



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**SOBREVIVENCIA DE *Erwinia amylovora* EN SUELO Y SU
CAPACIDAD PARA CAUSAR INFECCIONES RADICULARES
EN MANZANO**

Por:

Iridian Caraveo Ruiz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE FISIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA ZONA
TEMPLADA

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Iridian Caraveo Ruiz la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz
Director de tesis



M.C. Alejandro Romo Chacón
Integrante del comité de tesis



Dr. Claudio Ríos Velasco
Integrante del comité de tesis



M. C. David Ignacio Berlanga Reyes
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Sobrevivencia de *Erwinia amylovora* en Suelo y su Capacidad para Causar Infecciones Radiculares en Manzano" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Iridian Caraveo Ruiz, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico durante los años de mi maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por darme la oportunidad de estudiar en esta institución.

A Dios por permitirme realizar este posgrado en este lugar y en este tiempo con gran satisfacción. En especial, a mi director de tesis Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz por siempre estar al pendiente de mi proyecto, por brindarme de su conocimiento, por estar a la disposición de ayudarme cada que lo necesité y por permitirme formar parte de su gran equipo de microbiología.

Al M.C. Alejandro Romo Chacón por estar siempre con ganas de ayudarme y por transmitirme sus conocimientos y correcciones para lograr que mi proyecto fuera mejor.

A los miembros restantes de mi comité de tesis, al Dr. Claudio Ríos Velasco y al M.C. David Ignacio Berlanga Reyes, por su disposición en ayudar y aconsejar mi proyecto de investigación.

A mis maestros de clases, mencionados y no mencionados anteriormente, Dr. David Sepúlveda, Dra. Isela Olivas, Dr. Zamudio Flores, M.C. Javier Molina por transmitirme de su conocimiento para formar profesionistas mejor preparados.

Al personal en general de CIAD Cuauhtémoc y a mis compañeros del Centro les agradezco su apoyo, su tiempo y su amena compañía.

DEDICATORIA

De todo corazón a mis padres y hermanos por estar incondicionalmente para mí, por apoyarme, guiarme y darme fuerzas para continuar, por su amor y sacrificio día con día para que yo pudiera llegar hasta donde estoy ahorita, infinitamente agradecida con Dios por la familia que me toco tener, cada sacrificio tiene su recompensa y este logro es de ustedes y para ustedes.

A mi pareja por apoyarme siempre y motivarme cada día que lo necesité, por siempre estar al pendiente de mí, por su amor y compañía, gracias!

Iridian Caraveo Ruiz

CONTENIDO

APROBACIÓN	1
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Manzano	14
2.2. Tizón de Fuego	14
2.2.1. Definición de la Enfermedad y Antecedentes.....	14
2.2.2. Agente Causal	15
2.2.3. Epidemiología.....	16
2.2.4. Factores Condicionantes	16
2.2.5. Sintomatología de la Enfermedad.....	17
2.2.6. Factores que Contribuyen en la Infección y la Diseminación de la Bacteria	18
2.2.7. Vías de Trasmisión de la Enfermedad	20
2.2.8. Manejo del Tizón de Fuego	20
2.3. <i>Erwinia amylovora</i>	21
2.3.1. Descripción de la Bacteria	21
2.3.2. Antecedentes	21
2.3.3. Factores de Virulencia	22
2.3.4. Motilidad de <i>Erwinia amylovora</i>	23
2.3.5. Sobrevivencia de <i>Erwinia amylovora</i> en Distintos Medios.....	23
2.3.6. Diseminación de la Bacteria	24
2.4. Suelos	24
2.4.1. Tipos de Suelos y Antecedentes	24
2.4.2. Características Físicoquímicas.....	27
2.5. Microbiota Presente en el Suelo	28
2.5.1. Bacterias Fitopatógenas	29
2.5.2. Nematodos y Hongos que Dañan las Raíces del Manzano.....	31
2.6. Susceptibilidad del Manzano.....	35
2.6.1. Portainjertos	35
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo General.....	38

CONTENIDO (continuación)

4.2. Objetivos Específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. Recolección de Suelos	39
5.1.1. Muestreo	39
5.1.2. Caracterización Fisicoquímica del Suelo.....	40
5.1.3. Análisis Microbiológicos.....	40
5.1.4. Esterilización del Suelo	41
5.1.5. Cuantificación de las Poblaciones Nativas de <i>E. amylovora</i>	41
5.1.6. Cepas de <i>E. amylovora</i>	41
5.1.7. Selección de Árboles de Manzana.....	47
5.1.8. Sobrevivencia de <i>E. amylovora</i> en suelo.....	47
5.1.9. Capacidad de Infección Radicular a Través del Suelo	48
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
6.1. Recolección de Suelos	49
6.2. Análisis Fisicoquímicos.....	50
6.3. Determinaciones Microbiológicas en dos Tipos de Suelos.....	47
6.3.1. Identificación y Cuantificación de <i>E. amylovora</i> Nativas en Suelo Negro y Suelo Rojo	48
6.4. Sobrevivencia de <i>E. amylovora</i> en Suelos	56
6.4.1. Determinación de la Sobrevivencia de <i>E. amylovora</i> en Suelo Negro.....	56
6.4.2. Determinación de la Sobrevivencia de <i>E. amylovora</i> en Suelo Rojo.....	58
6.4.3. Determinación de la Sobrevivencia de la Cepa H3 de <i>E. amylovora</i> Inoculada en Dos Tipos de Suelos.....	59
6.4.4. Determinación de la Sobrevivencia de la Cepa 10A en Dos Tipos de Suelos.....	61
6.5. Determinación de la Capacidad de Infección de <i>E. amylovora</i> a Través del Sistema Radicular.....	62
6.5.1. Evaluación del Efecto de <i>E. amylovora</i> Inoculado en Raíces del Portainjerto de Manzano MM 107	54
8. CONCLUSIONES	69
10. REFERENCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de triángulo para la identificación de clases texturales del suelo.	26
2. Sobrevivencia de <i>E. amylovora</i> en suelo negro después de 33 días de inoculación.....	50
3. Sobrevivencia de <i>E. amylovora</i> en suelo rojo a los 33 días post-inoculación.....	51
4. Sobrevivencia de <i>Erwinia amylovora</i> (H3) inoculada en dos tipos de suelos bajo diferentes condiciones.....	52
5. Sobrevivencia de <i>Erwinia amylovora</i> (10A) inoculada en dos tipos de suelos, desde el día 01 hasta el día 33 post-inoculación.	53
6. Capacidad de infección endófito de <i>E. amylovora</i> en portainjertos de manzano MM 107 a través de suelo inoculado a diferentes concentraciones.	55
7. Capacidad de colonización de <i>E. amylovora</i> en la superficie de raíces del porta-injerto de manzano MM.107, a través de suelo inoculado a diferentes concentraciones.....	56
8. Poblaciones de <i>Erwinia amylovora</i> en porta-injertos de manzano MM.107, después de 15 días de inoculación al suelo con una concentración de 10^6 UFC/g.	57
9. Portainjertos de manzano MM 107 después de 15 días de inoculación a una concentración de A) 10^6 y B) 10^8 UFC/g. observando tejido asintomático y necrosado respectivamente.	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Parámetros fisicoquímicos de los suelos negro y rojo.	46
2. Determinaciones microbiológicas en dos tipos de suelo.....	48
3. Cuantificación de poblaciones de <i>E. amylovora</i> nativa en dos tipos de suelo.	49

RESUMEN

La mayoría de las investigaciones con *E. amylovora* se ha centrado en la capacidad de infectar en la parte aérea del hospedero, dejando de lado las rutas de infección a través de las raíces que están prácticamente inexploradas. Por esta razón el estudio se enfocó en evaluar la capacidad de *E. amylovora* para sobrevivir en el suelo e infectar porta-injertos de manzano a través del sistema radicular. Se utilizaron muestras de suelo recolectadas en dos huertos de manzana, localizados en el municipio de Cuauhtémoc, principal zona productora de manzana en el estado de Chihuahua. Las muestras de suelo seleccionadas presentaban coloración negra y roja, respectivamente, a las cuales se les evaluaron sus características fisicoquímicas y microbiológicas, y se determinó la sobrevivencia de *E. amylovora*, tanto de las cepas inoculadas (10A y H3) como de poblaciones nativas de *E. amylovora* y otras poblaciones de microorganismos (hongos y levaduras). La capacidad de *E. amylovora* de infectar a través del sistema radicular, se evaluó en porta-injertos MM.107 de manzano con cuatro meses de edad, adquiridos de viveros comerciales en Cuauhtémoc, Chih. Los tratamientos consistieron en porta-injertos con lesión en el sistema radicular (A) y porta-injertos sin lesión (B). Las cepas de *E. amylovora* utilizadas como inóculo fueron 10A y H3. La textura de ambos suelos correspondió a franco arenosos. El suelo negro, presentó el mayor contenido (9%) de materia orgánica y las mayores poblaciones de hongos y levaduras con 4×10^6 UFC/g. En el suelo rojo, la población de mesofílicos aerobios fue mayor (1×10^6 UFC/g). En ambos suelos se aislaron poblaciones nativas de *E. amylovora* entre 3 y 5×10^3 UFC/g. Las cepas de *E. amylovora* (10A y H3) sobrevivieron en ambos suelos con poblaciones de 10^5 UFC/g a los 33 días post-inoculación. Ambas cepas de *E. amylovora* causaron infección y colonización de raíces, ocasionando la muerte del tejido de los porta-injertos a los 15 días post-inoculación.

Palabras clave: Tizón de fuego, infección, *Erwinia amylovora*, Porta-injerto, Suelo, Textura.

ABSTRACT

Most research with *E. amylovora* has focused on the ability to infect the aerial part of the host, leaving aside the routes of infection through the roots, which are practically unexplored. For this reason, the study focused on evaluating the ability of *E. amylovora* to survive in soil and infect apple rootstocks through the root system. Soil samples collected from two apple orchards located in the municipality of Cuauhtémoc, the main apple-producing area in the state of Chihuahua, were used. The selected soil samples were black and red colored, respectively, and their physicochemical and microbiological characteristics were evaluated, and the survival of *E. amylovora* was determined, both of the inoculated strains (10A and H3) and of native populations of *E. amylovora* and other populations of microorganisms (fungi and yeasts). The ability of *E. amylovora* to infect through the root system was evaluated in four-month-old apple tree rootstocks MM.107, acquired from commercial nurseries in Cuauhtémoc, Chih. The treatments consisted of rootstocks with lesions in the root system (A) and rootstocks without lesions (B). The strains of *E. amylovora* used as inoculum were 10A and H3. The texture of both soils corresponded to sandy loam. The black soil had the highest content (9%) of organic matter and the highest populations of fungi and yeasts with 4×10^6 conidia or CFU/g. In the red soil, the population of aerobic mesophilic fungi was higher (1×10^6 CFU/g). In both soils, native populations of *E. amylovora* were isolated between 3 and 5×10^3 CFU/g. *E. amylovora* strains (10A and H3) survived in both soils with populations of 10^5 CFU/g at 33 days post-inoculation. Both *E. amylovora* strains caused infection and colonization of roots, resulting in death of rootstock tissue at 15 days post-inoculation.

Key words: Fire blight, Infection, *Erwinia amylovora*, Graft carrier, Soil, Texture

1. INTRODUCCIÓN

El tizón de fuego es causado por *Erwinia amylovora* (Schroth *et al.*, 1974). Es la enfermedad bacteriana más devastadora de los miembros de la familia de las Rosáceas, afectando principalmente manzanos, perales y otros árboles frutales y/o ornamentales de importancia económica mundial (Van der Zwet *et al.*, 2012). El tizón de fuego es una enfermedad infecciosa difícil de controlar y es diferente a otras patologías vegetales. La enfermedad puede extenderse a todos los órganos de la planta y permanecer latente en el árbol, y de presentarse las condiciones adecuadas, tiene la capacidad de diezmar los huertos en corto plazo, y en consecuencia afectar los rendimientos y acortar la vida productiva del árbol (Vanneste, 2000a).

Los estigmas de la flor son el principal sitio de colonización de la bacteria ya que ofrecen un medio adecuado para la rápida multiplicación del patógeno (Wilson *et al.*, 1989b). Después, la bacteria tiene la capacidad de trasladarse a los nectarios por medio de escurrimientos, propiciado por lluvias o riegos, los azúcares contenidos en este sitio facilitan la multiplicación del patógeno y posterior ingreso al sistema vascular de la planta (Wilson *et al.*, 1990). Se ha sugerido que factores relacionados al patógeno, hospedero y condiciones climáticas condicionan la ocurrencia de la enfermedad.

Abundante literatura demuestra la capacidad de *E. amylovora* para causar la enfermedad del tizón de fuego en la parte aérea de los manzanos (Wilson *et al.*, 1989b). Sin embargo, existe la posibilidad de que esta vía de infección no sea la única. Hay evidencia de que la infección también es causada por medio del suelo infectado que entra en contacto con el sistema radicular del manzano (Hildebrand *et al.*, 2001). Se ha demostrado que cuando la humedad ambiental es alta induce en el patógeno la producción de exudados en el tejido vegetal en forma de gotitas que son fácilmente arrastradas por la lluvia o el viento, favoreciendo su diseminación (Hildebrand *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 1990). Se ha sugerido la posibilidad de que las gotas de exudados con el patógeno bacteriano puedan llegar al suelo y desde ahí propagarse a través de las raíces con la ayuda de insectos de suelo, micro artrópodos y nematodos diseminadores y en consecuencia causar la enfermedad (Chantanao *et al.*, 1969; Hildebrand *et al.*, 2000, 2001; Santander *et al.*, 2017). Sin embargo, las posibles rutas de infección de *E. amylovora*, incluidas las raíces, permanecen poco exploradas (Santander *et al.*, 2020).

La capacidad de *E. amylovora* para causar la enfermedad dependerá de muchos factores, pero especialmente de su capacidad para sobrevivir en entornos hostiles como el suelo. Se ha demostrado que *E. amylovora* sobrevive en suelos ricos en materia orgánica (MO) pero aún hay incógnitas que requieren ser estudiadas, por ejemplo la capacidad de sobrevivir en distintos tipos de suelo (Pereyra *et al.*, 2020). Hildebrand y colaboradores en el 2001 demostraron que en suelos pobres en microbiota se favorece la sobrevivencia de *E. amylovora*, atribuyendo este comportamiento a la eliminación del estrés biótico que pudieran limitar su supervivencia e incremento poblacional (Hildebrand *et al.*, 2001). La susceptibilidad y el tamaño de las raíces de los porta-injertos de manzano es otro factor que también pudiera estar involucrado en la patogénesis de *E. amylovora*-manzano (Cambra *et al.*, 1978; Hassani *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2000) Con base en las consideraciones anteriores, en este estudio se determinó la sobrevivencia de *E. amylovora* en dos tipos de suelo con la presencia y ausencia de microbiota nativa y se evaluó su capacidad para infectar los porta-injertos de manzano a través del sistema radicular.

2. ANTECEDENTES

2.1. Manzano

El manzano pertenece a la familia de las rosáceas que la conforman tres mil especies pertenecientes a más de cien géneros (Velasco *et al.*, 2010) siendo *Malus* el principal género y se caracteriza por ser genéticamente diverso, su delimitación es complicada debido a la apomixis, poliploidía e hibridación que tienen las especies que conforman este género, los cultivares de *Malus x domestica* Borkh son los más importantes en el comercio (Korban *et al.*, 1984). El manzano se considera el cultivo de clima templado con mayor importancia a nivel mundial (Janick *et al.*, 1996).

2.2. Tizón de Fuego

2.2.1. Definición de la Enfermedad y Antecedentes

El tizón de fuego es la enfermedad bacteriana más devastadora de las rosáceas afectando principalmente a manzanos, perales y árboles frutales y/o ornamentales de importancia económica mundial (Van der Zwet *et al.*, 2012). El tizón de fuego es una enfermedad difícil de controlar y se comporta diferente a otras patologías vegetales, teniendo la capacidad de diezmar huertos en tan solo una temporada, además de permanecer de forma latente en el árbol acortando su vida productiva y reducir los rendimientos (Vanneste, 2000b). En las últimas cuatro décadas, Europa ha sido víctima de la rápida propagación de esta enfermedad. El reporte más antiguo de la enfermedad es una carta escrita en 1780 por William Denning donde describe síntomas de la enfermedad en plantaciones de manzana, pera y membrillo en el valle del Hudson en Nueva York EUA. En 1817 cuando el autor del libro *Cultivation of Fruit Trees*, William Coxe, describió la patología completa y fue él quien le otorgó el nombre de tizón de fuego debido al daño en los tejidos “hojas y ramas

de color marrón como si hubieran sido dañados por una flama” (Vanneste *et al.*, 2000). En 1978 Thomas Jonathan Burrill, profesor de la Universidad de Illinois, propuso la teoría de que esta enfermedad se encontraba relacionada estrechamente con la bacteria *Micrococcus amylovorus* que dañaba los tejidos (Burrill *et al.*, 1878; Horst, 2013). En 1905, Erwin F. Smith, fitopatólogo de los EUA comprobó que las bacterias eran causantes de algunas enfermedades en las plantas escribiendo un libro sobre esto llamado *Bacteria in Relation to Plant Diseases*. Desde entonces *E. amylovora* fue identificada como la primer bacteria fitopatógena y que además se diseminaba por insectos polinizadores (Smith, 1905).

El tizón de fuego es la primera enfermedad en plantas referenciada desde 1780 causada por una bacteria, por lo que, ocupa un lugar importante en la fitopatología (Rossini y Giayetto, 2015). Esta enfermedad se ha identificado en más de 200 especies vegetales, pertenecientes a 40 géneros de rosáceas, aunque en varias de estas especies no se han evidenciado infecciones naturales, si no que se refiere a inoculaciones artificiales experimentales. Doce géneros son los considerados hospederos potenciales por su interés comercial, de los cuales 5 son frutales: *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Malus*, *Mespilu*, y *Pyrus*; son plantas ornamentales y silvestres como: *Amelanchier*, *Chaenomeles*, *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Photinia davidiana (Stranvaesia)*, *Pyracantha* y *Sorbus* (Van der Zwet y Keil, 1979).

2.2.2. Agente Causal

Erwinia amylovora es la bacteria causante del tizón de fuego, la cual, ha sido llamada por productores e investigadores como la enfermedad única, debido a las pérdidas económicas ocasionadas, los daños que causa su rápida invasión en la planta, y su facilidad para propagarse y sobrevivir en entornos hostiles. A pesar de ser una de las enfermedades más conocidas y estudiadas no se a logrado su manejo eficaz (Vanneste, 2000a). *E. amylovora* es un bacilo necrogénico (Aldwinckle *et al.*, 1979; Burrill *et al.*, 1878; Khan *et al.*, 2012) de $0.5 - 1.0 \times 1.0 - 3.0 \mu\text{m}$ en tamaño, Gram negativo y es móvil debido a que posee de dos a siete flagelos peritricos (Raymundo y Ries, 1980) la temperatura óptima para su desarrollo es de $25 - 27.5^{\circ}\text{C}$ (Billing *et al.*, 1961). Las bacterias crecidas en agar nutritivo solidificado con 5% de sacarosa presentarán formas abombadas,

mucoides, brillante con un color blanco y presencia de estriaciones radiales semejantes a cráteres, estas características se presentan entre las 48 y 72 h de incubación a 28°C. Aunque hay aislados atípicos con colonias que no presentan abombamiento (Hauben *et al.*, 2005). Esta bacteria produce exopolisacáridos (EPS); amilovorano, levano y un glucano que se han sugerido como los principales responsables de su virulencia (Ra y Billing Bennett, Eve, 1978) además los EPS forman una capa protectora que protege a la bacteria contra el sistema de defensa del árbol y de otros factores limitantes como la deshidratación o la afectación de algunos agroquímicos (Leigh *et al.*, 1992).

2.2.3. Epidemiología

El tizón de fuego se distingue de otras enfermedades por sus síntomas característicos, es una patología que se desarrolla y extiende rápidamente, bajo las condiciones adecuadas. Las flores son conocidas como el sitio inicial de la infección hasta la raíz, pudiendo ocurrir en una sola temporada; además puede permanecer latente en cánceres y otros tejidos del árbol y desde ahí causar enfermedad y posteriormente diseminarse, si las condiciones son las óptimas (Vanneste, 2000b). Se han reportado al menos 129 especies de plantas como hospederas de *E. amylovora*, todas ellas de la familia Rosaceae (Farkas *et al.*, 2012).

2.2.4. Factores Condicionantes

Todas las enfermedades de las plantas y en especial el tizón de fuego, dependen de varios factores para su desarrollo y propagación, algunos de ellos son la planta hospedera, la cantidad de inóculo, la virulencia de la cepa bacteriana, condiciones ambientales (humedad, temperatura, lluvias) y el estado en el que se encuentre la planta, pudiendo ser más susceptible en un estado de estrés (Vanneste, 2000a).

2.2.5. Sintomatología de la Enfermedad

La fuente primaria del inóculo que origina el tizón de fuego aun no es del todo claro, investigaciones anteriores afirman que la fuente de la enfermedad son los cánceres en ramas y troncos producidos en años anteriores, donde la permanecer latente y sobrevive por largos periodos (hasta 30 días en el invierno) al estar protegida por los EPSs matriz altamente higroscópica que la protege (Schroth *et al.*, 1974; Thomson, 2000). Esta es la explicación que se ha utilizado durante varios años, pero no es la única, también se ha demostrado que en los brotes infectados que permanecen adheridos al árbol pueden ser fuente primaria del inóculo, aun si provienen de hospederos ornamentales o arvenses (Miller *et al.*, 1972; Weißhaupt *et al.*, 2016). Se ha demostrado que *E. amylovora* además de sobrevivir de forma epífita o como biotrófico, es un patógeno necrotrófico, favoreciendo su sobrevivencia en material vegetal muerto e incluso causar infección desde ahí (Sobiczewski, 2013). De igual manera se demostró que los frutos muertos que permanecen adheridos al árbol son fuente importante de inóculo primario ya que almacenan una carga importante de bacterias infectivas (Weißhaupt *et al.*, 2016).

Todas las especies de plantas afectadas por el tizón de fuego presentan los mismos síntomas, observándose con facilidad en la parte aérea de las plantas. No en todos los casos se observan todos los síntomas de la enfermedad, ya que su desarrollo depende de factores como la humedad y en algunos casos estos síntomas tienden a ser confundidos con los síntomas provocados por otras enfermedades vegetales fisiogénicas o causadas por otros microorganismos (Van der Zwet *et al.*, 2012). Los síntomas más comunes en los distintos órganos de las plantas son los siguientes:

Flores: *E. amylovora* Penetra a las flores por medio de aberturas naturales, estableciéndose en los estigmas, anteras y nectarios, siendo los estigmas el principal sitio de multiplicación (Wilson *et al.*, 1989a). Al inicio de la infección, *E. amylovora* provoca en las flores un aspecto húmedo, luego se marchitan y se tornan de un color marrón u oscuro y finalmente mueren. En algunos casos pueden observarse una o varias flores del corimbo solo afectadas, pero, la mayoría de las flores mueren: algunas de estas flores permanecen en el árbol después de su muerte, y la bacteria las aprovecha para multiplicarse y avanzar por el pedicelo floral necrosándole y secándolo hasta infectar los brotes y ramas.

Brotes: Son afectados por *E. amylovora* al comienzo de la primavera y al final del verano cuando hay nuevos brotes. El oscurecimiento y pérdida de rigidez son los síntomas más visibles en los

brotos, pudiendo causar que las ramas se doblen, con una forma comúnmente conocida como “cayado de pastor”. A medida que avanza la infección, las zonas dañadas se observan húmedas con estrías rojizas. Existiendo las condiciones adecuadas para la enfermedad en los brotes pueden extenderse hasta 30 cm, en el corto plazo. Además, la infección puede avanzar hasta la base de la rama y bloquea su nutrición, que en consecuencia causa el marchitamiento de las hojas.

Hojas: la infección puede originarse desde el brote infectado o por el contacto directo con la bacteria. El principal síntoma característico es el marchitamiento, en algunos casos manchas necróticas alrededor de la misma. También es posible observar en las hojas infectadas el oscurecimiento en la zona del pedúnculo y humedad abundante. Cuando un brote es infectado, avanza tanto que alcanza la base de la rama bloqueando su nutrición y causando el marchitamiento de las hojas. Las hojas infectadas permanecen adheridas al árbol.

Frutos: Se ha documentado la infección tanto de frutos que empiezan a formarse como de maduros. La bacteria entra fácilmente a los frutos a través de lesiones producidas mecánicas por condiciones ambientales (p.ej., granizo) o acciones culturales (p.ej., podas). El primer síntoma y el más visible es el aspecto húmedo, seguido de la necrosis del tejido y el subsecuente oscurecimiento, los frutos muestran un aspecto momificado y en su interior se observan zonas con aspecto líquido gelatinoso y húmedo. La mayoría de los frutos permanece en el árbol.

Ramas y troncos: al finalizar el ciclo de la infección bacteriana, esta se concentra en cánceres en ramas primarias y troncos, donde permanece latente hasta que las condiciones se lo permitan y activarse nuevamente, lo cual generalmente ocurre al finalizar la primavera, verano u otoño. El tamaño de los cánceres varía desde 3 mm hasta 20 cm. No siempre es posible observar cánceres visibles superficialmente, en algunos casos solo evidencia una decoloración en la zona afectada. Sin embargo, al momento de retirar la corteza del árbol en la zona afectada se observan cánceres con estrías de color oscuro rojizo y apariencia húmeda.

2.2.6. Factores que Contribuyen en la Infección y la Diseminación de la Bacteria

Una célula de *E. amylovora* es suficiente para causar infección (Cabrefiga y Montesinos, 2005) Cuando las condiciones ambientales son adecuadas puede incrementar rápidamente sus poblaciones (Pusey, 2000). El grado de virulencia de la bacteria (Cabrefiga y Montesinos, 2005) y

la susceptibilidad del hospedero (Van der Zwet y Keil, 1979) son factores importantes que participan en el desarrollo de la infección y diseminación de la bacteria.

Temperatura: es el factor de mayor importancia para el desarrollo del tizón de fuego en los estigmas de las flores. Puede desarrollarse adecuadamente en un rango de 4 a 24 °C, aunque se ve favorecida por temperaturas medias de 25 a 27.5°C (Pusey y Curry, 2004). Las cargas bacterianas en los estigmas de las flores (órganos receptivos) permanecen ahí menor tiempo debido a las altas temperaturas y a la polinización (Gouk *et al.*, 1998; Pusey, 2001; Pusey *et al.*, 2008; Spinelli *et al.*, 2005).

Estigma. Las rosáceas se identifican por la presencia de estigmas húmedos por sus papilas estigmáticas (Heslop-Harrison *et al.*, 1977). La parte sólida de los estigmas se compone principalmente de polisacáridos (49.6%) y proteínas (45.9%), ambas son ricas fuentes de carbono y nitrógeno para los microorganismos que ahí se desarrollan, entre ellos *E. amylovora* (Pusey *et al.*, 2008; Thomson, 1986).

Nectario. La copa floral del manzano es más larga y estrecha que en otros frutales, tienen los nectarios al fondo, esto evita que el néctar no se evapore fácilmente (Farkas *et al.*, 2000). Las papilas secretoras del néctar se componen de dos células grandes que presentan una abertura central simulando un estoma. Se ha sugerido que la susceptibilidad al tizón de fuego depende del lugar donde se encuentran las papilas secretoras. Por ejemplo, el cultivar Mitsu (Crispin) tiene canales profundos sobre el nectario donde se acumula el néctar y ahí permanece, esto favorece el desarrollo de *E. amylovora* al aportarle los nutrientes necesarios (Beckerman, 2006; Bubán, 2003; Nagy *et al.*, 1999; Orosz-Kovács, 1989; Rosen *et al.*, 1936).

Néctar. La cantidad de néctar contenido en las flores del manzano, depende de la etapa de floración. Las flores jóvenes contienen de 1.5 a 4.5 µL/flor, pero cuando la flor está soltando el néctar puede contener entre 2 y 6 µL/flor; mientras que, las flores maduras contienen de 2.5 a 8 µL de néctar. La secreción del néctar ocurre óptimamente entre 14 a 18°C, pudiendo aumentar con una humedad del aire superior al 60% (Bubán, 2003; Farkas *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 1999). La cantidad de néctar difiere de una variedad a otra, se ha sugerido que entre más néctar produzca una variedad más susceptible será la enfermedad, por lo tanto, entre menos néctar produzca una variedad, más resistente será al tizón de fuego (Nagy *et al.*, 1999). Cultivares como Golden Delicious y Royal Gala tienen un contenido de azúcares (≈60%) en el néctar, mayormente sacarosa y hexosas (fructosa y glucosa) (Campbell y Marini, 1990).

2.2.7. Vías de Trasmisión de la Enfermedad

Las lluvias, insectos, vientos y riegos, son algunos de los factores que dispersan el tizón de fuego, pero la vía de transmisión más importante es la lluvia, al arrastrar a la bacteria o salpicar a otras zonas del árbol desde la fuente de inóculo (tejido o suelo), esta diseminación también se induce por algunos sistemas de riego (p.ej., por aspersion) (Miller, 1929). Los insectos como hormigas y moscas también son responsables de la dispersión primaria del inóculo bacteriano debido a que visitan los cánceres y tejidos dañados, las abejas también participan en esta dispersión pero a diferencia de los demás insectos estas diseminan a la bacteria de flor en flor (Thomas y Alexander, 1934).

2.2.8. Manejo del Tizón de Fuego

Para el manejo de esta enfermedad deben considerarse varios aspectos y generar un gran esfuerzo (Schroth *et al.*, 1974; Paul W Steiner, 2000; T Van der Zwet, 1995). Primero se deben observar las plantas del huerto detalladamente, para lograr detectar aquellos árboles que estén infectados, posteriormente se lleva una muestra a un laboratorio para asegurar la presencia de *E. amylovora*, se sugieren eliminar arboles dañados mediante la poda y la quema. Debe evitarse fertilización excesiva con fuentes de nitrógeno, para evitar el desarrollo de tejido sensible en la planta. Los riegos deben ser los óptimos, evitando el exceso de agua en el huerto, especialmente en la etapa de floración, ya que la humedad alta favorece la rápida multiplicación de la bacteria y la potencial infección en árboles. Se sugiere la plantación de variedades resistentes a la enfermedad y como medidas de control curativas se recomienda la aplicación de antibióticos.

2.3 *Erwinia amylovora*

2.3.1 Descripción de la Bacteria

Erwinia amylovora es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo necrogénico (Aldwinckle *et al.*, 1979; Burrill *et al.*, 1878; Khan *et al.*, 2012). recto, de $0.5-1.0 \times 1.0-3.0 \mu\text{m}$ en tamaño, crece óptimamente en temperaturas cálidas de 25 a 28°C (Billing *et al.*, 1961) y cuenta con flagelos peritricos (2 a 7) que le dan motilidad (Raymundo y Ries, 1980). Esta bacteria se distingue de otras por la producción de tres exopolisacáridos (EPS) de bajo peso molecular; principalmente amilovorano, levano y un glucano que se ha sugerido son los responsables de la virulencia de la bacteria (Ra y Billing Bennett, Eve, 1978). Los EPS forman una capsula que protege a la bacteria de las condiciones no favorables (p.ej., deshidratación, las reacciones de defensa del árbol o de algunos agroquímicos), permitiendo su supervivencia (Leigh *et al.*, 1992). Las colonias crecidas por 48 y 72 h en agar nutritivo adicionada con 5% de sacarosa a 27°C son blancas, brillantes, abombadas, mucoides con estriaciones parecidas a cráteres; sin embargo, es posible encontrar cepas atípicas que no presentan colonias abombadas (Hauben *et al.*, 2005).

2.3.2 Antecedentes

Erwinia amylovora es un fitopatógeno no obligado y se relaciona con algunas especies bacterianas de interés agrícola y clínica (Buzón, 2021). Esta bacteria es la causante del tizón de fuego, una de las enfermedades más devastadoras en miembros de la familia de las rosáceas especialmente en árboles frutales como manzanos y perales, y plantas silvestres y ornamentales de la familia Spiraeoideae (Van der Zwet *et al.*, 2012). Algunos factores que afectan o favorecen el desarrollo de la enfermedad “tizón de fuego” son la temperatura, la humedad ambiental, presencia de vectores, virulencia de la cepa bacteriana, el estado de desarrollo fenológico del huésped y su susceptibilidad al patógeno, así como la sobrevivencia de la bacteria (Santander *et al.*, 2017; Thomson, 2000; Van

der Zwet *et al.*, 2012).

El género *Erwinia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Algunas especies de *Erwinia*, han sido reclasificadas o transferidas a otros géneros. La mayoría de los miembros de este género se conocen por la enfermedad que causan en las plantas. *Erwinia amylovora* fue la primera bacteria que se demostró como la causante de una enfermedad en plantas. *Erwinia amylovora* se ha extendido por todo el mundo y ha sido catalogada como una de las 10 bacterias fitopatógenas más importantes, además de ser considerada de cuarentena en la Unión Europea, sujeta a la legislación fitosanitaria. *Erwinia amylovora* entra a la planta a través de aberturas naturales y se desplaza sistémicamente en las plantas e induce infecciones rápidamente. En los huéspedes susceptibles, la bacteria puede penetrar a través de los espacios intercelulares del parénquima y después en los vasos xilemáticos, induciendo lesiones severas conocidas cánceres. Los tejidos infectados por la bacteria se tornan de un color marrón o negras con apariencia a una quemadura con fuego. Los cánceres se han considerado como sitios de hibernación de la bacterias y potenciales fuentes de inóculo infectivo (Crepel y Maes, 2000). Los cánceres activos servirán como una fuente de inóculo para la infección de las flores, mismas que servirán como fuente secundaria de inóculo para la infección en otras flores (Thomson, 2000). El control de esta enfermedad, es limitado, entre los más efectivos es la aplicación de antibióticos (estreptomomicina u oxitetraciclina) durante la época de floración. Sin embargo, debido al desarrollo de resistencia de la bacteria, se limita el uso de estos antibióticos a largo plazo. Alternativas prometedoras para reducir el uso de antibióticos o incluso sustituirlos para evitar la resistencia de los patógenos es el uso de medidas de control biológico.

2.3.3 Factores de Virulencia

E. amylovora es un patógeno presenta motilidad sistémica en las plantas hospedantes y se disemina rápidamente en el huerto, afectando especialmente a miembros de la familia Rosaceae (p.ej., manzanos y perales). La capacidad de movimiento de la bacteria en el sistema vascular de las plantas y la rápida capacidad de infectar diferentes tejidos del árbol resultan en un difícil manejo de la enfermedad. Se ha demostrado que los EPS que produce la bacteria son los responsables de protegerla de la deshidratación y falta de nutrientes durante las sequias y de no permitir que el

sistema de defensa del árbol pueda actuar sobre la bacteria (Piqué *et al.*, 2015). Investigaciones demuestran que los exopolisacáridos son importantes en la formación de biopelículas en *E. amylovora*, facilitando la adhesión de las bacterias a varias superficies. Se ha demostrado que el amilovorano es el principal exopolisacárido para la formación de biopelículas ayudado por el levano al polimerizar el azúcar extracelularmente (Gross *et al.*, 1992). Adicionalmente, la virulencia de la cepa bacteriana se ha relacionado estrechamente con la cantidad de amilovorano que producen. El amilovorano es un heteropolímero complejo con alto peso molecular (106Da), contiene 1000 unidades de sacarosa por molécula aproximadamente, el cual lo constituye un residuo de ácido glucurónico y cuatro de galactosa contando con las mismas unidades de piruvato y grupos acetato (Ordax, 2008). Por lo tanto, se ha aseverado que cepas de *E. amylovora* incapaces de producir amilovorano no son patógenas, por no poder esparcirse por el sistema vascular de la planta. El levano también se considera como factor de virulencia, se ha evidenciado que una síntesis escasa de levano provoca un retraso en los síntomas en la planta después de la infección (Piqué *et al.*, 2015).

2.3.4 Motilidad de *E. amylovora*

E. amylovora es un patógeno capaz de sobrevivir fuera del huésped en condiciones de inanición, bajo estas condiciones resulta muy importante la motilidad de esta bacteria para su supervivencia, aunque es diseminada fácilmente por las gotas de lluvia, esta bacteria cuenta con flagelos peritricos que le permiten moverse, además jugar un rol importante en la formación de biopelículas y su virulencia (Piqué *et al.*, 2015).

2.3.5 Sobrevivencia de *E. amylovora* en Distintos Medios

Información reciente demuestra que la bacteria se induce a un estado celular comúnmente llamado viable no cultivable, esta respuesta es genética y le ayuda a sobrevivir por tiempos largos bajo condiciones de estrés (inanición u oligotróficas), en distintos medios como el suelo y agua (natural

o de riego), por lo tanto, se sospecha que estos medios pueden servir como reservorios de la bacteria y vías de diseminación (Biosca *et al.*, 2007).

2.3.6 Diseminación de la Bacteria

La dispersión de *E. amylovora* se debe a que existen fuentes primarias y secundarias del inóculo, lo cual permite la sobrevivencia y multiplicación de la bacteria. A pesar de la gran cantidad de investigación sobre esta enfermedad, pocos sitios y fuentes del inóculo han sido sugeridos. Los cánceres en los árboles infectados son considerados como sitios principales de hibernación y fuente de inóculo primario para que ocurra la infección en flores durante la primavera (JP Paulin, 1980; Rosen y Harry Robert, 1929). Las bacterias pueden ser dispersadas por el viento, el suelo, la lluvia y por algunos insectos. De igual manera la bacteria se disemina de árbol a otro en el huerto, por medio de la lluvia, riegos (p.ej. aspersión) el viento, por acciones agronómicas (p.ej., podas) y por animales. *Erwinia amylovora* se ha encontrado en residuos vegetales que se quedan en los campos después de la cosecha (p.ej., ramas y frutos), ya que estas bacterias se comportan como saprófitas (Icochea, 1997). Son aproximadamente 200 especies de plantas que pertenecen a la familia de las rosáceas que son consideradas hospedantes de *E. amylovora*, incluyendo plantas ornamentales tales como el espino (*Crataegus* sp.), serbal (*Sorbus* sp.), cotoneaster (*Cotoneaster* sp.), espina de fuego (*Pyracantha* sp.) y membrillo (*Cydonia oblonga*) (Momol *et al.*, 2000) estas plantas contribuyen a su diseminación, y son fuente de inóculo primario para que pueda ocurrir la infección en otras plantas hospederas, incluidas las comerciales.

2.4 Suelos

2.4.1 Tipos de Suelos y Antecedentes

El reconocimiento de diferentes tipos de suelos y la utilización de nombres distintivos permitieron

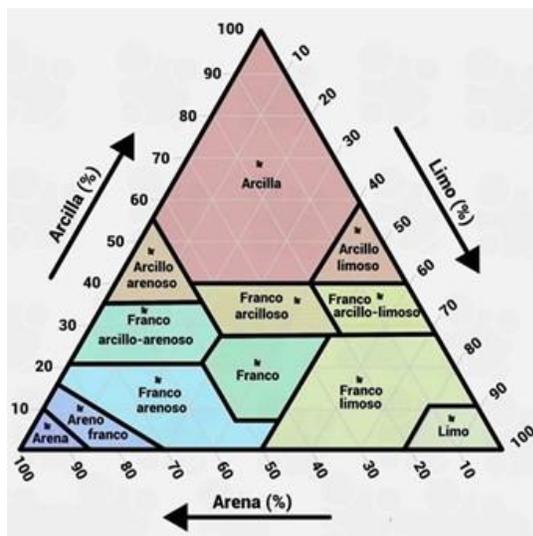
clasificar a los suelos para aplicaciones prácticas, según los primeros registros chinos, hace aproximadamente 4,000 años la clasificación de los suelos fue en base de su color y estructura (Baldwin *et al.*, 1938). El suelo se describe como la combinación de fuerzas y factores que en conjunto producen el medio donde se reproduce la planta, debido a las características que presentan los diferentes tipos de suelos surgió la necesidad de agruparlos en categorías (Baldwin *et al.*, 1938). Algunas observaciones locales sirvieron para el reconocimiento de las diferencias de los suelos, destacando características como el color y la textura, que posteriormente fueron validas, al demostrar que eran características que permitían diferenciar los suelos (Baldwin *et al.*, 1938). En la década de 1870, en Rusia, se fundó una escuela de suelos bajo el cargo de Dokuchaiev, los científicos que formaban parte de esta institución determinaron la diferencia de cada uno de los suelos en base a sus características como morfología, forma y estructura que se relacionan estrechamente con una mezcla de vegetación, clima, edad, relieve y material parental, decidieron resaltar que el suelo no es una formación que se lleva a cabo geológicamente si no que es un cuerpo totalmente natural e independiente (Baldwin *et al.*, 1938). Se propusieron tres grupos principales, (i) suelo zonal que incluye a los suelos con características bien desarrolladas, que reflejan factores de suelo-clima, (ii) suelo intrazonal, los suelos de este grupo tienen características más o menos desarrolladas y por último, (iii) suelo azonal, donde se agruparon los suelos que no presentan desarrollo en sus características (Baldwin *et al.*, 1938). Los investigadores rusos se enfocaron más en características generales de los suelos y en menor medida en los factores ambientales que influyeron en estas características. El departamento de agricultura de Estados Unidos de América se recolectó suelos con la finalidad de definir tipos importantes de suelo en el país y se han basado en características como la morfología y en menor medida en características externas y ambientales (Baldwin *et al.*, 1938). Desde el comienzo de la clasificación de los suelos se han tenido en cuenta las características de los cultivos, y la clasificación se ha basado principalmente en las condiciones del suelo y las propiedades físicas y químicas de este. Algunas características que se mapean en los suelos (p. ej., muy calcáreos o con mucho color), son la densidad macro aparente, textura en base al tacto y la apariencia, la profundidad, la permeabilidad y la vegetación natural. Se implementó un sistema donde se establece “cada área bien delimitada es establecida como una clase y se le daba un nombre local” donde la clase hacía referencia a la textura y el área a su localización (Baldwin *et al.*, 1938).

La textura de los suelos se define con base en la proporción de ciertos elementos, por ejemplo: arcilla, limo, arena fina, gruesa y mediana. Un buen suelo hace referencia a que este está constituido

por varios elementos con buena textura que permite el desarrollo del sistema radicular de plantas y una buena nutrición. El humus presente en el suelo está relacionado con la vegetación y el clima de la región, de esta manera el suelo se enriquece y se estabiliza, aunque también puede ser descalcificado y lixiviado. Cuando esto ocurre el contenido de arcilla en la superficie tiende a bajar y se aumenta en la profundidad del suelo, por lo tanto, el humus presente en un suelo puede cambiarse, modificando la textura inicial del suelo.

La clasificación por tamaño. Se basa en el tamaño de las partículas del suelo, en una fracción de peso es el porcentaje de materia mineral. Las propiedades de las partículas finas y gruesas son distintas. La clasificación por tamaño de los suelos se divide en al menos tres clases: arena, limo y arcilla. Para medir la granulometría del suelo se usa el proceso granulométrico o mecánico. Uno de los métodos empleados para el análisis de tamaño en suelos el de tamices para la separación de partículas gruesas.

Clases texturales. Son varios los métodos empleados para conocer la clase textural de un suelo, el más utilizado es el de diagramas de triángulo ya sea triángulo de referencia, rectángulo o equilátero. Cada lado representa el eje graduado de 10 en 10 desde 0 a 100, cada uno de los lados del triángulo representa a la arcilla, el limo y la arena (Figura 1).



	<u>Términos generales</u>	<u>Clases texturales</u>
SUELOS ARENOSOS	Suelos de textura gruesa	Arenosos
	Suelos de textura moderadamente gruesa	Arenosos-francos
		Franco-arenosos Franco-arenosos finos Franco arenosos muy finos
SUELOS FRANCOS	Suelos de textura media	Franco Franco-limoso Limoso
	Suelos de textura moderadamente fina	Franco arcilloso Franco arcillo arenoso Franco arcillo limoso
	SUELOS ARCILLOSOS	Suelos de textura fina

Figura 1. Diagrama de triángulo para la identificación de clases texturales del suelo.

Son varios triángulos utilizados para la clasificación de las clases texturales dependiendo del país

o la región, el triángulo permite contar con un primer resultado de una interpretación de suelo, además también permite interpretar resultados de análisis granulométricos.

El color del suelo. Es una característica particular, fácil de observar y facilita la identificación de un suelo. Se relaciona con uno de los procesos de edafogénesis o factor de formación. El proceso de coloración del suelo, no siempre es igual y puede cambiar por distintas causas. El humus, sulfatos, sulfuros, carbonatos compuestos minerales, entre otros, son los que les otorgan el color a los suelos. El color blanco en suelos de regiones secas, áridas o desérticas, les es otorgado por minerales blancos o sin color, algunos de estos compuestos son el yeso, los cloruros, la sílice, con alta pureza o la arcilla altamente pura. Compuestos como el magnesio, sulfuros de hierro o el humus le otorgan colores más pardos (negros u oscuros) a los suelos; un suelo con tonalidad gris y que pasa al verde, casi siempre se debe a la presencia de hierro solo o en combinación con otros elementos dándole el color característico al suelo. El color del suelo se debe a factores y procesos que en este ocurren y, tiene gran relación con la textura, atribuido a la presencia de elementos en el suelo que reaccionan con menor o mayor intensidad. Por ejemplo, los suelos arenosos reaccionan con mayor intensidad que los suelos arcillosos. Algunos elementos cromógenos de la roca madre y litocromos, otorgan también color a los suelos, que generalmente suelen ser suelos pobres en humus (Rucks *et al.*, 2004).

2.4.2 Características Físicoquímicas

La materia orgánica (MO) presente en el suelo es importante para mantener la fertilidad de los suelos, la transferencia y retención de nutrientes en plantas (Pascual y Venegas, 2010). La MO indica la calidad de los suelos en sus funciones ambiental o agrícola, y determina su potencial para la producción de alimentos siendo esto, también un indicador de la actividad biológica y disponibilidad de nutrientes en los suelos (Cantú *et al.*, 2018). La MO modifica algunas propiedades del suelo tales como la retención de agua, infiltración del aire y del agua (Hillel *et al.*, 2005), modificando también la porosidad y el agua (Darwish *et al.*, 1995). La capacidad de producción de un suelo también dependerá de propiedades tales como la textura y estructura, algunas propiedades como el contenido de MO y el pH pueden ser modificadas mediante

estrategias de manejo del suelo (Mishra y Sharma, 2010). Los factores ambientales con mayor influencia en el desarrollo bacteriano son el pH, humedad y conductividad eléctrica; se ha sugerido que los suelos alcalinos con humedad alta y un contenido alto de sales favorecen el crecimiento de bacterias, incluyendo bacterias fitopatógenas, por lo anterior se asume que en suelos con bajo contenido de sales, los daños por bacterias fitopatógenas serán mínimos (Icochea, 1997).

Humedad del suelo. Hace referencia a la cantidad de agua presente en el suelo. Se ha demostrado que el suelo se calienta 5 veces más rápido que el agua, pero si el suelo tiene humedad se calienta más lentamente. Todo cambio en el estado del agua (condensación, vaporización, solidificación y fusión) contenido en el suelo, implicará cambios en la temperatura del suelo. El suelo absorbe calor y lo aprovecha para evaporar el agua que contiene. En suelos que suelen calentarse fácilmente se le da mayor relevancia a la humedad que a la textura. Los suelos arenosos, tienen menor retención de agua. El drenaje permite que la humedad disminuya y el suelo se caliente fácilmente, especialmente en primavera, favorece la mayor vegetación de un suelo (Rucks *et al.*, 2004).

2.5 Microbiota del Suelo

Durante los últimos años, han aumentado significativamente las investigaciones en suelo. A pesar de ello, la ciencia de los suelos no está del todo abarcada, existiendo deficiencia entre los procesos físicos y químicos, al igual que los procesos microbiológicos. La microbiota presente en el suelo es un factor muy importante, ya que se encarga de la descomposición y mineralización de materia orgánica, solubilización de minerales, estabilización y formación de agregados del suelo, además de intervenir en procesos biogeoquímicos y de constituir un reservorio de elementos nutritivos del suelo. La microbiota presente en los suelos es considerada como el agente principal en la fertilidad y en la alimentación de la vegetación (Sivila y Dominique, 2001).

Son varias las especies de microorganismos presentes en los suelos dependiendo del tipo, la rizosfera es la zona donde converge el suelos y las raíces de las plantas, y es ahí donde se concentra la mayor actividad microbiana (Westover *et al.*, 1997). Los microorganismos, ya sean benéficos o patógenos presentes en la rizosfera influirán en gran medida sobre el crecimiento de las plantas. Bacterias, nematodos y microartrópodos son algunos grupos de microorganismos y agentes que se

encuentra en la rizosfera (Johansson *et al.*, 2004). Los microorganismos y las plantas generan relaciones simbióticas mutuas, donde las raíces de las plantas otorgan un nicho ecológico a través de la secreción de nutrimentos requeridos para el metabolismo microbiano, mientras que, los microorganismos benéficos favorecen el crecimiento de la raíz, regulan las propiedades físicas y químicas de los suelos, detoxifican algunos contaminantes y regulan la actividad microbiana en la raíz (González, 2005). La microbiota presente en el suelo es la responsable de la descomposición de la MO y en consecuencia, se produce dióxido de carbono (CO₂), que da lugar a la fotosíntesis al difundirse a través de los poros de las hojas de las plantas, además de ayudar a la regulación de la temperatura del planeta (Jaramillo, 2004). Se ha demostrado que las variaciones que se presentan en las concentraciones de CO₂ entre el aire y el suelo es debido a la actividad microbiológica del suelo (Rucks *et al.*, 2004).

2.5.1 Bacterias Fitopatógenas

Fueron varios años los que un grupo de biólogos estudiaron a las bacterias fitopatógenas, pero fue en 1970 donde este tema comenzó a ser de gran interés debido al crecimiento en técnicas inmunológicas, biología molecular y a la simplicidad de manipulación genética que tenían estas bacterias (Garcés de Granada *et al.*, 1996). Las bacterias son organismos unicelulares, su multiplicación es por fisión binaria o bipartición, son de varias formas y algunas tienen la capacidad de parasitar a organismos vivos y causar enfermedades (Icochea, 1997). En el caso de las bacterias fitopatógenas su forma es de bastón, algunas presentan uno o más flagelos, no forman esporas y la mayoría de ellas son Gram negativas. Las bacterias fitopatógenas tienen la capacidad de dañar la parte foliar de la planta pero también las raíces, debido a que se introducen al tejido de las plantas a través de heridas ya sean naturales o mecánicas por insectos y nematodos o por aberturas naturales propias de la planta como los estomas, hidátodos entre otros, siempre y cuando exista humedad en la superficie de estas (Icochea, 1997). Cuando la bacteria logra introducirse a la planta puede causar lesiones en esa área o puede introducirse a través del sistema vascular (Icochea, 1997). Lo que caracteriza principalmente a estas bacterias es su capacidad para acabar con grandes cantidades de sustrato en poco tiempo, esto debido a la gran velocidad de multiplicación, su gran actividad

enzimática tiene la capacidad de digerir el sustrato rápidamente, esto ocurre principalmente en órganos de la planta con mayor carnosidad como son los tubérculos, bulbos y raíces (Icochea, 1997). Algunos de los síntomas que se presentan en las plantas causados por estas bacterias son marchitamientos, manchas en tejidos vegetales y frutos, cánceres, entre otras (Garcés de Granada *et al.*, 1996).

2.5.1.1. *Erwinia amylovora*. Causa la enfermedad del tizón de fuego. Esta bacteria puede causar la enfermedad sin la necesidad de liberar exoenzimas. El sistema de secreción tipo III (SST3) que emplea *E. amylovora*, es importante para la virulencia, este le permite inyectar toxinas directamente en el citoplasma de la célula de la planta, además, el SST3 participa activando/e licitando una reacción de hipersensibilidad (HR) en plantas no huéspedes y un estallido oxidativo durante la interacción compatible entre el patógeno y la planta huésped. Las bacterias fitopatógenas generalmente utilizan el SST3 para evadir los sistemas de defensa de la planta que son el estallido oxidativo y la HR, estos sistemas de defensa le permiten a las plantas bloquear el ingreso de las bacterias patógenas a tejidos internos. *Erwinia amylovora* está asociada con elementos como sideróforos, lipopolisacáridos (LPS) y exopolisacáridos (EPSs) que la protegen frente al estrés oxidativo en los tejidos vegetales que ocurre a medida que avanza la infección. *Erwinia amylovora* se considera un patógeno que ingresa por la parte aérea de la planta, sin embargo, su presencia en el suelo al ser diseminado por factores como las lluvias, vientos, insectos, entre otros, sugiere la posibilidad de su ingreso desde la zona de raíces. La presencia de esta bacteria en el suelo, se ha planteado a partir de estudios donde se han aislado bacteriófagos activos frente a *E. amylovora* en suelos plantados con árboles enfermos por el tizón de fuego (Thomson, 2000; Van der Zwet *et al.*, 2012). La sobrevivencia de este patógeno en el suelo pudiera depender de varios factores, como el contenido de agua y la disponibilidad de nutrientes que favorezcan el desarrollo de *E. amylovora* y propicien la enfermedad. Se ha sugerido que, el mal drenaje de suelos, dosis altas de fertilizantes o abonos nitrogenados y desequilibrios en los nutrientes, facilitan el desarrollo de la enfermedad. Se demostró que la supervivencia de *E. amylovora* es reducida ante la presencia de microbiota autóctona en el medio (Hildebrand *et al.*, 2001). La manera en la que *E. amylovora* coloniza las raíces de las plantas es muy parecida a la manera en cómo las bacterias fitopatógenas del suelo lo hacen. Es por medio de heridas y/o grietas presentes en las raíces que el patógeno entra, las células

del patógeno se incrementan en el apoplasto del córtex de la raíz, donde se desplazaron al sistema vascular de la planta y llegaron a través del xilema a las partes aéreas de la planta, donde generaron los síntomas característicos del tizón de fuego. En un estudio analizaron 8 plántulas de pera (Passe Crassane) donde inocularon directamente a la raíz principal con la ayuda de una aguja una colonia de *E. amylovora* CFBP 1430 en agar LB. Además, utilizaron plántulas adicionales de pera como control negativo dándoles un trato igual que a las demás, solo inoculando agua estéril sin la bacteria. Se utilizó otro grupo de plántulas de pera para poder comparar los resultados, se inoculó directamente a la herida después de cortar la punta del tallo, una gota de 10µL que contenían 10³ UFC/mL (Santander *et al.*, 2020). Las plántulas de pera se mantuvieron en cámaras de crecimiento a 26°C con 12 h de luz. Para detectar desarrollo de la enfermedad en los tejidos, la cual se determinó mediante el aislamiento en medio NCT e identificación por PCR (Taylor *et al.*, 2001) de colonias. Las células del patógeno crearon biopelículas en las raíces gracias a la secreción de azúcares y aminoácidos secretados por la raíces, lo que les permitió invadir la corteza a través de las heridas producidas, los daños en la parte aérea de las plántulas de pera se observaron transcurrido un tiempo después de la penetración de la bacteria por el xilema (Santander *et al.*, 2020).

2.5.2 Nematodos y Hongos que Dañan las Raíces del Manzano

2.5.2.1 Nematodos. En un estudio realizado por Guzmán (2012), menciona que los nematodos se definen como animales sin segmentos en su cuerpo, casi transparentes con una cutícula incolora que tiene estrías, la forma de su cuerpo es redonda, sin extremidades y sin boca, algunos tienen un parecido muy similar a las lombrices. Cabe mencionar que los nematodos sobreviven en la mayoría de los hábitats, son acuáticos (Agrios, 2005). Son pequeños con tamaños de 300 a 1,000 µm en longitud y delgados (ancho de 15 a 35 µm), aunque son pequeños, pueden observarse fácilmente con ayuda de un estereoscopio. El movimiento de los nematodos es dado por sus músculos. Cuando se presentan las condiciones ambientales óptimas, especialmente temperaturas cálidas, su ciclo de vida se acorta, pudiendo completarse en 3 ó 4 semanas. Generalmente los juveniles (J1) de nematodos no se comportan como fitoparásitos, obtienen energía de los restos del huevo después de haber emergido para poder cumplir con sus funciones metabólicas, y una vez que pasan a las

etapas (J2 y J3) ya son capaces de parasitar a la planta e inician su búsqueda de hospederos susceptibles, para asegurar su sobrevivencia (Agrios, 2005). Algunos nematodos inducen hipertrófia e hiperplasia comúnmente conocidas como agallas en las plantas hospederas, estas limitan e impiden la translocación de agua y nutrientes del suelo hacia la planta, en consecuencia, las plantas muestran deficiencias nutricionales e hídricas que se evidencian por síntomas como color amarillento, marchitez y tamaño pequeño (Revelo *et al.*, 2008).

Se ha sugerido que además de los daños fisiológicos causados por los nematodos en las plantas, también facilitan la entrada de diversos microorganismos patógenos a través de las lesiones que causan en los tejidos con sus estiletes (Talavera y Mizukubo, 2003; Temporal, 2002). Las mayores poblaciones de nematodos se encuentra generalmente en la capa superficial del suelo (0-15 cm de profundidad) (Talavera y Mizukubo, 2003).

Razón por la cual, los mayores daños lo causan en las raíces (Temporal, 2002).

2.5.2.2 Hongos y oomicetos.

2.5.2.2.1 *Phymatotrichopsis omnivora*. Es un hongo patógeno presente en el suelo que causa varios problemas en la raíz como pudrición, este daño lo causa en diferentes especies de manzano (Stuart, 1978). Las principales especies muy susceptibles a este hongo causante de la pudrición texana son *Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf. (=M. *domestica* Borkh.) (Taubenhaus *et al.*, 1929). *P. omnivora* afectó a huertas ubicadas en Texas causando pérdidas económicas importantes (Kenerley *et al.*, 1994). La diseminación del patógeno en los huertos se inició en pequeños puntos para después esparcirse dentro y entre las hileras, ocasionando la muerte en varios grupos de árboles hasta en un 15% al año (Kenerley *et al.*, 1994).

2.5.2.2.2 *Fusarium* sp. (Marchitez vascular). *Fusarium oxysporum* es un hongo saprófito del suelo (De Granada *et al.*, 2001). Algunas cepas causan la enfermedad conocida como marchitez vascular en cultivos de interés agrícola, afectando el rendimiento y calidad de la parte comercial (De Granada *et al.*, 2001). Este hongo sobrevive tanto en climas trópicos secos como climas templados

(Cai *et al.*, 2003). Se han encontrado tres cepas distintas del hongo, reportándose como raza 1, raza 2 y raza 3 las cuales se diferencian de acuerdo a su virulencia (Cai *et al.*, 2003).

Las lluvias frecuentes, permiten que el agua se acumule en el suelo y esto favorece al patógeno potenciando el desarrollo de marchitez en el follaje de las plantas y pudrición de raíces (Icochea, 1997). Las raíces infectadas muestran necrosis de color café, en los tejidos internos; las raíces se muestran más pequeñas y puede avanzar hasta matar a la planta. Una vez iniciada la infección se disemina rápidamente y es difícil detener su avance. Esta enfermedad afecta principalmente las zonas bajas de la planta, aunque también depende de la susceptibilidad clonal (Icochea, 1997).

El combate de esta enfermedad, se basa principalmente en la aplicación de fungicidas químicos en cada ciclo productivo. Sin embargo, el uso de estos productos aumenta los gastos de producción, además de contaminar el ambiente y generar cepas resistentes de este patógeno (Ascencio *et al.*, 2008). El uso de cultivares resistentes se ha sugerido como la opción más sencilla, económica y eficaz para evitar esta y otras enfermedades (Ascencio *et al.*, 2008).

2.5.2.2.3 Armillariella mellea. Este hongo habita en el suelo, entra a la planta por medio de las raíces, especialmente aquellas que presentan daños (p.ej., mecánicos), colonizan rápidamente y ocasionan agallas y necrosis, los síntomas inducidos en las plantas al ser infectadas por este hongo son, disminución de las funciones fisiológicas del sistema radicular, hojas pequeñas y delgadas, brotes débiles con poca estructura, frutos sin desarrollarse, repentino secado de ramas, cambio de color en el tronco, escasa brotación, ya que induce dormancia indefinida del árbol, y olor a pudrición. Esta enfermedad se presenta más comúnmente en ambientes húmedos, pudiendo causar la muerte rápida de los árboles (Salazar y Castaño, 1996).

2.5.2.2.4 Phytophthora cactorum. Este patógeno causa la enfermedad conocida como pudrición de la raíz y la muerte en collar de los tejidos de la base del tallo en árboles de manzano en viveros o en campo. Los tejidos se tornan de un color oscuro pardo evidenciando el avance del hongo. Los síntomas visibles en las raíces pueden ser exudados gomosos brillantes con un color rojizo en los tejidos internos y un olor fermentado. Las hojas del árbol se tornan de color violeta o bien se desprenden del árbol, aumenta la floración, pero disminuye la producción de brotes y por ende,

habrá pocos frutos y pocos que haya serán de un tamaño menor, al afectar la maduración, en casos severos de la enfermedad los árboles se verán debilitados y morir (Salazar y Castaño, 1996).

2.5.2.3. Bacterias fitopatógenas. Durante varios años un grupo de biólogos estudiaron a las bacterias fitopatógenas, pero fue en 1970 donde este tema comenzó a ser de gran interés debido al crecimiento en técnicas inmunológicas, biología molecular y a la simplicidad de manipulación genética que tenían estas bacterias (Garcés de Granada *et al.*, 1996). Las bacterias son organismos unicelulares, no presentan color o cuando lo hay son amarillentos, su multiplicación es por bipartición, son de varias formas y tienen la capacidad de parasitar a organismos vivos y causar enfermedades (Icochea, 1997). En el caso de las bacterias fitopatógenas su forma es de bastón algunas presentan de uno a más flagelos, no realizan la formación de esporas y la mayoría de ellas son Gram negativas. Las bacterias tienen la capacidad de dañar la parte foliar pero también las raíces debido a que se introducen al tejido de las plantas por daños ocasionados por insectos y nematodos o por las aberturas naturales propias de la planta como los estomas, hidátodos entre otros siempre y cuando exista humedad en la superficie de estas (Icochea, 1997). Cuando la bacteria logra introducirse a la planta puede causar lesiones en esa área o puede introducirse a través del sistema vascular de la planta (Icochea, 1997). Lo que caracteriza principalmente a estas bacterias es su capacidad para acabar con grandes cantidades de sustrato en poco tiempo, esto debido a la gran velocidad de multiplicación, su gran actividad enzimática tienen la capacidad de digerir el sustrato rápidamente, esto ocurre principalmente en órganos de la planta con mayor carnosidad como son los tubérculos, bulbos y raíces (Icochea, 1997). Algunos de los síntomas que se presentan en las plantas causados por estas bacterias son marchitamientos, manchas en tejidos vegetales y frutos, cánceres entre otras (Garcés de Granada *et al.*, 1996).

Abundante literatura demuestra la capacidad de *E. amylovora* para causar la enfermedad del tizón de fuego infectando la parte aérea de los árboles de manzano (Wilson *et al.*, 1989a). Sin embargo, existe la posibilidad de que esta vía de infección no sea la única. Hay evidencia de que la infección también es causada por medio del suelo que está en contacto con el sistema radicular del manzano (Hildebrand *et al.*, 2001). Se sabe que cuando la humedad es alta el patógeno genera la formación de un exopolisacárido en el tejido vegetal el cual, puede ser diseminado por la lluvia o el viento (Hildebrand *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 1990). El exopolisacárido puede llegar al suelo y de ahí el

patógeno será propagado por medio de insectos del suelo como micro artrópodos y nematodos y causar enfermedad por medio de la raíz (Chantanao *et al.*, 1969; Hildebrand *et al.*, 2000, 2001; Santander *et al.*, 2017).

2.6 Susceptibilidad del Manzano

2.6.1 Portainjertos

El rendimiento y calidad de los frutos dependen de factores ambientales y genéticos, y del manejo agronómico, pero la elección de los portainjertos también resulta importante, pudiendo mejorar o empeorar el rendimiento de un huerto. Hoy en día, el uso de portainjertos clonales y enanizantes es más común, y es bien sabido que el portainjerto seleccionado determinará las características que tendrá la plantación, por ejemplo, resistencia a plagas y enfermedades (Miñaro *et al.*, 2011). El uso de portainjertos tiene como principal objetivo mejorar la calidad de los frutos, así como la resistencia a plagas y enfermedades que afecten al árbol (Li *et al.*, 2015; Robinson *et al.*, 2002).

Es conocido que algunos portainjertos pueden portar y propagar fitopatógenos como *E. amylovora* y causar la enfermedad tizón de fuego (Momol *et al.*, 1998; Ockey y Thomson, 2004). Llegando en ocasiones a provocar la pérdida total de los árboles (Norelli y Aldwinckle, 2000). Sin embargo, aún falta generar información entorno al papel que juegan los portainjertos como potenciales fuentes primarias de inóculo infectivo. Aunque también, se ha señalado que la infección puede originarse a partir de la variedad comercial injertada. También la infección pudiera empezar por los rebrotes del portainjerto, permitiendo a la bacteria el traslado a otras zonas (Rossini y Giayetto, 2015).

Al inicio de la infección de los árboles con *E. amylovora*, los síntomas pueden confundirse con los ocasionados por otras enfermedades, pero algunos son inconfundibles, por ejemplo, la presencia de exudados en hojas, ramas, troncos, frutos, flores y brotes, que se encorvan dando ese aspecto conocido como “cayado de pastor” y la presencia de cánceres con estrías rojizas. Es importante señalar, que tanto las variedades como los portainjertos presentan diferencias en cuanto a su

susceptibilidad a *E. amylovora*; se ha demostrado que variedades como Red Delicious y sus clones son tolerantes a esta enfermedad. Mientras que, las variedades Granny Smith, Gala y sus clones, Pink Lady y Fuji, son susceptibles a la enfermedad (Rossini y Giayetto, 2015).

3. HIPÓTESIS

Erwinia amylovora sobrevive en distintos tipos de suelo y causa infecciones en el manzano a través del sistema radicular.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar la sobrevivencia de *E. amylovora* en dos tipos de suelo y su capacidad de causar enfermedad a nivel radicular en árboles de manzano.

4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la sobrevivencia de cepas de *E. amylovora* en dos tipos de suelo recolectados en huertos manzaneros de la región.
2. Determinar la capacidad de *E. amylovora* para infectar portainjertos de manzano MM 107, a través del sistema radicular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La capacidad de sobrevivencia de *E. amylovora* se evaluó en dos tipos de suelo (uno de color negro y otro de color rojo). Muestras de ambos tipos de suelo, con la microbiota natural (A) y sin la microbiota (B) fueron inoculadas con *E. amylovora* y se analizó su supervivencia. También se evaluó la capacidad de *E. amylovora* para infectar el sistema radicular de dos portainjertos de manzano. En ambos suelos, se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos y se cuantificaron poblaciones nativas de *E. amylovora*. Para ello los patrones de manzano se mantuvieron en macetas que contenían suelo de cada uno de los dos tipos (negro o rojo) y se inocularon con cepas de *E. amylovora* de manera individual. Las macetas se mantuvieron bajo las condiciones ambientales de la estación. El desarrollo de la infección causada por *E. amylovora* en los tejidos del manzano se monitoreó mediante inspecciones visuales durante quince días post-inoculación y se checaron características tales como necrosis y marchitamiento. También se identificó y cuantificó a *E. amylovora* en muestras de tejido de las raíces maceradas, la cuantificación se hizo por medio de diluciones en placas con agar-CCT solidificado.

5.1. Recolección de Suelos

5.1.1. Muestreo

De huertos de manzano en Cuauhtémoc, Chihuahua, se recolectaron dos muestras de suelo, rojo arcilloso (A) y negro limoso (B). Las muestras de suelo fueron recolectadas aleatoriamente a una profundidad aproximada de 0-30cm, a un metro de distancia del tronco del manzano, retirando de la superficie ramas y MO (Caputo *et al.*, 2015). Se utilizó el método de recolección aleatoria y las muestras se colocaron en bolsas de plástico rotuladas para su identificación (Brady y Weil, 1999).

5.1.2. Caracterización Físicoquímica del Suelo

En cada una de las muestras recolectadas de suelo se realizaron determinaciones físicoquímicas. La primera de ellas fue el perfil de textura determinado mediante la metodología descrita en la guía para suelos de Vargas Rojas (Vargas Rojas, 2009). Otro parámetro que se determinó fue el contenido de nitrógeno disponible utilizando la metodología de kjeldahl (Mamani *et al.*, 2020). Para la determinación de pH se utilizó el método sugerido por Mckean (Mckean y Sheila, 1993). Así mismo se determinó la conductividad eléctrica (valor indirecto de la salinidad) utilizando la metodología descrita en el manual de análisis de suelos y tejido vegetal (Mckean, 1993). Se realizó también la determinación del contenido de materia orgánica y contenido de carbón orgánico utilizando la metodología empleada por Walkley-Black y Nelson (Galvis y González, 2005; Nelson y Sommers, 1983). Otra de las determinaciones realizadas fue el contenido de humedad utilizando la metodología descrita en el manual de análisis de suelo y tejido vegetal (Mckean, 1993). Se determinó además, el contenido de macro y micronutrientes utilizando la metodología descrita por Ulloa (Ulloa Guitián *et al.*, 2001). Y por último la determinación de la permeabilidad del suelo, que se analizó mediante el método de permeámetro de carga constante. (Galvis y González, 2005; Mamani *et al.*, 2020; Morales, 2008; Gonzalez y Roberto, 2004; Vargas Rojas, 2009; Mckean y Sheila, 1993; Nelson y Sommers, 1983; Ulloa Guitián *et al.*, 2001).

5.1.3. Análisis Microbiológicos

A ambas muestras de suelo, se les realizó un análisis microbiológico mediante la técnica de dilución en placa (Rhoades, 1982), con énfasis en la presencia y cantidad de poblaciones nativas de *E. amylovora*. Se utilizaron placas con el medio semi-selectivo CCT, las placas experimentales se incubaron por 24 h a 28°C. La cuantificación de poblaciones de hongos y levaduras, y mesófilos (aerobios y anaerobios) se hizo con base en la NOM-111-SSA1-1994. Para la cuantificación de microorganismos fijadores de nitrógeno se empleó la metodología propuesta por (Peña y Reyes, 2007).

5.1.4. Esterilización del Suelo

Otros tratamientos consistieron en la esterilización de los dos tipos de suelos para eliminar la microbiota nativa. Para ello, se pesaron 5 kg de cada uno de los suelos y se colocaron por separado en bolsas de plástico. Se llevaron a la autoclave para su esterilización a 121° C durante 15 min. De igual manera se llenaron 24 bolsas de plástico de cada uno de los diferentes suelos dando un total de 48 bolsas de plástico de 1 kg cada una colocadas en la autoclave para su esterilización a 121°C durante 15 minutos. Se sacaron de la autoclave y se dejaron enfriar para su posterior análisis.

5.1.5. Cuantificación de las Poblaciones Nativas de *E. amylovora*

En ambos tipos de suelo se determinó la presencia y concentración de poblaciones nativas de *E. amylovora*. Las poblaciones de *E. amylovora* se estimaron mediante siembra de alícuotas de diluciones seriadas utilizando la metodología de extensión en placa sobre el medio semi-selectivo CCT (g-mL/L-1 100.0 sacarosa, 10.0 sorbitol, 30.0 tergitol aniónico 1 %, 2.0 cristal violeta 0.1 %, 23.0 agar nutritivo), (Ishimaru y Klos, 1984). Los conteos en placa se hicieron a las 24 h post-incubación a 28°C.

5.1.6. Cepas de *E. amylovora*

Se utilizaron cuatro cepas de *E. amylovora* dos de ellas provenientes del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del CIAD, Unidad Cuauhtémoc anteriormente clasificadas bajo los nombres 10A y H3. Empleamos la cepa 10A debido a su alta virulencia mientras que la cepa H3 es de virulencia baja. También se utilizó la cepa Gol1 proveniente del suelo negro y la cepa Ga2 proveniente del suelo rojo.

5.1.7. Selección de Patrones de Manzano

Se utilizaron los portainjertos MM.107 de manzano de cuatro meses de edad provenientes de viveros comerciales locales. Se eligieron estos portainjertos por su susceptibilidad al tizón de fuego parecida al MM.106, su capacidad de adaptarse a distintos tipos de suelo y por ser los más utilizados en la región manzanera de Chihuahua (Preston, 1955).

5.1.8. Sobrevivencia de *E. amylovora* en Suelo

La sobrevivencia de *E. amylovora* en el suelo se determinó en los distintos tipos de suelo. Se usaron charolas de plástico (domo transparente) con medidas de 23cm de largo, 15cm de ancho y 10cm de profundidad, previamente desinfectadas con alcohol al 70%. A cada charola se le hicieron 27 orificios (0.5 cm de diámetro) en la parte superior y se colocaron 400 g de cada uno de los distintos tipos de suelo rojo y negro (con y sin microbiota) de manera individual. En seguida, el suelo se inoculó con 0.02 mL (diluida en 20 mL de agua) de una suspensión de *E. amylovora* (crecida en caldo nutritivo) con una densidad óptica (DO) 600nm obteniendo un valor de 1.0 equivalente a 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. La humedad del suelo en las charolas se mantuvo al adicionar 10 mL de agua estéril cada 96 h. La sobrevivencia de la bacteria se estimó mediante el conteo de colonias sobre placas en CCT en los días 0, 1, 4, 8, 20, 29 y 33. El experimento se realizó por triplicado.

5.1.9. Capacidad de Infección Radicular a Través del Suelo

Para facilitar las evaluaciones, el porta-injertos de manzano, se mantuvo en macetas con las muestras de suelo negro estéril colocando 1 kg de suelo por cada una de las macetas. El experimento se realizó al aire libre obteniendo así una buena incidencia de luz natural donde se

mantuvo una humedad y temperatura conforme se encontraba el medio ambiente durante el verano. La cantidad de agua administrada a las macetas dependió de la permeabilidad del suelo. Determinada mediante el método de carga constante (Angelone *et al.*, 2006). Al inicio del experimento a los suelos se les colocó 900 mL de agua y para mantener la humedad en ellos conforme pasaban los días se les adicionaron 100 mL de agua estéril cada 72 h en cada una de las macetas. Se inocularon dos suspensiones de *E. amylovora* por separado la primera con un volumen de 750 mL a una concentración de 10^5 UFC/mL y la segunda a las otras macetas con un volumen de 750 mL a una concentración de 10^8 UFC/mL directamente al suelo. Las dos concentraciones fueron inoculadas en el mismo día. El análisis se llevó a cabo a los 15 días después de la inoculación y se determinó infección sintomática mediante una inspección visual en tejidos vegetales para buscar sintomatología típica del tizón de fuego utilizando parámetros de grado de infección alto, medio y bajo. Además, se realizó la cuantificación de la bacteria para ver si las poblaciones de *E. amylovora* lograron colonizar las raíces de los árboles. Esto se determinó mediante diluciones seriadas en placas conteniendo CCT, después de haber eliminado el exceso de suelo en las raíces y haber lavado la raíz con agua destilada estéril se procedió a sumergir la raíz de los árboles en el agua durante 10 minutos para asegurarnos de dejar totalmente limpia la raíz sin excesos de suelo y utilizando el agua para realizar el análisis. Para aislar las bacterias endófitas de la raíz, se realizó un lavado de las raíces con hipoclorito al 1%, seguido de tres lavados con agua destilada estéril, posterior a ello se cortó la raíz en pequeños pedazos con ayuda de un cúter realizando cortes en diagonal colocándolos en tubos con agua peptonada, se dejaron en agitación constante mediante un vortéx durante 2 h, posterior a ello utilizando el agua peptonada se realizaron las diluciones seriadas en placas de agar CCT para su cuantificación. Se realizaron tres repeticiones por cada ensayo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Recolección de Suelos

Al analizar las muestras de suelo de los huertos de manzano en Cd. Cuauhtémoc Chihuahua, de acuerdo a UNIFRUT (2021), su textura corresponde a suelos franco arenosos, el primero de ellos con una coloración rojiza, presentó porcentajes de 61, 24 y 15% de arena, limo y arcilla respectivamente, mientras que el suelo de color negro, sus valores fueron de 69, 20 y 11% para arena, limo y arcilla, respectivamente. Comúnmente se caracteriza a los suelos franco arenosos con una densidad seca de alrededor de 1800 kg/m^3 y las partículas con una densidad de 2630 kg/m^3 , generando espacios porosos de 31,56 %, una solidez de 68,44 % y por último un volumen de aire del 10% para $w = 12 \%$, esto quiere decir que los suelos franco arenosos están considerados como suelos compactos (García *et al.*, 2009).

6.2 Análisis Físicoquímicos

En el cuadro 1 se observa la caracterización físicoquímica de los dos tipos de suelo. Se evidencia que ambos suelos son franco arenoso de acuerdo con el perfil de textura (tamaño de sus partículas desde unos pocos nanómetros hasta varios milímetros).

La textura de un suelo influye en la capacidad de retención de agua, nutrientes y permeabilidad, dando lugar a encharcamientos, lixiviación de nitrógeno, así como su capacidad para descomponer materia orgánica (Fernández y Trillo, 2005).

El contenido de nitratos en ambos tipos de suelo fue deficiente. Se ha sugerido que las deficiencias de nitrógeno en los suelos agrícolas impacta negativamente en la producción de cultivos (Martínez y Galantini, 2018). Los nitratos provienen de algunas de las actividades humanas como escorrentía de terrenos que han sido cultivados, fertilización excesiva con nitrógeno y el cambio de MO presente en el suelo como resultado de la rotación de cultivos (Ávila *et al.*, 2003).

Por otra parte, al determinar la conductividad eléctrica el suelo rojo tuvo valores menores que el

suelo negro, presentando valores de 0.51 ds/m y 0.91 ds/m respectivamente, catalogándose los dos como no salinos. La conductividad eléctrica de los suelos se debe a una combinación de propiedades fisicoquímicas, ejemplo de esto son la textura, humedad, intercambio catiónico, sales, pH, materia orgánica entre otras (Terrón *et al.*, 2011). La conductividad eléctrica en el suelo influye de manera importante en el esfuerzo que tiene que realizar la raíz de la planta para absorber sus nutrientes. En caso de que la conductividad eléctrica del suelo sobrepase el valor óptimo para el cultivo, la raíz tendrá que hacer un mayor esfuerzo para poder obtener los nutrientes que la planta requiere (Corwin y Lesch, 2005; Serrano *et al.*, 2010; Terrón *et al.*, 2011).

El análisis de pH mostró que ambos suelos fueron neutros, con valores de 7.23 y 7.28, para el suelo negro y rojo respectivamente. El pH del suelo se debe a la presencia de residuos de plantas como ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como es el caso de ácido acético, cítrico, oxálico entre otros (Rivera *et al.*, 2018). El pH también depende de la presencia de ácidos fuertes como el ácido nítrico y sulfúrico que dependerán de la actividad de algunos microorganismos (Rivera *et al.*, 2018). También se debe a las lluvias ácidas generadas por las altas contaminaciones al estar en contacto gases tóxicos de la atmósfera, esto dará como resultado lluvias que modificarán el pH del suelo (Rivera *et al.*, 2018). Además el uso inadecuado de fertilizantes es uno de los principales causantes de las modificaciones del pH en los suelos (Rivera *et al.*, 2018). Otra de las causas es la producción de dióxido de carbono que pasa a ácido carbónico y la abundancia de óxidos de hierro y aluminio modifican considerablemente el pH del suelo (Rivera *et al.*, 2018). El pH del suelo afectará en gran medida a la disponibilidad de nutrientes que este tendrá (Rivera *et al.*, 2018).

El suelo negro presentó el mayor contenido de MO con 9.21. Este valor fue 3.3 veces mayor que el valor (2.76%) registrado en el suelo rojo. Ambos suelos catalogados como muy alto y medio, respectivamente (Galantini *et al.*, 1994).

La MO en los suelos depende de factores como el clima, la vegetación, textura del suelo y el drenaje de estos (Pascual y Venegas, 2010) e influye en la calidad de los suelos, al estabilizar el pH y fungir como almacén y suministro de nutrientes que las plantas necesitan para su desarrollo (Pascual y Venegas, 2010).

En cuanto al contenido de humedad, el suelo rojo tuvo la mayor humedad al primer día de evaluación con 19%, sin embargo; el suelo negro mantuvo en mayor medida los valores de humedad determinada en los días 2, 4, 8 y 9 con valores de 17, 9, 5 y 2%, respectivamente. El contenido de humedad en los suelos depende mayoritariamente de las precipitaciones, de la evaporación y de la vegetación presente en ellos (Perdomo *et al.*, 2020). A humedad impacta

principalmente en el crecimiento de las plantas y regula la temperatura (Perdomo *et al.*, 2020). Por otra parte, los dos tipos de suelo mostraron un alto contenido de micro y macronutrientes (Cuadro 1). La mayoría de los nutrientes se relacionan entre si al aportar nitrógeno a los suelos, que a su vez también aportan minerales poco disponibles en ellos (Martínez *et al.*, 2008) La solubilidad de algunos minerales como hierro, magnesio, cobre y zinc, la determina la presencia de iones aluminio (Al^{+++}) e hidrógeno (H^+), mientras que la ausencia de estos iones indica la escases de algunos nutrientes como potasio, magnesio, sodio y calcio (Osorio, 2012).

La saturación (contenido de agua) fue mayor en el suelo negro, obteniendo un 60% comparado al 32% registrado en el suelo rojo. La permeabilidad en ambos suelos negro y rojo fue similar con valores de 7 y 7.2 mL, respectivamente. La permeabilidad de los suelos es la capacidad del agua para pasar por los poros de este y depende de los vacíos continuos (Angelone *et al.*, 2006). Esta capacidad permite que el agua y aire necesarios lleguen a la planta para favorecer su desarrollo (Angelone *et al.*, 2006)

Ambos suelos mostraron porcentajes altos en azufre. El azufre es un macronutriente necesario para el crecimiento y desarrollo de la microbiota del suelo, ya que participa en la síntesis de proteínas y procesos enzimáticos, por lo tanto, muchas transformaciones del azufre en el suelo dependen de la actividad microbiana (Colacelli, 2001).

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos de los suelos negro y rojo.

DETERMINACIÓN	SUELOS	
	ROJO	NEGRO
Perfil de textura del suelo	Franco arenoso	Franco arenoso
Nitratos (NO_3) kg/ Ha	40.28 (Deficiente)	26.85 (Deficiente)
Conductividad eléctrica (ds/m)	0.51 (No salino)	0.91 (No salino)
Ph	7.28 (Neutro)	7.23 (Neutro)
Contenido de materia orgánica (%)	2.76 (Medio)	9.21 (Muy alto)
Macro y micronutrientes	Alto	Alto
Saturación (%)	33.0	60.0
Permeabilidad del suelo (mL)	7.2	7.0
Azufre(S) ppm	61.78 (Alto)	64.35 (Alto)

6.3 Determinaciones Microbiológicas en Dos Tipos de Suelos.

En el cuadro 2, se muestra la cuantificación de diferentes microorganismos en los tipos de suelo (rojo y negro). La concentración de mesófilos anaerobios, fue mayor en el suelo rojo (1×10^6 UFC/g) que la concentración de 5×10^3 UFC/g registrada en suelo negro. Contrariamente, la concentración de hongos y levaduras fue mayor (4×10^6 UFC/g) en el suelo negro que en el suelo rojo (3×10^2 UFC/g). Los microorganismos fijadores de nitrógeno en los suelos oscilaron en 3×10^4 UFC/g y 2×10^5 UFC/g para los suelos rojo y negro, respectivamente.

Diversas investigaciones han demostrado la participación activa de distintos tipos de microorganismos en la transformación de la MO disponible en los suelos. Al principio de esa transformación, es común encontrar a bacterias no esporógenas, que utilizan principalmente los materiales orgánicos más fácilmente asequibles como mono y disacáridos, aminoácidos, proteínas, entre otras. Después de esta comienza la participación de las bacterias esporógenas, estas utilizan compuestos orgánicos más complejos como la celulosa, y al final del proceso se da la participación de las actinobacterias (actinomicetos) (Alfredo Silva, 1998). Las poblaciones microbianas del suelo interactúan activamente en la rizosfera, impactando directamente el desarrollo de las plantas y calidad de los suelos, ya que la diversidad microbiana se ha relacionado con importantes actividades que contribuyen en la estabilidad y productividad de los ecosistemas naturales y agro ecosistemas (Richardson *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que algunos microorganismos presentes en el suelo se relacionan con las raíces de las plantas y con componentes del suelo en la interfaz raíz-suelo. La relación de los microorganismos con el suelo y las raíces, da lugar a lo que conocemos como rizosfera, donde los microorganismos se desarrollan y mantienen un equilibrio (Barea *et al.*, 2005). La mayoría de los estudios de la rizosfera prestan más atención a bacterias y hongos de suelo, estos microorganismos se han agrupado de acuerdo a las funciones que realizan cada uno de ellos, el primer grupo son microorganismos degradadores de residuos orgánicos, el segundo grupo son las bacterias que promueven el crecimiento vegetal y el tercer grupo son los hongos y bacterias antagonistas de patógenos de las raíces de las plantas (Barea *et al.*, 2005).

Por otra parte, los microorganismos endófitos colonizan internamente a las raíces y promueven el crecimiento y la protección de las plantas, algunos de estos microorganismos son simbioses de las

plantas, destacando entre ellos los hongos micorrícicos y las bacterias fijadoras de nitrógeno (Barea *et al.*, 2005).

Las micorrizas ayudan a la nutrición de las plantas especialmente en la absorción de fosforo en distintos ecosistemas agrícolas y naturales. Esto también contribuye al mejoramiento de la captación de agua y algunos nutrientes, además de la aportación de nitrógeno (Pedraza *et al.*, 2010). La simbiosis no solo participa en el ciclo de nutrientes del suelo a la planta, sino que también protege a la planta en gran medida del estrés, ya sea provocado por algunos patógenos o estrés producto por sequias, metales pesados, contaminantes, etc. Además, ayudan a mejorar la estructura del suelo permitiendo un buen estado nutricional e hídrico (Pedraza *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Determinaciones microbiológicas en dos tipos de suelo.

DETERMINACIONES	SUELOS	
	ROJO	NEGRO
Mesofílicos aerobios	2×10^4 UFC/g	3×10^4 UFC/g
Mesofílicos anaerobios	1×10^6 UFC/g	5×10^3 UFC/g
Hongos y levaduras	3×10^2 UFC/g	4×10^6 UFC/g
Fijadores de nitrógeno	3×10^4 UFC/g	2×10^5 UFC/g

6.3.1 Identificación y Cuantificación de *E. amylovora* Nativas en Suelo Negro y Rojo

En el cuadro 3 se muestra la cuantificación de *E. amylovora*, detectándose a una concentración de 3×10^3 UFC/g en el suelo rojo y 5×10^3 UFC/g en suelo negro. Se observó que la concentración de los dos suelos fue muy similar, siendo el suelo negro quien presentó una mayor población debido a que mostró ser rico en nutrientes y materia orgánica con una capacidad de retención de agua por mayor tiempo. Ya es sabido que esto facilita la rápida multiplicación y sobrevivencia de *E. amylovora* al estar en un medio con alta humedad (Barrios *et al.*, 2011; Perotti *et al.*, 2005).

Es probable que las características fisicoquímicas del suelo rojo no favorecieron la reproducción de *E. amylovora*, especialmente su contenido de MO y nutrientes, lo que pudo inclusive limitar su sobrevivencia. Sin embargo, esto pudo compensarse por el alto porcentaje de humedad, permitiendo su supervivencia y reproducción.

El suelo rojo apporto condiciones poco favorables para el desarrollo de la bacteria como son

contenido medio de materia orgánicas y nutrientes, limitando la sobrevivencia y reproducción de *E. amylovora*. Pero a su vez, la bacteria se vio favorecida por una alta humedad, esto permitió que permaneciera la población de la bacteria. La sobrevivencia de las bacterias en el suelo, se debe a la aportación de las características fisicoquímicas ideales, en especial el aporte de nutrientes, conductividad eléctrica, materia orgánica, humedad, factores ambientales y agroecológicos (Barrios *et al.*, 2011; Perotti *et al.*, 2005).

Cuadro 3. Cuantificación de poblaciones de *E. amylovora* nativa en dos tipos de suelo.

MUESTRAS DE SUELO	CONCENTRACIÓN (UFC/g)
Negro	5×10^3
Rojo	3×10^3

6.4 Sobrevivencia de *E. amylovora* en suelos

6.4.1 Determinación de la Sobrevivencia de *E. amylovora* (10A) en Suelo Negro

Al determinar la sobrevivencia de *E. amylovora* en el tratamiento con suelo nativo inoculado, se detectó a los 33 días una disminución en la población de la bacteria que ya contenía células de *E. amylovora* nativas, iniciando con una carga bacteriana de 10^6 UFC/g en el día 0 y terminando con 10^3 UFC/g en el día 33 después de la inoculación (Figura 2).

Por otro lado, el comportamiento de *E. amylovora* en el tratamiento con suelo estéril inoculado fue diferente, se observa que *E. amylovora* inicio a una concentración de 10^6 UFC/g, aumentando su concentración hasta casi 10^8 UFC/g a las 24 h, después de este punto y hasta el cuarto día, se observó una disminución en la concentración hasta llegar a 10^4 UFC/g. A partir del cuarto día y hasta el día 29 la concentración de *E. amylovora* permaneció entre 10^4 UFC/g y 10^6 UFC/g y para el último día del análisis que fue el día 33 quedo por encima de 10^5 UFC/g (Figura 2). La razón de estas variaciones, es que muchos de los microorganismos requieren de más tiempo para adaptarse de manera estable y efectiva a los suelos que son inoculados, ya que presentan nuevas condiciones

ecológicas y medioambientales (Higa y Parr, 2013).

Mientras que, al evaluar el suelo nativo como control positivo, se puede observar el mismo comportamiento desde el día cero hasta el cuarto día, con una población de 10^3 UFC/g, después de esos días hay un aumento en la población de la bacteria hasta alcanzar 10^5 UFC/g donde permaneció en esa concentración hasta el último día del análisis. Los resultados del control del suelo estéril (negativo) fueron los esperados (Figura 2).

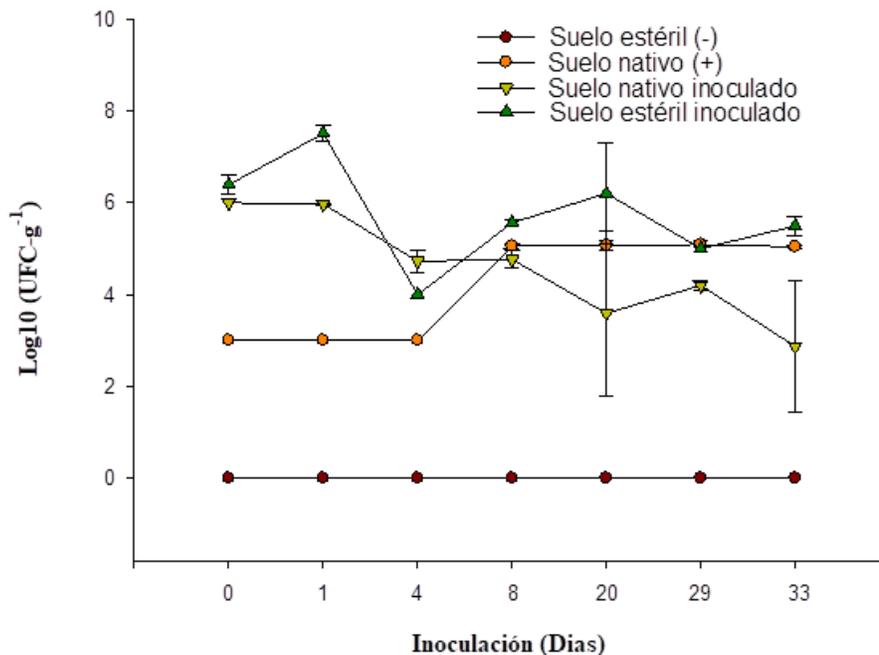


Figura 2. Sobrevivencia de *E. amylovora* en suelo negro después de 33 días de inoculación

6.4.2 Determinación de la Sobrevivencia de *E. amylovora* (10A) en Suelo Rojo

En el suelo nativo (+) utilizado como control positivo (+) que inició con una población de 10^3 UFC/g de *E. amylovora* nativas, al octavo día aumentó dos unidades logarítmicas llegando a 10^5 UFC/g, manteniéndose esta concentración hasta el día 33, siendo el último día del análisis (Figura 3).

La población de la cepa 10A de *E. amylovora* inoculada en suelo rojo nativo, registró una disminución desde el primer y hasta el cuarto día post-inoculación, iniciando con valores de 10^6 y

llegando a 10^2 UFC/g, respectivamente, estos valores están por debajo de la concentración de *E. amylovora* nativas de ese suelo (Cuadro 3). Pero a partir del día ocho se evidenció una recuperación de la población hasta lograr 10^5 UFC/g, permaneciendo así hasta el día 20 post-inoculación (Figura 3).

Mientras que el comportamiento de *E. amylovora* en el suelo estéril inoculado presentó un aumento en su concentración, aproximándose a 10^8 UFC/g en el primer día, disminuyendo al cuarto día hasta llegar a 10^4 UFC/g, sin embargo, al octavo día, la población aumentó por encima de 10^5 UFC/g, permaneciendo dichas poblaciones hasta el día 33 (Figura 3).

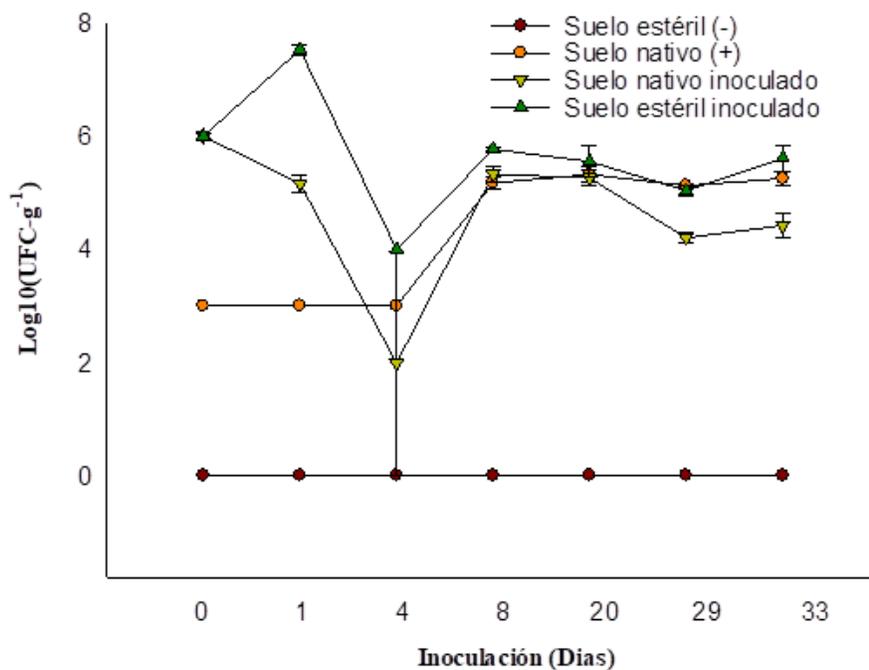


Figura 2. Sobrevivencia de *E. amylovora* en suelo rojo a los 33 días post-inoculación.

6.4.3 Determinación de la Sobrevivencia de *E. amylovora* (H3) Inoculada en dos Tipos de Suelos.

La cepa H3 de *E. amylovora* sobrevivió en ambos suelos negro y rojo, tanto con microbiota y sin microbiota (estéril). El suelo nativo (con microbiota) aumentó la población de *E. amylovora* (H3)

a 10^5 UFC/g a partir del octavo día post-inoculación y se mantuvo hasta el día 33 post-inoculación. Interesantemente en suelo estéril rojo inoculado con H3, la población aumentó desde el primer día post-inoculación contabilizando 10^8 UFC/g, pero en el cuarto día post-inoculación se observó un descenso drástico, llegando a 10^4 UFC/g. Sin embargo, al octavo día post-inoculación, la población de H3 se recuperó hasta igualar la concentración inoculada inicialmente (10^6 UFC/g), después de 33 días post-inoculación la población disminuyó una unidad logarítmica (10^5 UFC/g), respecto a la población inoculada inicialmente (Figura 4). Un comportamiento similar de *E. amylovora* (H3) se observó al inocularse en suelo estéril negro, pero finalizando con una población de 10^6 UFC/g, similar a la inoculada inicialmente (Figura 4). Las poblaciones de *E. amylovora* H3 inoculadas en el suelo nativo negro, disminuyeron a través del tiempo, detectándose poblaciones menores al 10^5 UFC/g hasta el día 29, con una unidad logarítmica menor al día 33 post-inoculación (Figura 4). Este comportamiento de H3 fue similar al observado al ser inoculado en suelo rojo bajo las mismas condiciones (Figura 4).

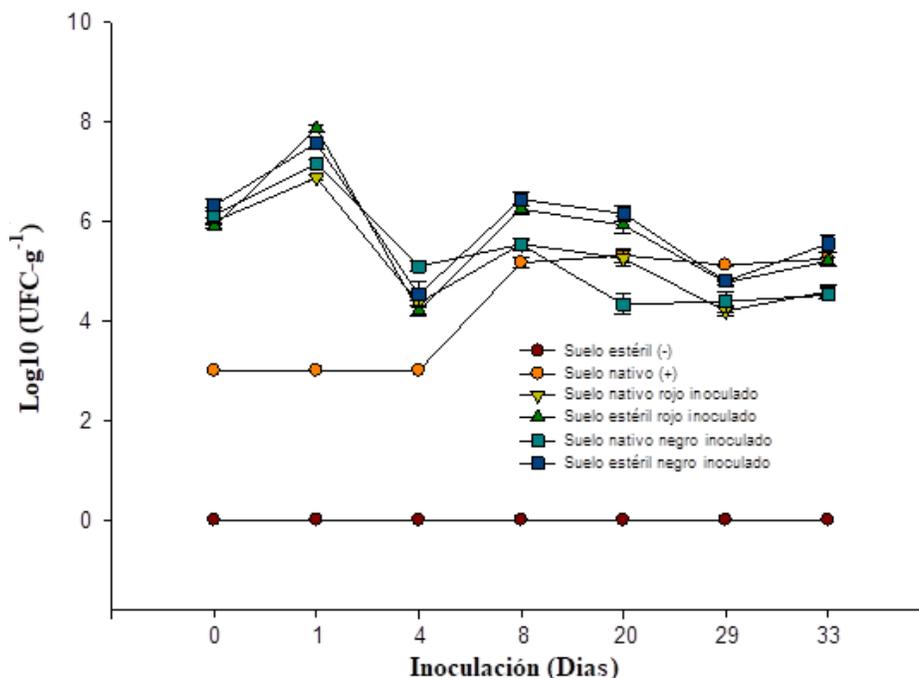


Figura 3. Sobrevivencia de *Erwinia amylovora* (H3) inoculada en dos tipos de suelos bajo diferentes condiciones.

6.4.4 Determinación de la Supervivencia de la Cepa 10A en Dos Tipos de Suelos

Al realizar la cuantificación de *E. amylovora* en el suelo nativo, de igual manera observamos la supervivencia de esta bacteria, así como un incremento de su población a partir del día 8 hasta el día 33 con valores de 10^4 y 10^5 UFC/g. (Figura 5). De igual manera al comparar las poblaciones de *E. amylovora* en los tratamientos con suelo nativo rojo inoculado y suelo nativo negro inoculado, se encontraron diferencias al día 4, siendo mayor las poblaciones en el suelo nativo rojo inoculado, mientras que en los días 29 y 33, las poblaciones del tratamiento con suelo nativo negro fueron mayores con 10^5 UFC/g para ambos días (Figura 5). Por otra parte, al comparar los tratamientos con suelo estéril rojo inoculado y suelo estéril negro inoculado, de igual manera las mayores diferencias se detectaron en los días 4 con valores de 10^6 y 10^4 UFC/g respectivamente y el día 20 de evaluación con 10^6 y 10^5 UFC/g. (Figura 5).

El tratamiento con suelo estéril permaneció como se esperaba desde un principio libre de *E. amylovora* hasta el último día del análisis.

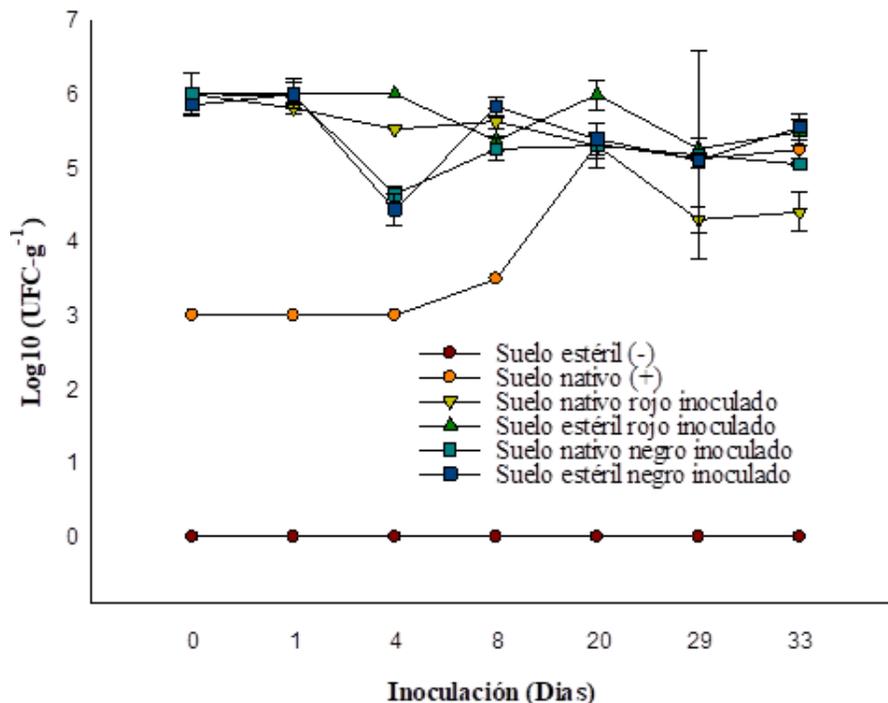


Figura 4. Supervivencia de *Erwinia amylovora* (10A) inoculada en dos tipos de suelos, desde el día 01 hasta el día 33 post-inoculación.

6.5 Determinación de la Capacidad de Infección de *E. amylovora* a Través del Sistema Radicular

6.5.1 Evaluación del Efecto de *E. amylovora* Inoculado en Raíces del Porta-injerto de Manzano MM 107

6.5.1.1 Análisis endófito de *E. amylovora* en raíces del portainjerto MM 107. Al realizar el análisis de *E. amylovora* (10A) para determinar la capacidad de penetrar e infectar al portainjerto de manzano MM 107, se observó que en la interacción entre tejido radicular y concentración de la bacteria 10^8 y 10^6 UFC/g. no se observaron diferencias significativas en el número de bacterias aisladas, De la concentración 10^8 UFC/g, inoculada inicialmente, se recuperaron 7.7×10^8 y 7.4×10^8 UFC/g en las raíces dañadas y no dañada (sin lesión), respectivamente (Figura 6). La mayor población de bacterias fue recuperada en las raíces dañadas con 10^5 UFC/g, mientras que en las raíces intactas (sin lesión) se obtuvieron 10^3 UFC/g de las 10^6 UFC/g inoculadas inicialmente. La mayor recuperación de poblaciones de *E. amylovora* inoculadas en los tejidos radiculares dañados y no dañados, se registró en concentración de 10^8 UFC/g (Figura 6). La población de *E. amylovora* en el control positivo (suelo nativo) se mantuvo estable (10^6 UFC/g) a los 15 días de evaluación. Es importante mencionar que, poblaciones bajas ($\approx 10^3$ UFC/g) de *E. amylovora* fueron capaces de infectar al portainjerto MM 107, razón por la cual, se sugiere que al detectar poblaciones de *E. amylovora* en el suelo es necesario implementar medidas de control, para evitar potenciales pérdidas.

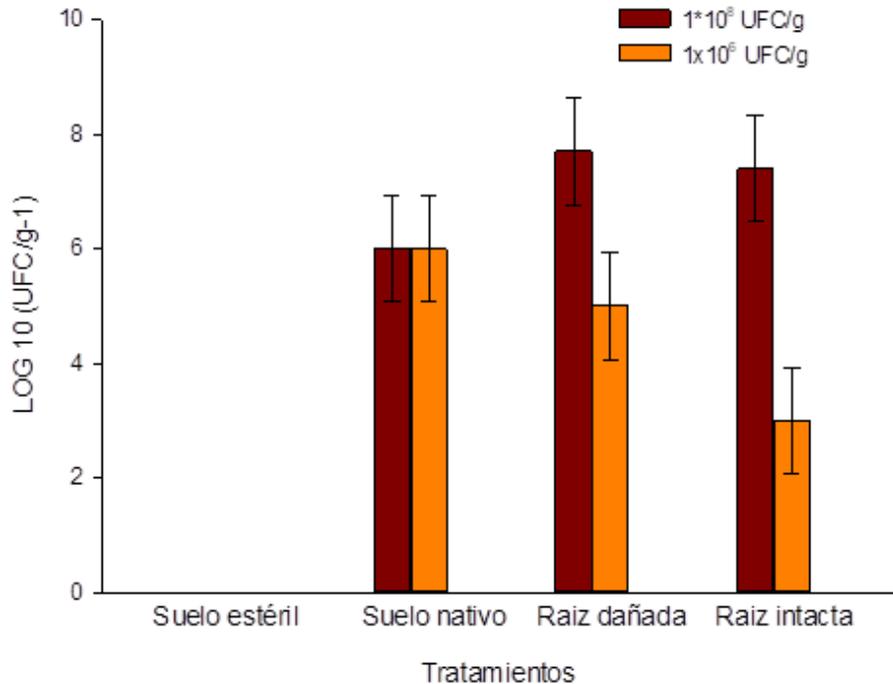


Figura 5. Capacidad de infección endófitas de *E. amylovora* en portainjertos de manzano MM 107 a través de suelo inoculado a diferentes concentraciones.

6.5.1.2 Cuantificación de *E. amylovora* en la superficie de los porta-injertos de manzano MM.107. Se realizó el análisis cuantitativo de *E. amylovora* sobre la superficie radicular (Epífita) de los porta-injertos de manzano, los cuales fueron inoculados al suelo a una concentración de 10^8 y 10^6 UFC/g, observándose diferencias significativas únicamente en la concentración de 10^6 UFC/g, las cuales presentaron un menor número de colonias, tanto en las raíces dañadas como en las raíces intactas, siendo estas últimas en las que se aisló un mayor población de *E. amylovora* con 10^3 UFC/g. Por otra parte tanto el suelo nativo como las raíces que fueron inoculadas a una concentración de 10^8 UFC/g disminuyeron su población a 10^6 UFC/g sin mostrar diferencias entre ellas (Figura 7).

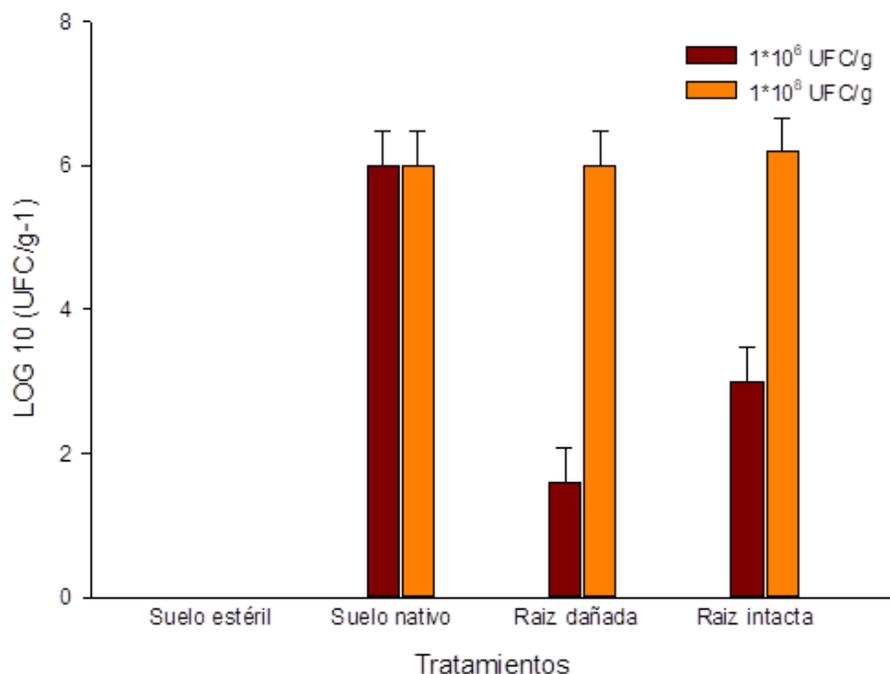


Figura 6. Capacidad de colonización de *E. amylovora* en la superficie de raíces del porta-injerto de manzano MM.107, a través de suelo inoculado a diferentes concentraciones.

6.5.1.3 Cuantificación de *E. amylovora* en la superficie de los Portainjertos de manzano MM 107. Al determinar el daño en las raíces y otros tejidos de los portainjertos de manzano MM107, cuando se inoculó el suelo a una concentración de 10^6 UFC/g, no se observaron daños visibles del tizón de fuego. Sin embargo, sí se detectaron poblaciones siendo mayor en las raíces con 10^4 UFC/g, mostrando diferencias significativas con los otros tejidos, recuperándose el menor número de bacterias en tallos superficiales con 10^1 UFC/g, así mismo se observa una concentración significativa de poblaciones de *E. amylovora* en las hojas de los porta-injertos con 10^3 UFC/g (Figura 8). Demostrando el avance de la bacteria en dichos tejidos por lo que se aumenta el riesgo de la enfermedad y posible muerte de los porta-injertos al tener condiciones favorables para su desarrollo, como se puede observar en la Figura 9, después de 15 días de hacer la inoculación en el suelo con una concentración de 10^8 UFC/g de *E. amylovora*.

Al realizar el análisis a los 15 días después de la inoculación de la bacteria con una concentración de 10^8 UFC/g en los suelos donde se plantaron los porta-injertos, se observó un rápido desarrollo de la enfermedad, secando raíces, tallo y hojas, dejando pérdidas totales en esos porta-injertos, mientras que en donde se inoculó *E. amylovora* con una concentración de 10^6 UFC/g, no se presentaron daños visibles en los tejidos, sin embargo la bacteria permanecía en forma endófito en

los tejidos (Figuras 8 y 9). Estos estudios concuerdan con otros investigadores los cuales mencionan que estos síntomas del tizón de fuego en la parte área de las plantas son originados por infecciones que iniciaron en las raíces (Santander *et al.*, 2020).

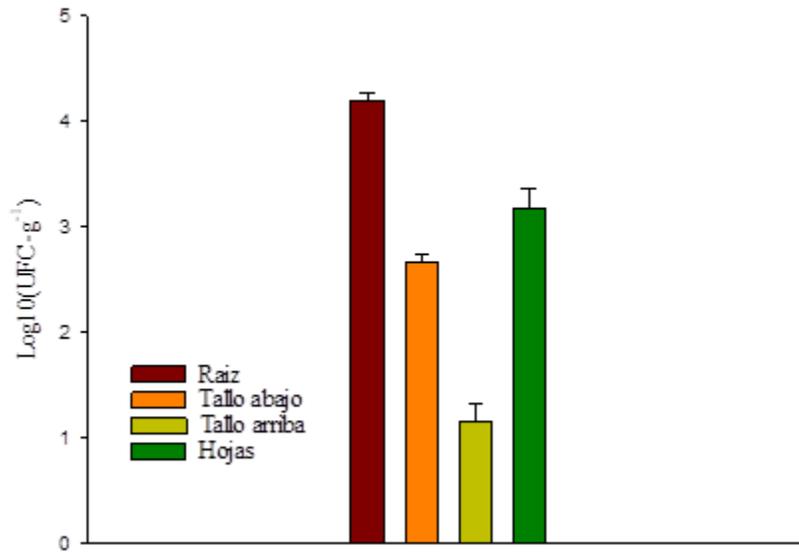


Figura 7. Poblaciones de *Erwinia amylovora* en porta-injertos de manzano MM.107, después de 15 días de inoculación al suelo con una concentración de 10^6 UFC/g.



Figura 8. Portainjertos de manzano MM 107 después de 15 días de inoculación a una concentración de A) 10^6 y B) 10^8 UFC/g. observando tejido asintomático y necrosado respectivamente.

E. amylovora tiene la capacidad de diseminarse sistémicamente en los tejidos de las plantas, causando daños en la mayoría de los órganos de ellas incluyendo las raíces (Van der Zwet *et al.*, 2012; Vanneste, 2000a). Sin embargo, existe poca información del tizón de fuego en las raíces, en algunas investigaciones incluyeron plántulas de manzana para determinar el desplazamiento o diseminación de *E. amylovora* (Bogs *et al.*, 1998; Gowda y Goodman, 1970). La mayoría de estas investigaciones se basan en el proceso de infección y susceptibilidad de los brotes de manzanos, pero estudios donde sea con otros hospederos son escasos (Billing, 2011).

Esta investigación es la primera que se realiza en México, determinando la multiplicación, diseminación e infección del tizón de fuego por medio de la inoculación de diferentes cepas de *E. amylovora* en suelo. La cual es importante ya que los productores no consideran un factor de riesgo la cantidad de bacterias en el suelo. El objetivo principal de este estudio fue comprobar la capacidad de *E. amylovora* de sobrevivir en distintos tipos de suelo y su capacidad para causar infección en el portainjerto de manzano MM 107, por medio de las raíces mediante la inoculación directa de la bacteria en los suelos, así como causando daño a las raíces, simulado la extracción o el daño

ocasionado en los viveros, basándonos en experimentos realizados en otras investigaciones (Santander *et al.*, 2020). En otras investigaciones también sugieren la posibilidad de que las raíces son fuentes de inóculo del patógeno dentro de la planta huésped (Bogs *et al.*, 1998).

8. CONCLUSIONES

De acuerdo a su textura, ambos suelos corresponden a Franco arenosos, con un pH neutro, registrándose muy alto contenido de materia orgánica en el suelo negro con 9.1%, y de medio para el suelo rojo con 2.76%, no encontrándose diferencias significativas en otras propiedades fisicoquímicas.

El suelo rojo aun cuando su valor de materia orgánica fue menor, este presentó mayor población de mesofílicos aerobios con 1×10^6 UFC/g, siendo mayor la población de hongos y levaduras para el suelo negro con 4×10^6 UFC/g.

En los suelos negro y rojo, se aislaron poblaciones nativas de *Erwinia amylovora* con valores de 5×10^3 y 3×10^3 UFC/g, respectivamente.

Al determinar la sobrevivencia de la cepa 10 A de *E. amylovora* en el suelo negro y rojo, se obtuvieron diferencias significativas, observándose la misma tendencia en las poblaciones de *E. amylovora*, registrando el tratamiento con suelo estéril inoculado, una población inicial de 10^6 UFC/g y con 10^5 UFC/g, a los 33 días de evaluación. Mientras que las poblaciones de *E. amylovora* con suelo nativo se incrementaron de 10^3 UFC/g, hasta 10^5 UFC/g en los 33 días de evaluación.

Al evaluar la sobrevivencia de la cepa H3 de *E. amylovora* en los dos tipos de suelo, las mayores poblaciones se observaron en los tratamientos con suelo estéril rojo inoculado y suelo estéril negro inoculado con valores de 10^6 y 10^5 UFC/g para los 0 y 33 días de evaluación en ambos tratamientos. No presentando ningún de los dos tratamientos diferencias significativas a los 33 días de evaluación con el suelo nativo.

Al evaluar la sobrevivencia de la cepa 10A de *E. amylovora* en los dos tipos de suelo, se observaron mayores fluctuaciones en las poblaciones en los diferentes tiempos de evaluación, no registrando diferencias significativas a los 33 días de evaluación los tratamientos de suelo estéril negro inoculado, suelo estéril rojo inoculado y suelo nativo con valores de 10^5 UFC/g.

Al determinar la capacidad de infección de *E. amylovora* al portainjerto de manzano MM 107, no se observaron diferencias significativas en el número de bacterias aisladas, a la concentración de 10^8 UFC/g, existiendo diferencias significativas únicamente a la concentración de 10^6 UFC/g, detectándose menores poblaciones en la raíz intacta con 10^3 UFC/g.

En la capacidad de colonización de *E. amylovora* en la superficie de las raíces, no se obtuvieron

diferencias significativas a la concentración de 10^8 UFC/g, pero a la concentración de 10^6 UFC/g, el menor valor con diferencias significativas fue en el tratamiento de raíz dañada con 40 UFC/g. Las poblaciones de *E. amylovora* en el suelo rojo estéril e inoculado en los porta-injertos de manzano, fue el tratamiento que causó el mayor daño en el tejido vegetal después de los 15 días de evaluación.

10. REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005). Plant pathology.(5th eds.) Elsevier academic Press. *New York*.
- Aldwinckle, H. S., y Beer, S. V. (1979). Fire blight and its control. *Horticultural Reviews*, 1, 423-474.
- Aldwinckle, N. (2000). Transgenic varieties and rootstocks resistant to fire blight *Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora* (pp. 275-292): CABI Wallingford UK.
- Alexander, T. (1934). Fire blight of pears and related plants.
- Angelone, S., Garibay, M. T., y Casaux, M. C. (2006). Permeabilidad de suelos. *Universidad Nacional de Rosario*, 1-39.
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S. A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., y Gámez-Vázquez, A. J. (2008). Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 114-120.
- Ávila, J. P., y Sansores, A. C. (2003). Fuentes principales de nitrógeno de nitratos en aguas subterráneas. *Ingeniería*, 7(2), 47-54.
- Baldwin, M., Kellogg, C. E., y Thorp, J. (1938). *Soil classification*: Bobbs-Merrill Indianapolis.
- Barea, J. M., Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (pp. 195-212): Springer.
- Barrios, M. O., Gaviria, P. A. R., y Yepes, M. S. (2011). Supervivencia de *Ralstonia solanacearum* en suelo y tejido de plantas de banano en Urabá, Colombia. *Fitosanidad*, 15(2), 91-97.
- Beckerman, J. (2006). Disease susceptibility of common apple cultivars. Fruit Diseases. *Perdue Extension, Perdue University, USA*.
- Bennett, R., y Billing, E. (1978). Capsulation and virulence in *Erwinia amylovora*. *Annals of Applied Biology*, 89(1), 41-45.
- Billing, E. (2011). Fire blight. Why do views on host invasion by *Erwinia amylovora* differ? *Plant pathology*, 60(2), 178-189.
- Biosca, E., Santander, R., Ordax, M., Marco-Noales, E., y López, M. (2007). *Erwinia amylovora* survives in natural water. Paper presented at the XI International Workshop on Fire Blight 793.
- Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C., y Geider, K. (1998). Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology*, 88(5), 416-421.
- Bubán, T., y Orosz-Kovács, Z. (2003). The nectary as the primary site of infection by *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.: a mini review. *Plant Systematics and Evolution*, 238, 183-194.

- Burrill, T. J. (1878). Pear blight. *Trans. Ill. State Hortic. Sci*, 11, 114-116.
- Buzón Durán, L. (2021). Síntesis de nuevos antifúngicos de origen natural para su uso en agricultura.
- Cai, G., Gale, L. R., Schneider, R., Kistler, H., Davis, R., Elias, K., y Miyao, E. (2003). Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici at a single site in California. *Phytopathology*, 93(8), 1014-1022.
- Cambra Ruiz de Velasco, R. (1978). Influencias del patrón y la forma en la productividad de manzano "Starking".
- Cantú Silva, I., y Yáñez Díaz, M. I. (2018). Efecto del cambio de uso de suelo en el contenido del carbono orgánico y nitrógeno del suelo. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 9(45), 122-151.
- Caputo, F., Nicoletti, F., Picione, F. D. L., y Manici, L. (2015). Rhizospheric changes of fungal and bacterial communities in relation to soil health of multi-generation apple orchards. *Biological Control*, 88, 8-17.
- Castaño, S. y Salazar P. (1996). Principales enfermedades del manzano (*Malus sp. b.*), lulo (*Solanum quitoense Lam.*) y mora (*Rubus glaucus Benth*) en Caldas.
- Colacelli, N. (2001). *Azufre en el suelo*: Tecnibook ediciones.
- Curry, P. y Pusey P. (2004). Temperature and pomaceous flower age related to colonization by *Erwinia amylovora* and antagonists. *Phytopathology*, 94(8), 901-911.
- Chantanao, A., y Jensen, H. (1969). Saprozoic nematodes as carriers and disseminators of plant pathogenic bacteria. *Journal of nematology*, 1(3), 216.
- Darwish, O., Persaud, N., y Martens, D. (1995). Effect of long-term application of animal manure on physical properties of three soils. *Plant and soil*, 176(2), 289-295.
- De Granada, E. G., De Amezcuita, M. C. O., Mendoza, G. R. B., y Zapata, H. A. V. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta biológica colombiana*, 6(1), 7-25.
- De Icochea, T. A. (1997). *Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos*: International Potato Center.
- Dominique, H. y Ruth, S. (2001). Análisis de la microbiota en suelos cultivados del altiplano central.
- Farkas, A., Mihalik, E., Dorgai, L., y Bubán, T. (2012). Floral traits affecting fire blight infection and management. *Trees*, 26(1), 47-66.
- Farkas, A., Orosz-Kovács, J., Szabó, L. G., y Bubán, T. (2000). Floral attractivity of pear cultivar 'Cinderella'. *International Journal of Horticultural Science*, 6(1), 102-109.
- Galantini, J. A., Rosell, R. A., y Iglesias, J. O. (1994). Determinación de materia orgánica empleando el método de Walkley y Black en fracciones granulométricas del suelo. *Ciencia del suelo*, 12, 81-83.
- Galantini, J. y Martínez J. (2018). Nitrógeno del suelo: desde la materia orgánica al cultivo.
- Garcés de Granada, E., Coba de Gutierrez, B., y Castillo, N. I. (1996). Identificación de bacterias fitopatógenas. *Editorial UN*.

- García, A. J. H., Jaime, Y. N. M., Bastardo, L. D. S., Llovera, F. A. S., y Contreras, A. M. Z. (2009). Humedad compactante y sus implicaciones agrícolas en dos suelos franco arenoso de sabana del estado Monagas, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(4), 937-950.
- Gayetto, A. y Rossini M. (2015). Frutales de pepita: *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al. (Tizón de fuego o fuego bacteriano).
- González-Chávez, M. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 29-37.
- González, B. y Galvis G. (2005). Evaluación de parámetros de calidad para la determinación de carbono orgánico en suelos. *Revista Colombiana de Química*, 34(2), 201-209.
- Gouk, S., y Thomson, S. (1998). *Influence of age of apple flowers on growth of Erwinia amylovora*. Paper presented at the VIII International Workshop on Fire Blight 489.
- Gowda, S., y Goodman, R. (1970). 576 Vol. 54, No. 7--Plant disease reporter--July 1970 Movement and persistence of erwinia amylovora in shoot, stem and root of apple1. *The Plant Disease Reporter*, 54, 576.
- Gross, M., Geier, G., Rudolph, K., y Geider, K. (1992). Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and molecular plant pathology*, 40(6), 371-381.
- Hassani, M., Salami, S. A., Nasiri, J., Abdollahi, H., y Ghahremani, Z. (2016). Phylogenetic analysis of PR genes in some pome fruit species with the emphasis on transcriptional analysis and ROS response under *Erwinia amylovora* inoculation in apple. *Genetica*, 144(1), 9-22.
- Hauben, L., y Swings, J. (2005). Genus XIII. *Erwinia*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 670-679.
- Heslop-Harrison, Y., y Shivanna, K. (1977). The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of botany*, 41(6), 1233-1258.
- Hildebrand, M., Dickler, E., y Geider, K. (2000). Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in a fire blight orchard. *Journal of Phytopathology*, 148(4), 251-256.
- Hildebrand, M., Tebbe, C., y Geider, K. (2001). Survival Studies with the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* in Soil and in a Soil-inhabiting Insect. *Journal of Phytopathology*, 149(11-12), 635-639.
- Hillel, D., y Hatfield, J. L. (2005). *Encyclopedia of Soils in the Environment* (Vol. 3): Elsevier Amsterdam.
- Horst, R. K. (2013). *Westcott's plant disease handbook*: Springer Science y Business Media.
- Icochea. (1997). *Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos*: International Potato Center.
- Janick. (1996). *Fruit Breeding, Tree and Tropical Fruits* Vol. 1. NY: John Wiley and Sons Inc.
- Jaramillo, V. J. (2004). El ciclo global del carbono. *Cambio climático: una visión desde México*, 77(1), 77-85.
- Johansson, J. F., Paul, L. R., y Finlay, R. D. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS microbiology ecology*, 48(1), 1-13.

- Johnson, K. B., y Stockwell, V. O. (2000). Biological control of fire blight. *Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, Erwinia amylovora*. JL Vanneste, ed. CAB International, Wallingford, UK, 319-337.
- Keil, V. (1979). Fire blight-A bacterial disease of rosaceous plants (Washington, United States Department of Agriculture Handbook 510).
- Kenerley, C., Ivors, K., Appel, D., y Nelson, S. (1994). Spatial and temporal dynamics of epidemics in apple orchards caused by *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathology*, 84, 1142.
- Khan, M. A., Zhao, Y., y Korban, S. S. (2012). Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30, 247-260.
- Klos, E. y Ishimaru C. (1984). New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology*, 74(11), 1342-1345.
- Korban, S. y Skirvin R. (1984). Nomenclature of the cultivated apple. *HortScience*, 19(2), 177-180.
- Leigh, J. A., y Coplin, D. L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual review of microbiology*, 46(1), 307-346.
- Lesch, S. y Corwin D. (2005). Characterizing soil spatial variability with apparent soil electrical conductivity: I. Survey protocols. *Computers and electronics in agriculture*, 46(1-3), 103-133.
- Li, B., Wang, J., Ren, X., Bao, L., Zhang, L., Zhang, L., . . . Zhan, D. (2015). Root growth, yield and fruit quality of 'Red Fuji' apple trees in relation to planting depth of dwarfing interstock on the Loess Plateau. *Eur. J. Horticult. Sci*, 80, 109-116.
- Maes, M. y Crepel C. (2000). Hibernation of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in host plants. *Hibernation of the fire blight pathogen Erwinia amylovora in host plants.*, 65(1), 19-25.
- Mamani, M., Miranda, R., López, M. A., Yujra, E., López, M., y Chuquimia, A. (2020). Validación del método Kjeldahl en la determinación del Nitrógeno Mineral, mediante el uso de Cloruro Potasio. *Apthapi*, 6(2), 1917-1925.
- Marini, R., Fell, R. y Campobell R. (1990). Characterization of apple nectar sugars in selected commercial and crab apple cultivars. *Fruit Varieties Journal*, 44(3), 136-141.
- Martínez, E., Fuentes J. y Acevedo E., (2008). Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 8(1), 68-96.
- Mckean, S. J. (1993). *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal: una guía teórica y práctica de metodologías*: Ciat.
- Miller, P. (1929). Studies of fire blight of apple in Wisconsin. *J. agric. Res*, 39, 579-621.
- Miller, T., y Schroth, M. (1972). Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 62, 1175-1182.
- Miñaro, M., de la Fuente, E. D., y Noguero, M. D. B. (2011). *Guía ilustrada de las enfermedades, las plagas y la fauna beneficiosa del cultivo del manzano*: Serida.
- Mizukubo, T. (2003). Influencia de las condiciones edáficas, densidad de esporas y edad de los nematodos sobre la adherencia de *Pasteuria penetrans* a *Meloidogyne incognita*. *Spanish*

Journal of Agricultural Research= Revista de Investigación Agraria, 1(4), 57-63.

- Momol, M., Norelli, J., Piccioni, D., Momol, E., Gustafson, H., Cummins, J., y Aldwinckle, H. (1998). Internal movement of *Erwinia amylovora* through symptomless apple scion tissues into the rootstock. *Plant Disease, 82(6), 646-650.*
- Momol, M. T., y Aldwinckle, H. S. (2000). Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. *Fire Blight. The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora ed. Vanneste, JL, 55-72.*
- Montesinos, C. (2005). Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology, 95(12), 1430-1437.*
- Morales, A. d. R. M. (2008). Universidad san carlos de guatemala facultad de ciencias químicas y farmacia.
- Nagy Tóth, E., Bubán, T., Hevesi, M., Orosz-Kovács, Z., y Szabó, L. (1999). *Morphological characteristics of the nectary and composition of nectar in flowers of selected apple cultivars.* Paper presented at the Eucarpia symposium on Fruit Breeding and Genetics 538.
- Ordax Ibáñez, M. (2008). *Supervivencia de Erwinia amylovora en condiciones de estrés: influencia de la presencia de cobre y la limitación de nutrientes.* Universitat Politècnica de València.
- Orosz-Kovács, Z. (1989). *Nectary structure and nectar production of apple varieties.* Paper presented at the Proc. Vth Symposium of the Hungarian Plant Anatomy, Szeged.
- Osorio, N. (2012). pH del suelo y disponibilidad de nutrientes. *Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal, 1(4), 1-4.*
- Parr, J. y Higa, T. (2013). Microorganismos Benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenibles. *Maryland (USA): Centro internacional de Investigación de Agricultura Natural, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 13(2), 128-135.*
- Paulin, J. (1980). *Overwintering of Erwinia amylovora: sources of inoculum in spring.* Paper presented at the II Symposium on Fire Blight 117.
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., . . . Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 11(2), 155-164.*
- Perdomo, J. A., Rodríguez, E. A., y Navascués, B. A. (2020). La importancia de la humedad del suelo: el proyecto ELDAS. *Acta de las Jornadas Científicas de la Asociación Meteorológica Española(28).*
- Pereyra, J. G., Martínez, G. N. A., De los Santos Villalobos, S., Maria, A., Montelongo, G., Alejandro-Iturbide, G., y Graciano, R. B. R. (2020). Biological Control of *Erwinia Amylovora* in Apple Trees Employing Antibacterial Agents.
- Perotti, E., Menéndez, L., Gaia, O., y Pidello, A. (2005). Supervivencia de *Pseudomonas fluorescens* en suelos con diferente contenido de materia orgánica. *Revista argentina de microbiología, 37(2), 102-105.*
- Piqué, N., Miñana-Galbis, D., Merino, S., y Tomás, J. M. (2015). Virulence factors of *Erwinia amylovora*: a review. *International journal of molecular sciences, 16(6), 12836-12854.*
- Preston, A. (1955). Apple rootstock studies: *Malling-Merton* rootstocks. *Journal of horticultural science, 30(1), 25-33.*

- Pusey, P. (2000). The role of water in epiphytic colonization and infection of pomaceous flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 90(12), 1352-1357.
- Pusey, P. (2001). *Interrelationship of temperature, flower development and biological control of fire blight*. Paper presented at the IX International Workshop on Fire Blight 590.
- Pusey, P. L., Rudell, D. R., Curry, E. A., y Mattheis, J. P. (2008). Characterization of stigma exudates in aqueous extracts from apple and pear flowers. *HortScience*, 43(5), 1471-1478.
- Raymundo, A., y Ries, S. (1980). Motility of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 70(11), 1062-1065.
- Revelo, J., Mora, E., Gallegos, P., y Garcés, S. (2008). Enfermedades, nematodos e insectos plaga del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.): Una guía para su identificación en el campo.
- Reyes, I. y Peña, H. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*, 32(8), 560-565.
- Rhoades, J. (1982). In *Methods of Soil Analysis, Part 2*. (AL Page. Miller and DR Keeney, Eds.), American Society of Agronomy. *Madison, USA*.
- Richardson, A. E., Barea, J.-M., McNeill, A. M., y Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms: Springer.
- Rivera, E., Sánchez, M., y Domínguez, H. (2018). pH como factor de crecimiento en plantas. *Revista de iniciación científica*, 4, 101-105.
- Robert, R. (1929). Life history of the fire blight pathogen, *Bacillus amylovorus*, as related to the means of over wintering and dissemination.
- Roberto, J. y González, C. (2004). Comparación de tres métodos de determinación de conductividad hidráulica en dos suelos. *Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 45p.*
- Robinson, T., Aldwinckle, H., Fazio, G., y Holleran, T. (2002). *The Geneva series of apple rootstocks from Cornell: performance, disease resistance, and commercialization*. Paper presented at the XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts 622.
- Rojas, V. (2009). Guía para la descripción de suelos: FAO, Roma (Italia).
- Rosen, H. R. (1936). Mode of penetration and of progressive invasion of *fire-blight* bacteria into apple and pear blossoms.
- Rucks, L., García, F., Kaplán, A., Ponce de León, J., y Hill, M. (2004). Propiedades físicas del suelo. *Universidad de la República: Facultad de agronomía. Montevideo, Uruguay.*
- Santander, R. D., y Biosca, E. G. (2017). *Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low environmental temperatures. *PeerJ*, 5, e3931.
- Santander, R. D., Català-Senent, J. F., Figàs-Segura, À., y Biosca, E. G. (2020). From the roots to the stem: unveiling pear root colonization and infection pathways by *Erwinia amylovora*. *FEMS microbiology ecology*, 96(12), fiae210.

- Schroth, M., Thomson, S., Hildebrand, D., y Moller, W. (1974). Epidemiology and control of fire blight. *Annual Review of Phytopathology*, 12(1), 389-412.
- Serrano, J. M., Peça, J. O., da Silva, J. R. M., y Shaidian, S. (2010). Mapping soil and pasture variability with an electromagnetic induction sensor. *Computers and electronics in agriculture*, 73(1), 7-16.
- Sharma, S. y Mishra, A. (2010). Influence of forest tree species on reclamation of semiarid sodic soils. *Soil Use and Management*, 26(4), 445-454.
- Sheila, M. (1993). *Manual de análisis de suelos y tejido vegetal: una guía teórica y práctica de metodologías*: Ciat.
- Silva, A. (1998). La materia orgánica del suelo. *Montevideo: Facultad de Agronomía*. 34p.
- Smith, E. F. (1905). *Bacteria in relation to plant diseases* (Vol. 1): Carnegie institution of Washington.
- Sobiczewski. (2013). *Survival of Erwinia amylovora in dead apple leaf tissue*. Paper presented at the XIII International Workshop on Fire Blight 1056.
- Sommers, L. y Nelson, D. (1983). Total carbon, organic carbon, and organic matter. *Methods of soil analysis: Part 2 chemical and microbiological properties*, 9, 539-579.
- Spinelli, F., Ciampolini, F., Cresti, M., Geider, K., y Costa, G. (2005). Influence of stigmatic morphology on flower colonization by *Erwinia amylovora* and *Pantoea agglomerans*. *European journal of plant pathology*, 113(4), 395-405.
- Steiner, P. W. (2000). *The biology and epidemiology of fire blight*. West Virginia University, Morgantown, WV, USA.
- Stuart. (1978). Ecology of *Phymatotrichum omnivorum*. *Annual Review of Phytopathology*, 16(1), 193-209. Taubenhous, J. J., Dana, B. F., y Wolff, S. E. (1929). Plants Susceptible or Resistant to Cotton Root Rot and Their Relation to Control. *Texas FARMER Collection*.
- Taubenhous, J. y Dana, B. (1929). Plants Susceptible or Resistant to Cotton Root Rot and Their Relation to Control. *Texas FARMER Collection*.
- Taylor, R., Guilford, P., Clark, R., Hale, C., y Forster, R. (2001). Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29(1), 35-43.
- Temporal, F.-A. U. (2002). Capacitación en agricultura alternativa para beneficio de la producción, agroindustrialización y comercialización del cultivo del plátano bajo sistemas agroforestales a productores de los municipios de Puerto Guzmán y Villagarzón en el departamento del Putumayo: proceso productivo del plátano: Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria-PRONATTA.
- Terrón, J., Da Silva, J. M., Moral, F., y García-Ferrer, A. (2011). Soil apparent electrical conductivity and geographically weighted regression for mapping soil. *Precision Agriculture*, 12(5), 750-761.
- Thomson, S. (1986). The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology*, 76(5), 476-482.

- Thomson, S. V. (2000). Epidemiology of fire blight. *Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. CAVI Publishing, Wallingford UK, 9-37.
- Thomson, S. y Ockey, S. (2004). *Influence of rain on the transient populations of Erwinia amylovora on leaf surfaces*. Paper presented at the X International Workshop on Fire Blight 704.
- Trillo, N. y Fernandez, R. (2005). La textura del suelo como fuente de heterogeneidad; sus efectos sobre la oferta de agua para las plantas. *La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas. Un homenaje a Rolando JC León (Oesterheld M., Aguiar MR, Ghersa C., Paruelo JM, comp)*. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Ulloa Guitián, M., Abreu, C. A., y Paz González, A. (2001). Disponibilidad de macro-y micronutrientes en un suelo de cultivo de Mabegondo (A Coruña).
- Van der Zwet. (2012). *Fire blight: history, biology, and management*: Am Phytopath Society.
- Van der Zwet, T. (1995). *Present worldwide distribution of fire blight*. Paper presented at the VII International Workshop on Fire Blight 411.
- Vanneste, J. L. (2000a). *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*: CABI.
- Vanneste, J. L. (2000b). What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? *Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, 1-6.
- Vanneste, J. (2000). Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. *Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, 73-83.
- Velasco, R. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus× domestica* Borkh.). *Nature genetics*, 42(10), 833-839.
- Venegas, P. (2010). La materia orgánica del suelo. Papel de los microorganismos. *Ciencias ambientales*, 11.
- Weil, B. (1999). *The Nature and Properties of Soils.*, 12th edn.(Prentice-Hall: Upper Saddle River, NJ.).
- Weißhaupt, S., Köhl, L., Kunz, S., Hinze, M., Ernst, M., Schmid, A., y Voegelé, R. T. (2016). Alternative inoculum sources for fire blight: the potential role of fruit mummies and non-host plants. *Plant pathology*, 65(3), 470-483.
- Westover, K. M., Kennedy, A. C., y Kelley, S. E. (1997). Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *Journal of ecology*, 863-873.
- Wilson, M., Epton, H. y Sigeo, D. (1989a). *Erwinia amylovora* infection of hawthorn blossom. 2. The stigma. *Journal of Phytopathology (Germany, FR)*.
- Wilson, M., Sigeo, D. y Epton, H. (1989b). *Erwinia amylovora* infection of hawthorn blossom: I. The anther. *Journal of Phytopathology*, 127(1), 1-14.
- Wilson, M., Epton, H., y Sigeo, D. (1989). *Erwinia amylovora* infection of hawthorn blossom. 2. The stigma. *Journal of Phytopathology (Germany, FR)*.
- Wilson, M., Sigeo, D., y Epton, H. (1990). *Erwinia amylovora* Infection of Hawthorn Blossom: III. The Nectary. *Journal of Phytopathology*, 128(1), 62-74.