenía una coloración rosada, pertenece al grupo de las Gram negativas. La coloración violeta de éstas las identifica como bacterias de tipo Gram positivas, ver diagrama No. 2 (ANEXO G) (Schaad, 2001).

Las bacterias purificadas e identificadas como bacilos Gram negativas, se sembraron en tubos de ensayo con el medio de Hugh y Leifson (HL) que determina el crecimiento anaeróbico. En esta

prueba un cambio de color de azul a amarillo en ambos tubos es tomado como positivo para crecimiento (fermentación) anaeróbica e identifica a la bacteria como *Erwinia* sp., ver figura no. 2 (ANEXO E) (Schaad, 2001).

Para identificar la especie de la bacteria, se inoculó ésta en una rodaja de papa. Luego de 24 a 48 horas de incubación en una caja de Petri sellada, si se observa en la papa una pudrición blanda, se describe la bacteria como *Erwinia carotovora*. Si la porción de la papa inoculada se seca, la bacteria se identifica como *Erwinia amylovora* (Schaad, 2001).

Utilizando esta metodología de aislamiento e identificación de *Erwinia carotovora*, se determinó la presencia de la bacteria en las muestras recolectadas en campo para evaluar la sistematicidad de la bacteria y la efectividad de los tratamientos químicos.

#### c. Pruebas de susceptibilidad

##### ▪ Preparación del inóculo

Utilizando un asa estéril, se removió una masa de células de la bacteria a partir del cultivo en agar. Se transfirió la masa a un erlenmeyer con 250 ml de caldo nutritivo y agitó en un agitador rotatorio a 24-28°C a 200 rpm. Luego de 15 horas, se removió 1.0 ml de la suspensión y añadió en un frasco con caldo fresco y colocó de nuevo en el agitador rotatorio. Se incubó por 4 a 6 horas hasta que el cultivo alcanzó una lectura de turbidez de 0.08-0.1 unidades ópticas a 640 nm en un espectrofotómetro (Jorgensen *et al*, 2000).

##### ▪ Prueba de difusión por discos

Empezando con un caldo de turbidez de 0.1 unidades ópticas a 640 nm, se prepararon diluciones de 100%, 75%, 50% y 25% de inóculo para evaluar el efecto de los productos químicos a diferentes concentraciones de bacteria, soluciones que fueron diluidas con caldo nutritivo estéril. En las cajas de Petri, se agregó 100  $\mu$ l con una pipeta y esparció en el medio uniformemente y se dejó secar el inóculo durante 15 minutos. Se agregó 35  $\mu$ l del tratamiento bactericida (ver Cuadro No. 1) en un disco estéril y con unas pinzas inocuas, se colocó el disco sobre el medio. No más de 4 discos se

pueden colocar sobre una caja de 100 mm de diámetro. Se incubó a 30°C durante 24 horas y observó si hubo una formación de un halo libre de crecimiento bacteriano alrededor del disco. Se realizó esta lectura a las 48 horas también. Para bacterias fitopatógenas, la formación de un área libre de crecimiento bacteriano en la circunferencia del disco significa la inhibición de crecimiento por parte del agente antimicrobiano (Jorgensen *et al*, 2000). Los resultados obtenidos de estas pruebas se clasifican según el Cuadro No. 2.

**Cuadro No. 1: Descripción de los tratamientos de productos bactericidas evaluados para las pruebas de susceptibilidad.**

Producto	Ingrediente activo	Dosis recomendada
Agri-mycin 16,WP	Estreptomicina Oxitetraciclina	2.0 g/l
Kilol L-DF-100 11 SL	Extracto de semilla de cítricos	2.5 - 5.0 cc/l
Phyton 27	Sulfato de cobre pentahidratado Cobre metálico	1.5 – 4.0 g/l
Timsen 40 WDG	n-alquil, dimetil, bencil, amonio, cloruro	1.5 - 4.0 g/l
Terramicina Agrícola	Oxitetraciclina	2.0 g/l
Vanodine	Complejo yodo-etanol	4.0 cc/l
Agry-Gent Plus 8 WP	Sulfato de Gentamicina Clorhidrato de Oxitetraciclina	2.0 g/l
Kocide 101 77 WP	Hidróxido de Cobre Cobre metálico	2.0 g/l

**Cuadro No. 2: Categorías de susceptibilidad para prueba de difusión por discos en bacterias fitopatógenas (Palmieri, 2007).**

Categoría	mm
Resistente	0 – 2
Intermedia	2 – 5
Susceptible	5 <

En las pruebas de susceptibilidad, se tomó la dosis recomendada como base, y se aumentó y disminuyó, para determinar el efecto que tenía el agente antimicrobiano sobre la bacteria a diferentes concentraciones.

## 2. Pruebas de campo

### a. Selección de área y muestra

Se seleccionó un área donde estuviera presente el problema del anillamiento. Se eligieron 10 árboles y dentro de cada uno de ellos se seleccionaron 4 ramas en fructificación, las cuales fueron identificadas para la aplicación de su tratamiento respectivo utilizando platos plásticos. Se utilizó un experimento mediante un diseño de bloques completamente al azar con cinco repeticiones. En éste, cada rama representaba una unidad experimental, donde un bloque de tratamientos consistía de 2 árboles.

Sobre ramas en fructificación, se inoculó de *E. carotovora*, donde luego de 48 horas se suministraron los tratamientos a evaluar (Cuadro No. 3). Se hicieron tres aplicaciones, éstas espaciadas a intervalos de 7 días.

**Cuadro No. 3: Tratamientos evaluados en campo.**

Tratamiento	Aplicación	Dosis
A	Agrimycin	2.0 g/l
B	Vanodine	4 cc/l
C	Agry-Gent	2.0 g/l
D	Control	-
E	Terramicina Agrícola	2.0 g/l
F	Kocide	2.0 g/l
G	Control (agua)	-
H	Testigo (sin inóculo)	-

### b. Pruebas de patogenicidad

Para determinar la patogenicidad en campo de la bacteria, se realizaron conteos de frutos enfermos y sanos. Inicialmente, se eliminaron los frutos enfermos de cada rama, para luego aplicar el inóculo. Posteriormente, se realizaron conteos a los 15 días y 21 días.

### c. Evaluación de tratamientos bactericidas

Para determinar la presencia de *Erwinia carotovora* en aguacate, se tomaron muestras provenientes de las ramas donde se aplicaron los tratamientos. Éstas correspondieron a las siguientes partes vegetativas: hojas, tallos, frutos sanos, frutos enfermos (cuando presentes) y del tronco, y fueron tomadas previo a la inoculación y a los 21 días. Esto se realizó utilizando tijeras de podar y/o navaja, herramientas que eran desinfectadas en la toma de cada muestra con cloro doméstico al 10% para

evitar contaminación entre muestras. Cada muestra era almacenada en bolsas ziploc individuales. Los cuales fueron trasladados al laboratorio de Fitopatología de la Universidad del Valle de Guatemala para su análisis mediante las pruebas de aislamiento e identificación de bacterias.

Para la evaluación en campo, se utilizó la dosis recomendada por la casa comercial (Cuadro No. 3). Los tratamientos D y G corresponden a controles, a diferencia que al primero no se le realizó ningún tipo de aspersión, mientras que al G se le aplicó agua. El tratamiento H es el testigo, al cual no se le aplicó inóculo y sus aplicaciones consistieron de agua.

3. Variables de respuesta. Las variables de respuesta en este estudio fueron el porcentaje de caída de frutos para determinar la patogenicidad de *E. carotovora*; y la presencia de la bacteria en las muestras frutos sanos, frutos enfermos, hojas, tallos y tronco de los árboles para evaluar la efectividad de los tratamientos químicos.

4. Análisis estadístico. El análisis de variables de respuesta se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para cada variable y se les aplicó la prueba de Tukey cuando existían diferencias significativas (Dytham, 2003).

## XVIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Pruebas de susceptibilidad de *E. carotovora* a bactericidas.

En el Cuadro No. 4 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad de *E. carotovora* hacia los diferentes bactericidas.

**Cuadro No. 4: Interpretación de pruebas de susceptibilidad de *E. carotovora* a bactericidas**

Tratamiento	Resistente	Intermedia	Susceptible
Kilol	X		
Pitón	X		
Timsen	X		
Kocide		x	
Vanodine		x	
Agrimycin			X
Agry-Gent			X
Terramicina Agrícola			X

Según se puede apreciar en el Cuadro No. 4, en las pruebas de susceptibilidad que se le realizaron a los agroquímicos Kilol, Phyton 27 y Timsen, la bacteria presentó gran resistencia hacia estas sustancias antimicrobianas, siendo negativos los resultados ya que no hubo ningún o muy poco grado de inhibición de crecimiento bacteriano por parte de los químicos. Por consiguiente estos agentes con propiedades bactericidas no se tomaron en cuenta al realizar las pruebas de patogenicidad en campo. El hecho de que los resultados obtenidos en estas pruebas fueran negativos no significa que estos productos no puedan ser utilizados para el control de bacterias en campo, simplemente que en estas pruebas de laboratorio realizadas no le presentaron susceptibilidad hacia la bacteria evaluada.

La bacteria presentó una susceptibilidad intermedia hacia los productos Kocide y Vanodine.

La bacteria presentó mayor susceptibilidad hacia productos elaborados en base de sustancias antibióticas tal como Agrimycin, Agrygent y Terramicina Agrícola (Cuadro No. 4). El Agrimycin fue el producto más efectivo en la inhibición de crecimiento bacteriano. Para la mayoría de dosis evaluadas, la bacteria se presentó susceptible hacia este agente antimicrobiano, inclusive a concentraciones bajas del agroquímico. La combinación de estreptomina y oxitetraciclina resulta ser la mezcla antibiótica más eficiente en la inhibición del crecimiento de la bacteria.

## B. Evaluación de bactericidas para el control de *E. carotovora* y pruebas de patogenicidad

Se hizo un análisis de varianza para evaluar el efecto de los tratamientos químicos sobre la caída de los frutos. En el Cuadro No. 5, se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, ya que el valor de significancia es mayor al de probabilidad requerido de 0.05.

**Cuadro No. 5: Análisis de Varianza de caída de frutos según tratamientos.**

Source	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de medias	F	Sig
Tratamiento	0.391	7	0.056	0.554	0.791
Día	13.241	2	6.621	65.637	0.000
Tratamiento *					
Día	0.538	14	0.038	0.381	0.977
Error	9.683	96	0.101		
Total	171.906	120			

Valores menores de  $p=0.05$  indica que no hay diferencias significativas.

Esto que indica que ninguno de los tratamientos bactericidas es efectivo para el control de la caída de los frutos. A pesar de que los tratamientos no tuvieron ningún efecto de control sobre la caída de los frutos, la cantidad de éstos fue en aumento a partir del día 0, 15 y 30 respectivamente (Gráfica No. 1).

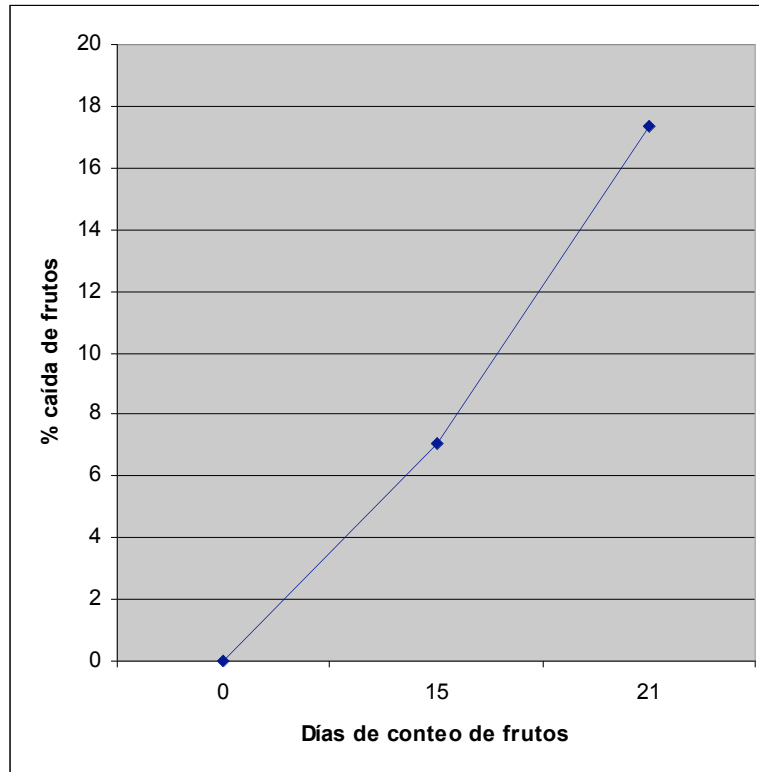
**Cuadro No. 6: Cantidad de frutos caídos y su porcentaje en los diferentes tratamientos.**

Tratamiento	Total frutos caídos	% frutos caídos	Grados angulares	Grupo
A	15	21.90%	0.221	a
B	8	13.33%	0.134	a
C	17	25.29%	0.256	a
D	9	17.98%	0.181	a
E	15	17.35%	0.174	a
F	10	10.21%	0.102	a
G	14	16.30%	0.164	a
H	11	16.30%	0.164	a
<b>Promedio</b>	12.38	17.33%		

En el Cuadro No. 6, se refleja la caída de frutos en cada tratamiento evaluado. Los grados angulares seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes, por lo que todos los tratamientos se encuentran en un mismo grupo.

Según los resultados de este estudio se rechaza la hipótesis 2, ya que *E. carotovora* no es el agente causal del anillamiento del pedúnculo en frutos de aguacate, el uso de bactericidas no tuvo ningún efecto en la reducción de frutos caídos, por lo que no debe de sugerirse su aplicación al agricultor para el control de esta enfermedad.

**Gráfica No. 1: Porcentaje de caída de frutos en lecturas realizadas**



La cantidad de frutos caídos debido al anillamiento del fruto aumentó a medida que transcurría el tiempo, hasta presentarse una caída del 17.33% al final de la evaluación (Gráfica No. 1).

Los resultados obtenidos de este estudio coinciden con los obtenidos en México, que no existe ningún patógeno en particular que cause la caída de los frutos y podría ser una combinación de factores descontando aspecto fenológicos (reguladores de crecimiento) y nutricionales (deficiencia de macro y micronutrientes) en las plantas, factores que deben estudiarse en el futuro (Téliz, 2000).

El hecho de que la caída de frutos en el tratamiento testigo fue similar a la de los tratamientos químicos, reafirma que la inoculación de la bacteria no contribuyó en la caída de los frutos, por lo cual se rechaza su patogenicidad en la caída de los frutos.

#### C. Evaluación de bactericidas en el control de *E. carotovora*.

Según el ANDEVA (Cuadro No. 7), no se encontraron diferencias significativas respecto al control (presencia) de la bacteria antes y después de la aplicación de los diversos tratamientos. Esto implica que ningún tratamiento controló la infección de *E. carotovora* presente.

Se puede agregar que las pruebas de susceptibilidad no aseguran control de la bacteria en campo, a pesar de los resultados positivos para algunos agroquímicos.

**Cuadro No. 7: ANDEVA. Presencia de *E. carotovora* en tratamientos evaluados.**

Source	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de medias	F	Sig
Tratamiento	0.436	7	0.062	0.936	0.485
Día	0.613	1	0.613	9.203	0.003
Tratamiento *					
Día	0.528	7	0.075	1.134	0.353
Error	4.26	64	0.067		
Total	10.236	80			

#### D. Determinación de la sistematicidad de *E. carotovora*

En el Cuadro No. 8 y 9 se puede observar que el porcentaje de partes del árbol con *E. carotovora* son más altos en el tronco que en los frutos, pedicelos y hojas de los árboles evaluados. Esto se puede deber a que la planta presenta mayor infección de *Erwinia* conforme se acerca al suelo, debido a que en estas zonas existen condiciones favorables de crecimiento y posible presencia de la bacteria en el suelo.

**Cuadro No. 8: Presencia de *E. carotovora* en muestras iniciales (sin inóculo, ni tratamientos)**

Réplica	Lectura I										Total	%
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
Fruto enfermo	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	20%
Fruto sano	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	3	30%
Pedicelo/Hojas	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	20%
Tronco	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	4	40%

**Cuadro No. 9: Presencia de *E. carotovora* después de tratamientos químicos.**

Réplica	Lectura II										Total	%
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
Fruto enfermo	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	20%
Fruto sano	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	3	30%
Pedicelo/Hojas	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	10%
Tronco	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	4	40%

Los resultados de este estudio confirman el hecho de que *Erwinia* sp. es sistémica y por consiguiente su control con el uso de bactericidas no es muy efectivo (Universidad de Puerto Rico, 2007).

## XIX. CONCLUSIONES

- A. Los bactericidas elaborados con base a estreptomicina, gentamicina y oxitetraciclina interfieren en el crecimiento de *E. carotovora* bajo condiciones de laboratorio.
- B. Ninguno de los bactericidas evaluados tiene efecto de control en la caída de los frutos causada por el anillamiento.
- C. La bacteria *Erwinia carotovora* no es el organismo causal del anillamiento de los frutos.
- D. *E. carotovora* ocurre en los tejidos de las plantas de aguacate ‘Hass’ y conforme sus tejidos están más cerca del suelo, su incidencia es mayor.
- E. Se acepta la hipótesis que *Erwinia* se encuentra sistémica en las plantas de aguacate.
- F. Se rechaza la hipótesis que indica que *Erwinia* es el patógeno causante del anillamiento del fruto.
- G. Se rechaza la hipótesis que indica que los bactericidas controlan la caída del fruto.

## XX. RECOMENDACIONES

1. Evaluar otras alternativas que podrían estar relacionadas con el anillamiento del fruto, tales como el efecto de nutrientes aplicados al follaje.
2. Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en la caída de los frutos.
3. Evaluar el efecto de aplicaciones de etileno en la caída de los frutos.
4. En el establecimiento de la plantación, se recomienda utilizar material libre de bacterias.

## XXI. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. 2002. Fitopatología. 2ª Edición. México. Uteha-Noriega Editores. 838 págs.
2. Arai, N. 2001. Procedimiento Simplificado para la Identificación de Bacterias Fitopatógenas. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 329 págs.
3. Dytham, C. 2003. Choosing and Using Statistics. A Biologist's Guide. Blackwell Publishing. USA. 247 págs.
4. Guía técnica para producir aguacate en Michoacán [Consulta abril 4 2007].
5. Jonse, J. *et al.* 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3<sup>rd</sup> Edition. USA. The American Pathological Society. 373 págs.
6. Jorgensen, J.H., J.D. Turnidge. 2000. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. *Clinical Infectious Diseases*. 70: 1108-1127.
7. Martínez, B.R. 1977. Enfermedades del aguacatero en la región de Uruapan, Michoacán, México. *IV Simposio Nacional de Parasitología Agrícola*. Pfizer de México. 37 p.
8. Martínez, B.R. Identificación del anillamiento del pedúnculo en el futuro del aguacate. II Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. México. Actualidades Técnicas
9. Martínez, B.R.; A.J.L. González. 1975. Pruebas para el control del anillamiento del fruto de aguacate en la región de Uruapan, Michoacán. Facultad de Agrobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. Págs 7-10.
10. Porres, M.A. 2007. *Estudio de plagas que afectan el cultivo de aguacate, Persea americana Mill 'Hass' (Laurales: Lauraceae) en Guatemala*. Agrocyt-Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
11. Schaad, J.B., W. Chun. 2001. *Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. APS Press. EE.UU. 373 págs.
12. Téliz, D. El Aguacate y su manejo integrado. México. Ediciones Mundi-Prensa. 2000. 219 p.
13. Turnidge, J.D., M.J. Ferraro y J.H. Jorgensen. 2000. Susceptibility Test Methods: General Considerations. *Clinical Infectious Diseases*. 69: 1102-1107.
14. Vásquez, J.T. y E.T. Acevedo. 1970. Observaciones sobre la pudrición del pedúnculo del aguacate en arias regiones tropicales de México. *I Con. Nac. Frut. Men*. Aguascalientes, S.A. 505-511 págs.
15. Weber, G. 1973. Bacterial and Fungal Diseases of Plants in the Tropics. Florida. University of Florida Press. 673 págs.
16. Werkman, C.H. *et al.* 1951. Bacterial Physiology. New York. Academic Press. 707 págs.

### Otras referencias:

- A. Anacafé. 2004. Cultivo de Aguacate. Disponible en Internet: <<http://portal.anacafe.org/Portal/Documents/Documents/2004-12/33/5/Cultivo%20de%20Aguacate.pdf>>
- B. Campi, L. *et al.* *Estudio sobre la epidemiología de Erwinia spp.* [ref. de 22.05.1997]. Disponible en Internet: <<http://www.redepapa.org/erwinia4.pdf>>.
- C. Campos, Eduardo. *et al.* 1996. Guía Técnica para producir aguacate en Michoacán. Disponible en Internet: <[http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX\\_1997/Prod\\_Nal\\_Agua.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX_1997/Prod_Nal_Agua.pdf)> [Consulta abril 3 2007].

- D. Enfermedades en las ornamentales causadas por bacterias. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico. Disponible en Internet: < [http://seam.uprm.edu/forest/Publicaciones/Clinica\\_Bacterias.htm](http://seam.uprm.edu/forest/Publicaciones/Clinica_Bacterias.htm) > [Consulta abril 19 2007].
- E. Franco, Y. *et al.* Patogenicidad y virulencia de aislamientos de *Erwinia sp.* en semillas de papa importada. Ciudad de la Habana. Fitosanidad. Vol. 8, No. 4. Diciembre 2004. Disponible en Internet: < [http://www.inisav.cu/fitosanidad/2004/8\(4\)04.pdf](http://www.inisav.cu/fitosanidad/2004/8(4)04.pdf) >.
- F. García, R. *Especies y sub-especies de Erwinia, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada, en el estado de Mérida-Venezuela.* Revista Forestal Venezuela. Vol. 44. 2000. 107-114 p. Disponible en Internet: < [http://www.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/pubelectronicas/revistaforestal/vol44-1/articulo44\\_1\\_12.pdf](http://www.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/pubelectronicas/revistaforestal/vol44-1/articulo44_1_12.pdf) >.
- G. Hernández, Y. *et al.* Relaciones serológicas entre aislamientos bacterianos de los géneros *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Pantoea*. Caracas. INCI Vol. 29, No. 8. Agosto 2004. Disponible en Internet: < [http://findarticles.com/p/articles/mi\\_hb4364/is\\_200408/ai\\_n15250659](http://findarticles.com/p/articles/mi_hb4364/is_200408/ai_n15250659) >.
- H. Palmieri, Margarita. 2007. Entrevista.
- I. Universidad de Puerto Rico. Enfermedades causadas por bacterias. Disponible en Internet: < [http://seam.uprm.edu/forest/Publicaciones/Clinica\\_Bacterias.htm](http://seam.uprm.edu/forest/Publicaciones/Clinica_Bacterias.htm) > [Consulta abril 18 2007].
- J. Vásquez, Josué. 2005. Identificación de aguacate nativo y formación de jardines clonales con aguacate nativo seleccionado. Guatemala. Disponible en Internet: < [http://www.icta.gob.gt/fpdf/infop/frut\\_ls/INFORMEAGRCYT.2004.FEBRERO.2005.pdf](http://www.icta.gob.gt/fpdf/infop/frut_ls/INFORMEAGRCYT.2004.FEBRERO.2005.pdf) >
- K. Wilhelmy, Carlos. 1995. Efecto del anillado, doble incisión y paclbutrazol sobre la cuaja y producción de paltos rebajados (*Persea americana* Mill) cv. Hass. Chile. Disponible en Internet: < [http://www.avocadosource.com/papers/Chile\\_Papers\\_A-Z/V-W-X/WilhelmyCarlos1995b.pdf](http://www.avocadosource.com/papers/Chile_Papers_A-Z/V-W-X/WilhelmyCarlos1995b.pdf) > [Consulta abril 5 2007].
- L. *Yo aplico lo mejor ¿U usted?* Promotora Técnica Industrial. Disponible en Internet: <http://www.ultraquimia.com/antibioticos.pdf> . [Consulta abril 4 2007].
- M. Hernández, Y., G. Trujillo, Luciani, J. 1992. Reacciones de cultivares de Batata y evaluación de diferentes metodologías de inoculación de la bacteria *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1895) Dowson 1939. *Agonomía Tropical* 44(4). Venezuela. 555-556 págs. Disponible en Internet: < [http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v44\\_4/v444a010.html](http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v44_4/v444a010.html) > [Consulta junio 17 2007].
- N. Contreras, N., G. Trujillo, Hernández, Y. 1993 *Erwinia herbicola* causante de un tizón en hojas de *Aglaonema sp.* *Agonomía Tropical* 44(3) 335-343 págs. Disponible en Internet: < [http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v44\\_3/v443a010.html](http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v44_3/v443a010.html) > [Consulta junio 17 2007].

XXII. ANEXOS

A. Pruebas de susceptibilidad

**Cuadro No. 10: Prueba de susceptibilidad para Kilol**

Dosis (ml/l)	Repetición I				Repetición II			
	Concentración de bacteria				Concentración de bacteria			
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
2,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

**Cuadro No. 11: Prueba de susceptibilidad para Phytol 27**

Dosis (ml/l)	Repetición I				Repetición II			
	Concentración de bacteria				Concentración de bacteria			
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
1,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

**Cuadro No. 12: Prueba de susceptibilidad para Timsen**

Dosis (g/l)	Repetición I				Repetición II			
	Concentración de bacteria				Concentración de bacteria			
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
0,75	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3,0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	1.0	1.0
5,0	0.0	0.0	1.0	0.0	2.0	0.0	1.0	1.0
7,0	-	-	-	-	0.0	2.0	2.0	0.0

**Cuadro No. 13: Prueba de susceptibilidad para Vanodine**

Dosis (g/l)	Repetición I				Repetición II			
	Concentración de bacteria				Concentración de bacteria			
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
4,0	0.5	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0
8,0	3.0	2.0	2.0	3.0	1.5	1.5	2.0	2.5
12,0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	3.0

**Cuadro No. 14: Prueba de susceptibilidad para Kocide**

Dosis (g/l)	Repetición I				Repetición II			
	Concentración de bacteria				Concentración de bacteria			
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
1,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.5	1.0	1.0
4,0	1.5	1.0	2.0	2.0	1.5	1.5	2.0	1.5
8,0	2.0	2.0	3.0	3.0	1.5	1.0	3.0	3.0

**Cuadro No. 15: Prueba de susceptibilidad para Agrimycin**

Dosis (g/l)	Repetición I				Repetición II			
	Concentración de bacteria				Concentración de bacteria			
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
0,5	4.0	5.0	5.0	6.0	-	-	-	-
1,0	5.0	6.0	6.0	6.0	4.0	5.0	5.0	6.0
2,0	6.0	7.0	7.0	7.0	6.0	6.0	6.0	7.0
3,0	-	-	-	-	7.0	7.0	7.0	8.0
4,0	7.0	8.0	8.0	8.0	7.0	7.0	8.0	8.0
8,0	-	-	-	-	8.0	8.0	9.0	9.0

**Cuadro No. 16: Prueba de susceptibilidad para Terramicina Agrícola**

Dosis (g/l)	Repetición I				Repetición II			
	Concentración de bacteria				Concentración de bacteria			
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
0,5	2.0	2.0	2.0	2.0	-	-	-	-
1,0	3.0	3.0	4.0	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0
2,0	5.0	5.0	6.0	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0
3,0	-	-	-	-	5.0	5.0	4.0	5.0
4,0	6.0	6.0	7.0	7.0	6.0	6.0	6.0	5.0
8,0	-	-	-	-	8.0	8.0	8.0	8.0

**Cuadro No. 17: Prueba de susceptibilidad para Agrygent**

Dosis (g/l)	Repetición I				Repetición II			
	Concentración de bacteria				Concentración de bacteria			
	100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%
0,5	3.0	4.0	4.0	5.0	3.0	4.0	4.0	5.0
1,0	4.0	5.0	4.0	6.0	4.0	5.0	4.0	6.0
2,0	5.0	6.0	5.0	7.0	2.0	5.0	5.0	7.0
4,0	7.0	7.0	5.0	7.5	7.0	6.0	5.0	7.5
8,0	7.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0	6.0	7.0

## B. Presencia de bacteria detallada

**Cuadro No. 18: Presencia de bacteria en muestras analizadas para cada tratamiento**

Tratamiento	Tejido	Repetición					Total
		I	II	III	IV	V	
A	FE	-	-	-	-	+	1
	FS	-	-	-	-	-	0
	HT	-	-	-	-	-	0
B	FE	-	-	-	-	-	0
	FS	-	-	-	+	-	1
	HT	-	-	-	-	+	1
C	FE	-	-	-	-	+	1
	FS	-	+	-	-	-	1
	HT	-	-	+	-	+	2
D	FE	-	-	+	-	-	1
	FS	-	-	-	-	-	0
	HT	-	+	-	-	-	1
E	FE	-	+	-	-	-	1
	FS	-	+	+	-	-	2
	HT	-	-	-	-	-	0
F	FE	-	+	-	-	-	1
	FS	-	-	-	-	-	0
	HT	-	-	-	-	-	0
G	FE	-	-	-	-	-	0
	FS	+	-	+	-	+	3
	HT	-	-	-	-	-	0
H	FE	-	-	+	-	-	1
	FS	-	-	-	-	-	0
	HT	-	-	-	-	-	0

donde FE: Fruto enfermo, FS: Fruto sano, HT: Hoja y tallo

## C. Medios de cultivo y soluciones utilizadas en laboratorio

## 1. Agar nutritivo

	<u>Por Litro</u>
Extracto de carne (Disco)	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g

## 2. Caldo nutritivo

	<u>Por Litro</u>
Extracto de carne (Disco)	3.0 g
Peptona	5.0 g

## 3. Hugh y Leifson (HL)

	<u>Por Litro</u>
Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g

Agar	3.0 g
Azul de Bromotimol (al 1% en solución acuosa)	3.0 ml

## 4. Cristal violeta

Por Litro

Solución A:	
Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico (95%)	20.0 ml

Solución B:	
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80.0 ml

Mezclar soluciones A y B y filtrar.

## 5. Lugol

Por Litro

Yodo	1.0 g
Yodo potásico	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

## 6. Safranina

Por Litro

Solución Stock:	
Safranina 0	2.5 g
Alcohol etílico (95%)	100.0 ml

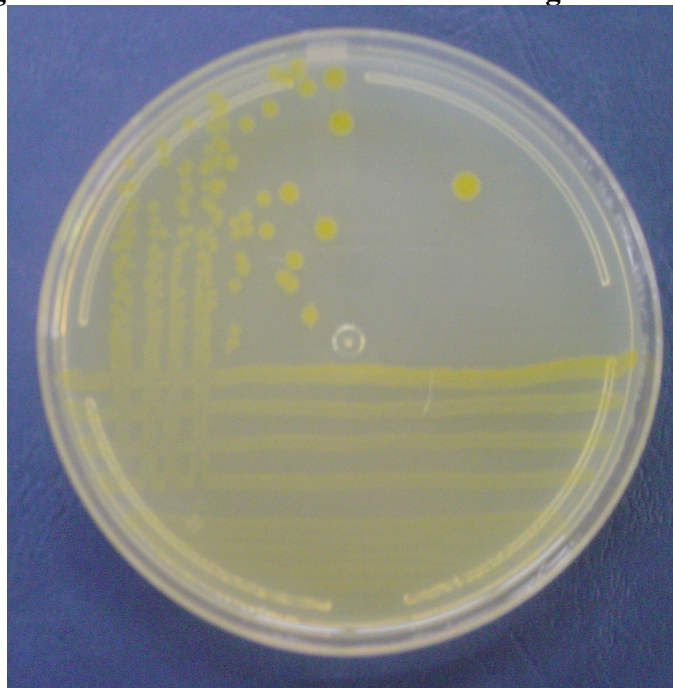
Solución de trabajo:	
Stock solution	10.0 ml
Agua destilada	90.0 ml

## D. Cronograma de actividades

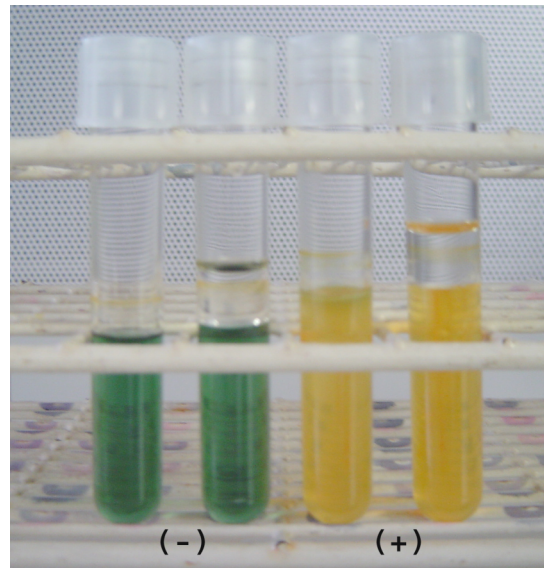
Figura No. 1: Cronograma de Actividades

Año	2006				2007					
	Diciembre				Enero	Febrero	Marzo	Abril		
Actividad										
Selección de Finca										
Aislamiento de bacterias										
Evaluación de bactericidas (Pruebas de susceptibilidad)	■	■	■	■						
Elaboración de Diseño experimental					■	■	■	■		
Preparación Material							■			
Inoculación							■			
Aplicación de Químicos							■	■	■	■
Muestreo Final									■	
Aislamiento de bacterias									■	■
Análisis de resultados									■	■
Informe										■

## E. Fotografías

Figura No. 2: Cultivo de *E. carotovora* en agar nutritivo.

**Figura No. 3: Prueba de HL, donde (+) identifica al genero *Erwinia* sp.**



**Figura No. 4: Prueba de susceptibilidad para Kilol a 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 g/l, respectivamente para los cuadrantes I, II, III y IV; donde la bacteria presentó resistencia al agroquímico.**



**Figura No. 5: Prueba de susceptibilidad para Agrymicin a 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 g/l, respectivamente para los cuadrantes I, II, III y IV; donde la bacteria presentó susceptibilidad al agroquímico.**



**Figura No. 6: Árbol sano en fructificación**



**Figura No. 7: Árbol con síntomas de anillamiento**

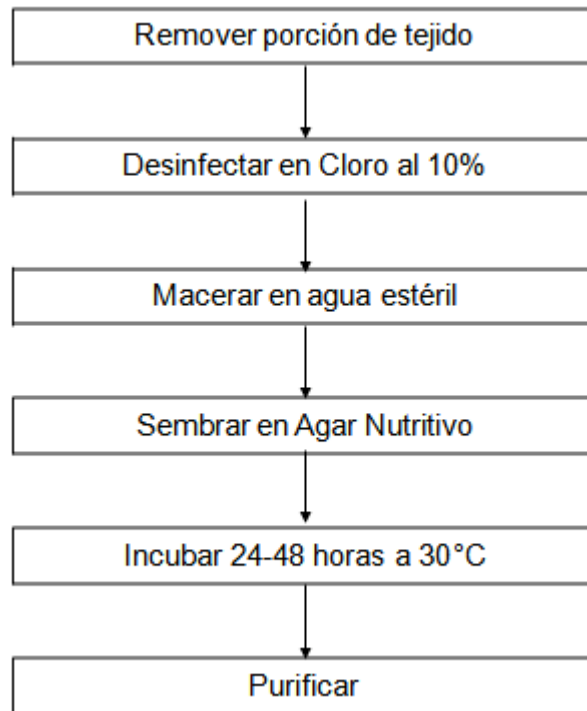


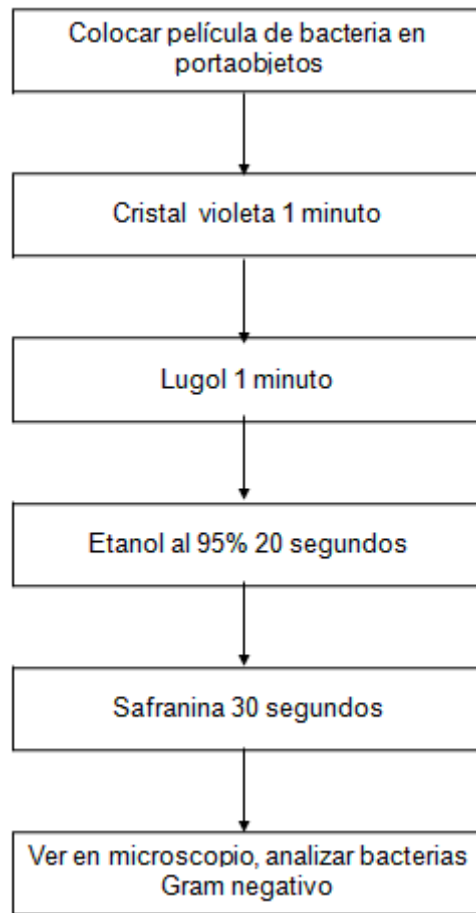
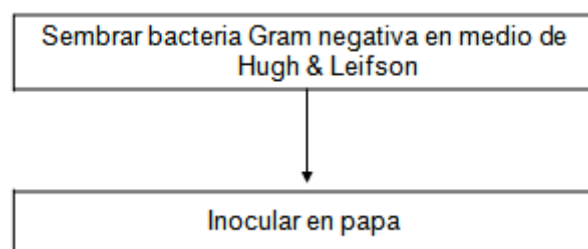
**Figura No. 8: Daño del anillamiento a nivel del pedúnculo**

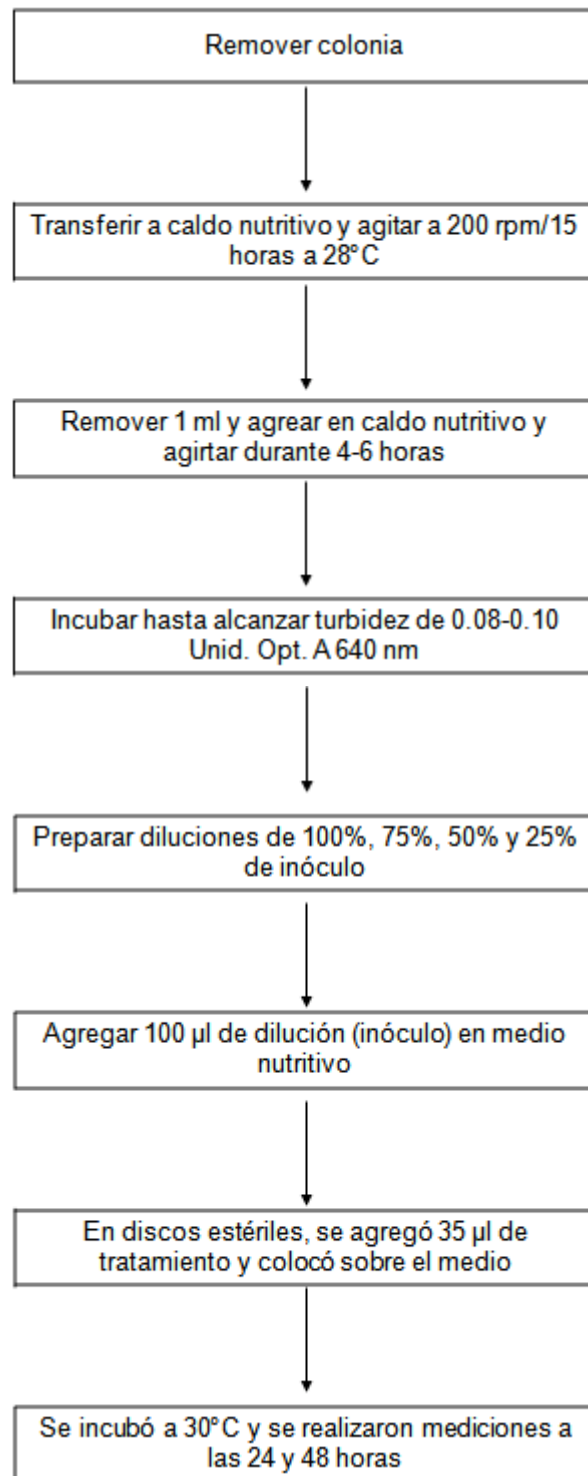


F. Diagramas de Flujo de procedimientos de laboratorio y campo

**Figura No. 9: Procedimiento para aislamiento de bacterias.**



**Figura No. 10: Procedimiento de prueba de Gram****Figura No. 11: Identificación de *E. carotovora***

**Figura No. 12: Pruebas de susceptibilidad: Método de difusión por discos**

**Figura No. 13: Metodología de inoculación en campo**