

Manejo de *Erwinia amylovora* con Aceite Esencial de Orégano (*Lippia berlandieri*) y Estudio de Resistencia a Estreptomicina en Árboles de Manzano cv. 'Golden Delicious'

Management of *Erwinia amylovora* with Oregano (*Lippia berlandieri*) Essential Oil and Resistance Study to Streptomycin on Apple Trees cv. 'Golden Delicious'

Alejandro Romo Chacón, David I. Berlanga Reyes, Víctor M. Guerrero Prieto, Roberto Martínez Campos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Cuauhtémoc, Av. Río Conchos s/n, Parque Industrial, Cuauhtémoc, Chihuahua, CP 31570, México; Sergio Romero Gómez, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Delicias, Av. Cuarta Sur, Número 3820, Fraccionamiento Vencedores del Desierto, Delicias, Chihuahua, CP 33089, México, y Manuel Rafael Ramírez Legarreta, INIFAP, Campo Experimental Sierra de Chihuahua, Hidalgo 1213, Zona Centro, Cuauhtémoc, Chihuahua, CP 31500, México. Correspondencia: archacon13@ciad.mx

(Recibido: Mayo 06, 2011 Aceptado: Agosto 08, 2011)

Romo CA, Berlanga RDI, Guerrero PVM, Martínez CR, Romero GS y Ramírez LMR. 2011. Manejo de *Erwinia amylovora* con aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) y estudio de resistencia a estreptomicina en árboles de manzano cv. 'Golden Delicious'. Revista Mexicana de Fitopatología 29:119-132.

Resumen. El tizón de fuego causado por *Erwinia amylovora* (*Ea*), es una de las enfermedades más severas del manzano, debido a que origina la muerte de yemas florales y en ocasiones del árbol completo. Un método para su manejo es el uso de antibióticos. Sin embargo, el uso inapropiado de éstos puede inducir resistencia en las bacterias. En este trabajo se evaluó el aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) (carvacrol 80%) durante los años 2005 y 2006, como una alternativa orgánica para el manejo de *Ea*. La concentración mínima bactericida (CMB) encontrada *in vitro* fue de 0.055 a 0.073% (p/v). Se evaluó una concentración de 0.11% (p/v) en campo y se determinó su efecto en la reducción del daño ocasionado por *Ea*; estos resultados se compararon con los obtenidos con Agry-Mycin 100^{MR}, Cuprimicin 100^{MR} y Agry-Gent Plus 800^{MR}. Durante ambos años, los tratamientos no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo. El momento de la aplicación se basó en la detección de poblaciones epifíticas mediante la impresión de estigmas en medio semi-selectivo, temperatura y humedad con valores de 5%, 16.7°C y 78%, respectivamente para 2005. Por otra parte en el ciclo 2006 estos mismos parámetros fueron de 96%, 15.2°C y 70%, respectivamente. La identificación y resistencia de *Ea* a estreptomicina, se determinó utilizando medios semi-selectivos, los resultados fueron confirmados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se detectó y aisló una cepa de *Ea* resistente a estreptomicina. Éste es el

Abstract. Fire blight, one of the most severe diseases on apples is caused by *Erwinia amylovora* (*Ea*), it provokes the death of flower buds and sometimes the whole tree. Antibiotic use is one of the methods employed to manage *Ea*, however, inappropriate use can lead to bacteria resistance. During 2005 and 2006, oregano (*Lippia berlandieri*) essential oil (80% carvacrol) was evaluated as an organic alternative to manage *Ea*. *In vitro* bactericidal minimum concentration (BMC) was 0.055 to 0.073% (w/v). A concentration of 0.11% was assessed in field and its effect on reducing the damage caused by *Ea* was determined. Results were compared against Agry-Mycin 100^{MR}, Cuprimicin 100^{MR} and Agry-Gent Plus 800^{MR}. During both years, treatments were not statistically different with respect to the control. Time of field applications was determined by detection of *Ea* epiphytic populations grown in semi-selective media, temperature and humidity, with values of 5%, 16.7°C and 78% respectively for 2005, and 96%, 15.2 y 70% for 2006. Identification of *Ea* and its resistance to streptomycin was performed by growing the bacteria in semi-selective media and results were confirmed by PCR. An *Ea* strain resistant to streptomycin was detected and isolated. This is the first report of an *Ea* strain resistant to streptomycin and confirmed by molecular techniques in the most important apple area in the state of Chihuahua, Mexico.

Additional keywords: Fire blight, epiphytic population, antibiotic, resistance, PCR.

The pathogen *Erwinia amylovora* (*Ea*), causal agent of the late blight fire in the state of Chihuahua, the main apple producing area in Mexico (SIAP, 2006), as well as in other countries where apple species (*Malus sylvestris* var.

primer reporte mediante técnicas moleculares de una cepa de *Ea* resistente a estreptomycin en la zona manzanera de Chihuahua, México.

Palabras clave adicionales: Tizón de fuego, población epifítica, antibióticos, resistencia, PCR.

En el estado de Chihuahua, principal zona productora de manzana en México (SIAP, 2006), al igual que en otros países del mundo donde se cultivan especies como el manzano (*Malus sylvestris* var. *domestica*) el patógeno *Erwinia amylovora*, agente causal del tizón de fuego, es un grave problema. Los efectos de la enfermedad son devastadores y los árboles infectados pueden llegar a morir (Shtienberg *et al.*, 2003). En la flor, los estigmas son el sitio principal para el desarrollo de altas poblaciones epifíticas; aún en climas secos, donde la infección puede desarrollarse durante periodos ocasionales de alta humedad causados por lluvia o irrigación excesiva. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad es significativamente menor que el porcentaje de flores colonizadas (Bubán *et al.*, 2003; Thomson y Gouk, 2003). Actualmente existen diferentes medios semi-selectivos (Miller y Schroth, 1972; Ishimaru y Klos, 1984; Kritzman *et al.*, 2003) y técnicas de biología molecular para la identificación de *Ea* (Bereswill *et al.*, 1992; Momol *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2001; Llop *et al.*, 2006), así como diferentes modelos de predicción de la enfermedad (Thomson *et al.*, 1982; Bubán *et al.*, 2004). Los avances en la implementación del biocontrol del tizón de fuego han resultado a partir de varios factores, incluyendo el incremento en importancia de la enfermedad, el desarrollo de resistencia a los antibióticos sintéticos y a la demanda social para impulsar la seguridad y sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola (Johnson y Stockwell, 2000). Otras investigaciones han mostrado la posibilidad del uso de compuestos antimicrobianos derivados de plantas, como el carvacrol presente en el aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en cantidades del 60 al 70% (Ultee *et al.*, 2002). Por tal motivo, es necesario encontrar nuevos compuestos para el manejo de *Ea* (Tsiantos *et al.*, 2003). Los objetivos en este estudio fueron evaluar al aceite de orégano como una alternativa orgánica contra *Ea*, comparar su eficiencia en campo con respecto a los antibióticos sintéticos utilizados en la región y determinar la presencia de bacterias resistentes a estreptomycin.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental fue llevado a cabo durante los ciclos 2005 y 2006 en árboles de manzano cultivar 'Golden Delicious' de 28 años de edad, injertados sobre portainjerto franco, con una densidad de plantación de 1000 árboles (5x4 m) y una altura de 6 m en una superficie de 2 ha. Las líneas de plantación están orientadas en una dirección de norte a sur. La localización del huerto es la 'Quinta Lupita' en el municipio de Cuauhtémoc, Chih., ubicado a LN 28° 26' 39" y 106 53' 15" de LO.

Fenología de floración. Se evaluaron tres árboles en los cuales se marcaron cuatro ramas, cada una con un mínimo de 100 racimos florales, evaluando doce

domestica) are cultivated, is a severe problem. The effects derived from such disease are rather devastating; infected trees can even die (Shtienberg *et al.*, 2003). The stigmas in the flower are the main site for high *Ea* epiphytic population development, even in dry climates where the infection may develop during high humidity occasional periods, caused by rain or excessive irrigation. Nevertheless, the disease incidence is significantly lower than the percentage of colonized flowers (Bubán *et al.*, 2003; Thomson and Gouk, 2003). Currently, there are several semi-selective medium (Miller and Schroth, 1972; Ishimaru and Klos, 1984; Kritzman *et al.*, 2003) and molecular biology techniques for *Ea* identification (Bereswill *et al.*, 1992; Momol *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2001; Llop *et al.*, 2006), as well as predictive models of such disease (Thomson *et al.*, 1982; Bubán *et al.*, 2004). Progress in implementing the fire blight bio-control have resulted from several factors, including an increase on disease prevalence, development of synthetic antibiotics resistance and a social demand to boost security and sustainability of agricultural production systems (Johnson and Stockwell, 2000). Other research has shown the possibility of using plant-derived antimicrobial compounds, such as carvacrol, present in oregano essential oil (*Lippia berlandieri*) in quantities ranging from 60 to 70% (Ultee *et al.*, 2002). Thus, it turns necessary to find new compounds for *Ea* management (Tsiantos *et al.*, 2003). The present study is aimed to evaluate oregano oil as an organic alternative to *Ea*, to compare its efficiency in regards to synthetic antibiotics used in the region, as well as to determine the presence of streptomycin resistant bacteria.

MATERIALS AND METHODS

The experimental work was carried out during the 2005 and 2006 on 28 years old 'Golden Delicious' apple tree cultivar, grafted on root-stock frank in a 2 ha area with a planting density of 1000 trees (5x4) and a 6 m height. The planting lines were oriented in a north to south direction; the garden location is in the LN 28° 26' 39" and 106 53' 15" of LW, at the 'Quinta Lupita' of the municipality of Cuauhtémoc, Chihuahua.

Flowering phenology. A total of four branches were marked from the three trees that were evaluated, each with a minimum of 100 flower clusters, having twelve repetitions evaluated in order to determine the sprouted buds percentage in the full bloom stage; the readings were performed at a three days interval from March 23rd to April 18th, and from the 7th to the 28th of April during the 2005 and 2006, respectively (Guerrero *et al.*, 2006).

Epiphytic populations of *Erwinia amylovora* (*Ea*). The determination of *Ea* epiphytic population in flowers was carried out for two years in the test group by printing CCT culture medium stigmas (Ishimaru and Klos, 1984), with a three days interval for six and eight dates, in 2005 and 2006, respectively. The age of the flowers under evaluation was between one and four days (Thomson and Gouk, 2003), preferentially selecting each flower cluster floral king for a total of 108 flowers per date; the flowers were emasculated by printing only the stigmata (Thomson, 1992). The boxes with the CCT culture medium were gridded for nine pages

repeticiones para determinar el porcentaje de yemas brotadas en el estadio plena floración, las lecturas se realizaron a un intervalo de tres días a partir del 23 de marzo al 18 de abril y del 7 al 28 de abril, para los años 2005 y 2006, respectivamente (Guerrero *et al.*, 2006).

Poblaciones epifíticas de *Erwinia amylovora* (Ea).

La determinación de las poblaciones epifíticas de *Ea* en flores, se realizó durante dos ciclos en el lote experimental mediante la impresión de estigmas en medio de cultivo CCT (Ishimaru y Klos, 1984), con un intervalo de tres días durante seis y ocho fechas en 2005 y 2006, respectivamente. La edad de las flores evaluadas fue entre uno y cuatro días (Thomson y Gouk, 2003), seleccionando preferentemente la flor rey de cada racimo floral para un total de 108 flores por fecha, las flores fueron emasculadas realizando la impresión únicamente con los estigmas (Thomson, 1992). Las cajas con el medio CCT fueron cuadriculadas para realizar nueve impresiones por caja, las cuales se incubaron por 24 h a una temperatura de $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente se realizaron observaciones con el objetivo 2X de un estereoscopio y se determinó el porcentaje de bacterias correspondientes a *Ea*, de acuerdo a las características morfológicas de la colonia (Manulis *et al.*, 1998).

Unidades térmicas. Estas fueron determinadas como escala de tiempo para el período de plena floración, mediante la siguiente fórmula: $UT/\text{por día} = [(T_{\text{max}} + T_{\text{min}})/2] - T_b$, donde UT son las unidades térmicas, T_{max} es la temperatura máxima diaria; T_{min} es la temperatura mínima diaria y T_b es la temperatura base, la cual para manzano de acuerdo a Anstey (1965), es de 7°C . El conteo de las UT para este estudio se realizó a partir del ocho de abril en ambos ciclos.

Pruebas de sensibilidad a estreptomicina. Para estas pruebas se utilizó el medio semiselectivo Miller y Schroth (1972) y 100 colonias de *Ea* obtenidas durante la impresión de estigmas, las cuales se suspendieron en agua peptonada (8.5 g L^{-1} de NaCl y 1 g L^{-1} de peptona) mediante un vortex, hasta obtener una concentración de 1×10^7 UFC mL^{-1} . Posteriormente se inocularon y sembraron por extensión $100\text{ }\mu\text{L}$ de la suspensión en cajas Petri con medio sólido Miller y Schroth, mezclado con estreptomicina a una concentración de $100\text{ }\mu\text{L L}^{-1}$ respectivamente. También se hicieron inoculaciones en el medio de cultivo sin antibiótico como testigo positivo. Los resultados fueron evaluados después de 48h de incubación a 29°C . La prueba se realizó por triplicado.

Identificación de *Erwinia amylovora* por PCR. La identidad de las cepas aisladas en el medio de cultivo CCT se confirmó por medio de PCR. Por medio de esta técnica se detectó y amplificó una secuencia de nucleótidos exclusiva del plásmido pEA29. Este plásmido no es transmisible a otra especie y es común a todas las cepas de *Ea* encontradas hasta la fecha. Cada reacción de $20\text{ }\mu\text{L}$ contenía: buffer de reacción $2\text{ }\mu\text{L}$, MgCl₂ 50 mM , dNTPS 10 mM ; $10\text{ pmol }\mu\text{L}^{-1}$ de cada iniciador; $1\text{ }\mu\text{L}$ del DNA de la muestra, y $5\text{ U}\mu\text{L}^{-1}$ de Taq polimerasa. Se usaron los iniciadores pEA29A (CGGTTT TTTA ACGCTGGG) y pEA29B (GGGCAAATACTCGGATT) (Bereswill *et al.*, 1992). Se emplearon las siguientes condiciones de reacción:

per box, which were incubated for 24 h at $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Observations were made afterwards with a 2X objective stereoscope, and the *Ea* bacteria percentage was also determined in accordance to the colony morphological characteristics (Manulis *et al.*, 1998).

Thermal units. These were determined as the timescale for the period of full bloom throughout the following formula: $TU/\text{per day} = [(T_{\text{max}} + T_{\text{min}})/2] - T_b$, where TU are the thermal units; T_{max} is the daily maximum temperature; T_{min} is the daily minimum temperature and T_b is the base temperature, which is 7°C for apple, according to Anstey (1965). The TU counting for the study hereby was performed starting April 8th in both years.

Streptomycin susceptibility testing. The Miller and Schroth (1972) semi-selective medium was used for these tests, as well as 100 *Ea* colonies obtained during the stigmata printing, which were suspended in peptone water (8.5 g L^{-1} NaCl and $1\text{ g peptone L}^{-1}$), using a vortex to a $1 \times 10^7\text{ mL}^{-1}$ CFU concentration. Subsequently, a total of $100\text{ }\mu\text{L}$ from the suspension were inoculated and planted in Petri dishes with a Miller and Schroth solid medium, mixed with streptomycin at a $100\text{ }\mu\text{L L}^{-1}$ concentration, respectively. The inoculations were also made in the culture medium without an antibiotic as a positive control. The results were evaluated after a 48 h incubation period at 29°C . The test was performed in triplicate.

Identification of *Erwinia amylovora* by PCR. The identity of the isolated strains in the CCT culture medium was confirmed by PCR. A nucleotide sequence, exclusive of the pEA29 plasmid, was detected and amplified by this technique. This plasmid is not transmissible to other species and it is common to all *Ea* strains found to date. Each $20\text{ }\mu\text{L}$ reaction contained a $2\text{ }\mu\text{L}$, MgCl₂ 50 mM , dNTPS 10 mM buffer reaction; $10\text{ pmol }\mu\text{L}^{-1}$ of each primer; $1\text{ }\mu\text{L}$ of DNA sample and $5\text{ U }\mu\text{L}^{-1}$ of Taq polymerase. The primers pEA29A (CGGTTT TTTA ACGCTGGG) and pEA29B (GGGCAAATACTCGGATT) were used (Bereswill *et al.*, 1992). The reaction conditions used were as follows: denaturation at 93°C for 5 min, followed by 40 cycles of 93°C for 30 sec, 52°C or 30 sec , and a final extension time of 10 min at 72°C . The PCR products were separated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel; the DNA staining was performed with ethidium bromide. The expected amplified fragment size was 900 base pairs (Bereswill *et al.*, 1992), despite of the fact that base pair variations ranging from 900 to 1100 have been previously reported (Lecomte *et al.*, 1997).

Streptomycin resistance testing by PCR. The resistance of strains isolated as positive in the Miller and Schroth (1972) medium was confirmed throughout streptomycin gene resistance amplification present in the TN5393 transposon. Pairs of specific primers were used for the Stra5 (GGTTGCCTGTCAGAGGCGG) and Stra3 (GTCAGAGGGTCCAATCGC) streptomycin phosphorylates genes with a 58°C T_m and a 750 pb expected amplification fragment. The transposon presence was detected by means of transposase amplification using the TN5393-5 (CGGCAAGATGCTCGTGCCGTG) and TN5393-3 (AGTCAGAATGCGATTACCC) specific

desnaturalización a 93°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 93°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, y un tiempo de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos del PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y la tinción del DNA se realizó con bromuro de etidio. El tamaño del fragmento amplificado esperado fue de 900 pares de bases (Bereswill *et al.*, 1992); aunque se han reportado variaciones que van de 900 a 1100 pares de bases (Lecomte *et al.*, 1997).

Pruebas de resistencia a estreptomycin por PCR.

La resistencia de cepas aisladas como positivas en el medio Miller y Schroth (1972), fue confirmada por medio de la amplificación de genes de resistencia a estreptomycin presentes en el transposón TN5393. Se usaron parejas de iniciadores específicos para los genes de la estreptomycin fosforilasa *Stra5* (GGTGCCTGTCAGAGGCGG) y *Stra3* (GTCAGAGGGTCCAATCGC) con una T_m de 58°C y un fragmento de amplificación esperado de 750 pb. La presencia del transposon se detectó por medio de la amplificación de la transposasa usando los iniciadores específicos TN5393-5 (CGGCAAGATGCTCGTGCCGTG) y TN5393-3 (AGTCAGATGCGATTCAAC) con una T_m de 57°C y un fragmento de amplificación esperado de 2298 pb. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización 2 min a 94°C seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, y 72°C por 2 min y 30 seg, finalmente un tiempo de extensión de 72°C por 15 min. Los productos fueron separados por electroforesis.

Determinación *in vitro* de la concentración mínima bactericida (CMB). El aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) con un contenido de 80% de carvacrol usado en este trabajo fue proporcionado por Agroindustrial Don Pablo Licón (www.agrodonpablo.com). La actividad antibacteriana se determinó usando diluciones del aceite esencial en agar o caldo, utilizando diferentes emulsificantes para su incorporación al medio de acuerdo a Burt (2004). Como testigo se utilizó una cepa local de *Ea* aislada previamente. Para la preparación del preinóculo se colocó una concentración de *Ea* de 1×10^7 UFC mL⁻¹ en un matraz Erlemmeyer con 250 mL de caldo Luria-Bertani (LB). El matraz se mantuvo en agitación constante a 165 rpm y a una temperatura de 29± °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo de adaptación se contabilizó la población existente usando una cámara de Neubauer y éste resultado se utilizó para calcular el inóculo final. Se colocaron 100 µL de la suspensión 1×10^7 UFC mL⁻¹ en los matraces con 250 mL de LB. Transcurrida 1 h se añadieron diferentes porcentajes del aceite esencial de orégano: 0.027, 0.036, 0.045, 0.055, 0.064 y 0.073% (p/v), utilizando como emulsificante un detergente líquido comercial al 0.2% (v/v), posteriormente se colocaron bajo las mismas condiciones de crecimiento que el preinóculo. La viabilidad de las bacterias se determinó por conteo en placa, para lo cual se utilizó 1 mL de muestra y se diluyó con agua peptonada. Las diluciones seriales fueron puestas en medio de cultivo CCT e incubadas por 24 h a una temperatura de 28°C. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Tratamientos en campo. Los tratamientos

primers, with a 57°C T_m , plus a 2298 pb expected amplification fragment. The amplification conditions were: denaturation for 2 min at 94°C followed by 30 cycles of 30 sec cycles at 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, and 72°C for 2 min and 30 sec, followed by a final extension period at 72°C for 15 min. The products were separated by electrophoresis.

Determination *in vitro* of the minimal bactericidal concentration (MBC). The oregano essential oil (*Lippia berlandieri*) with an 80% carvacrol content used in this experiment was provided by Agroindustrial Don Pablo Licon (www.agrodonpablo.com). The antibacterial activity was determined using essential oil dilutions in agar or broth by means of different emulsifiers for incorporation into the medium, in accordance to Burt (2004). A previously isolated local *Ea* strain was used as a control. An *Ea* concentration of 1×10^7 CFU mL⁻¹ were placed for the preinoculum preparation in an Erlemmeyer flask with 250 mL Luria-Bertini broth (LB). The flask was kept under constant agitation at 165 rpm and at a temperature of 29±1°C for 48 h. Time was conducted afterwards for the existing population throughout a Neubauer chamber, having this result used to have the final inoculums calculated, thus. A total of 100 µL from the 1×10^7 CFU mL⁻¹ suspensions were placed in the flasks with an Luria-Bertani of 250 mL. Different oregano essential oils percentages were added after 1 h: 0.027, 0.036, 0.045, 0.055, 0.064 and 0.073% (p/v), using commercial liquid detergent as emulsifier at 0.2% (v/v); they were placed under the same growth conditions than the pre-inoculums, afterwards. The bacteria viability was determined by plate count, for which a 1 mL sample was used and diluted with peptone water. Serial dilutions were placed in the CCT culture medium and incubated for 24 h at 28°C. All tests were performed in triplicate.

Field treatments. Treatments consisted on the spraying of antibiotics used in the region, whose active ingredients are: Streptomycin, gentamicin and oxytetracycline, as well as a spraying witness of water only; a 0.11% (p/v) oregano essential oil was applied as an alternative treatment. This percentage was based on results obtained *in vitro*, and the report of Burt (2004).

Spraying time and treatment evaluations. The application was performed according to the model medium temperature prediction lines (MTL) as proposed by Thomson *et al.* (1982), modified by Bubán *et al.* (2004), as well as the positive printing percentage of semi-selective stigmata average. The first model is based on the temperature ratio and the pathogen occurrence in flowers, indicating that the pathogen could not be detected in the flowers when the average daily temperature was below 15.6°C. However, this method was also improved throughout studies performed in Hungary by Bubán *et al.* (2004) considering humidity events. The following conditions were reported by these authors: Infection occurrence (Denoted by I), when the average mean temperature is above the prediction line and there is also a humidity event (>1 mm of rain, or >1 hour of dew) during the same day or the day before. High infection risk (H), when the mean average temperature is above the prediction line, without a humidity event. Moderate infection risk (M),

consistieron en la aspersión de los antibióticos utilizados en la región cuyos ingredientes activos son: Estreptomycin, gentamicina y oxitetraciclina, un testigo asperjando solamente agua y como tratamiento alternativo se aplicó 0.11% (p/v) del aceite esencial de orégano. Éste porcentaje se basó en los resultados obtenidos *in vitro* y a lo reportado por Burt (2004).

Tiempo de aspersión y evaluación de tratamientos. La aplicación se realizó de acuerdo al modelo línea de predicción de temperaturas medias (LTM) propuesto por Thomson *et al.* (1982), modificado por Bubán *et al.* (2004) y al porcentaje de impresiones positivas de estigmas en medios semiselectivos.

El primer modelo está basado en la relación de las temperaturas y la ocurrencia del patógeno en las flores, indicando que el patógeno podría no ser detectado en las flores cuando la temperatura media diaria estuviera por debajo de los 15.6°C. Sin embargo, estudios realizados en Hungría por Bubán *et al.* (2004) mejoraron este método considerando también eventos de humedad. Estos autores reportaron las siguientes condiciones:

Ocurrencia de la infección (Denotado por I), cuando el promedio de las temperaturas medias se encuentra por arriba de la línea de predicción y además existe un evento de humedad (>1 mm de lluvia, ó >1 h de rocío) durante el mismo día o un día antes. Riesgo de infección alto (H), cuando el promedio de las temperaturas medias se encuentra por arriba de la línea de predicción, sin un evento de humedad. Riesgo de infección moderado (M), cuando el promedio de las temperaturas medias es > 15°C pero < a 15.6°C. Las aspersiones se efectuaron con una mochila motorizada, utilizando 3 L de la solución por árbol cuando las temperaturas no excedieran los 15°C. Cada tratamiento fue aplicado a cinco árboles por bloque.

El daño ocasionado por *Ea* se determinó contabilizando el total de racimos florales después de 30 días de efectuados los tratamientos, considerando el árbol completo para la evaluación. La eficiencia de los tratamientos fue determinada de acuerdo a Beer (1978), con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = [(DI_{ck} - DI_{tr}) / DI_{ck}] * 100$$

Donde: DI_{ck} es la media de la incidencia de la enfermedad con la aplicación del tratamiento testigo (agua) y DI_{tr} es la media de la incidencia de la enfermedad de la aplicación en los diferentes tratamientos. El registro de las condiciones climatológicas fue proporcionado por la Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua (UNIFRUT 2005 y 2006), considerando la estación meteorológica más cercana al lote experimental.

Análisis estadístico. Para analizar los datos obtenidos en la aplicación de los tratamientos en campo se empleó un diseño en bloques completamente al azar con una unidad experimental de cinco árboles. Los análisis se realizaron mediante el paquete SAS (2003), una vez que se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con $F < 0.05$, se hicieron comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

when the mean average temperature is > 15°C, but < to 15.6°C. Each treatment was applied to five trees per block. The *Ea* damage caused was determined by counting the total number of flower clusters after 30 days of treatment, considering the entire tree for evaluation. The treatment efficiency was determined according to Beer (1978), with the following formula: Efficiency = $[(DI_{ck} - DI_{tr}) / DI_{ck}] * 100$ Where: DI_{ck} is the disease incidence average with the witness treatment application (water), and DI_{tr} is the disease incidence average for its application in the different treatments. The record of climatic conditions was provided by the Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua, A.C. (UNIFRUT), considering the weather station closest to the test group.

Statistical analysis. A design of a randomized complete block with an experimental unit of five trees was used to analyze the data obtained from field treatment applications. Analyses were performed using an SAS package (2003), once the analysis of variance (ANOVA) was performed with a $F < 0.05$, means comparisons were performed throughout the Tukey test ($P < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Flowering phenology. The flowering period for 2005 was more compact when compared with the 2006 (Figure 1); this is due to the greater accumulation of cold units (CU), with 979 and 613, respectively (UNIFRUT, 2005; 2006). According to Hauagge and Cummins (1991), the requirements to break the apical dormancy in the 'Golden Delicious' apple tree was higher than 100 CU. Likewise, it has been reported by Llamas *et al.* (2002), that the low chilling accumulation is reflected in a small, late and irregular bud. Consequently, the extended flowering period during 2006 hindered *Ea* handling, because there were new flowers everyday and they are more susceptible to tissue infection, and since there are no systemic bactericides, the flowers opening after treatment application were not protected (Kritzman *et al.*, 2003; Shtienberg *et al.*, 2003).

Epiphytic population percentage of *Erwinia amylovora*. A lower *Ea* colonized flower incidence is revealed by the results obtained in the stigmata printing during 2005, with 5, 5 and 17% values, as 112, 189 and 212 TU became accumulated, respectively (Figure 2). According to the prediction method proposed by Bubán *et al.* (2004), the highest risk of infection was revealed when 189 TU were accumulated, due to the fact that the average temperatures were above the threshold with 16.7°C (Figure 2), plus being the only date with rain presence (0.60 mm), having a registered humidity of 78% (UNIFRUT, 2005), whereas 112 TU became accumulated, the risk of infection was moderate (M). The low *Ea* epiphytic population percentage in 2005 might be due to the low temperatures recorded during evaluation (Figure 2). Previously reported studies performed by Bubán *et al.* (2004), attributed the *Ea* absence in four out of five sampled orchards to a cold period prior flowering. A higher *Ea* epiphytic populations percentage was registered by the incidence of *Ea* colonized flowers in 2006, though, probably due to higher temperature levels and a lower CU accumulation (163) (UNIFRUT),

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenología de floración. El período de floración durante el año 2005 fue más compacto comparado con el ciclo 2006 (Figura 1), esto debido a la mayor acumulación de unidades frío (UF) con 979 y 613, respectivamente (UNIFRUT, 2005; 2006). De acuerdo a Hauagge y Cummins (1991), los requerimientos para romper la dormancia apical en manzano 'Golden Delicious', fue superior a las 1000 UF. De igual manera Llamas *et al.* (2002), mencionan que la escasa acumulación de frío se ve reflejado en una brotación escasa, tardía e irregular. Razón por la cual, el extenso periodo de floración durante el año 2006 dificulta el manejo de *Ea*, debido a que día a día se abren nuevas flores y son el tejido más susceptible para la infección y al no existir bactericidas sistémicos las flores que abren después de la aplicación no quedan protegidas (Kritzman *et al.*, 2003; Shtienberg *et al.*, 2003).

Porcentaje de poblaciones epifíticas de *Erwinia amylovora*. Los resultados obtenidos en la impresión de estigmas muestran una menor incidencia de flores colonizadas por *Ea* durante el 2005, con valores de 5, 5 y 17% al acumularse 112, 189 y 212 unidades térmicas (UT), respectivamente (Figura 2). De acuerdo al método de predicción propuesto por Bubán *et al.* (2004), el mayor riesgo de infección se presentó al acumularse 189 UT, debido a que las temperaturas promedio estuvieron por encima del umbral con 16.7°C (Figura 2), además de ser la

registrada durante la evaluación, which are conditions favoring the settlement of bacteria added to a longer flowering period (Figure 1). There were no rainfall events in the experimental plot during this year, prevailing a moderate risk of infection in most samples because they were presenting temperatures higher than 15°C (Bubán *et al.*, 2004); nevertheless, due to a producer management who increased moisture for over an hour through irrigation, having the risk of moderate infection (M) modified to a possible infection occurrence (I). Studies by Pusey (2000) reported the disease got started in the flowers only when the humidity and incidence were higher than 77%, even when water applications were followed by an immediate drying period of 52 min. Similarly, it was also reported by Pusey that the host water potential becomes affected by the soil humidity in the orchard, having the bacteria multiplying over stigmas at a lower relative humidity than the existing in the floral rate. As a result, the treatment applications were performed on the 214 TU to present the highest percentage of colonized flowers (96%), and a 70% relative humidity (Figure 2). The establishment of *Ea* epiphytic populations on the stigmas is a critical step for flower infection. A total of four to seven treatment applications, with streptomycin-based products, are regularly held nowadays during bloom in the apple producing region of the state of Chihuahua, depending on weather conditions (temperature, rain or hail).

Streptomycin susceptibility testing. Only one *Ea*

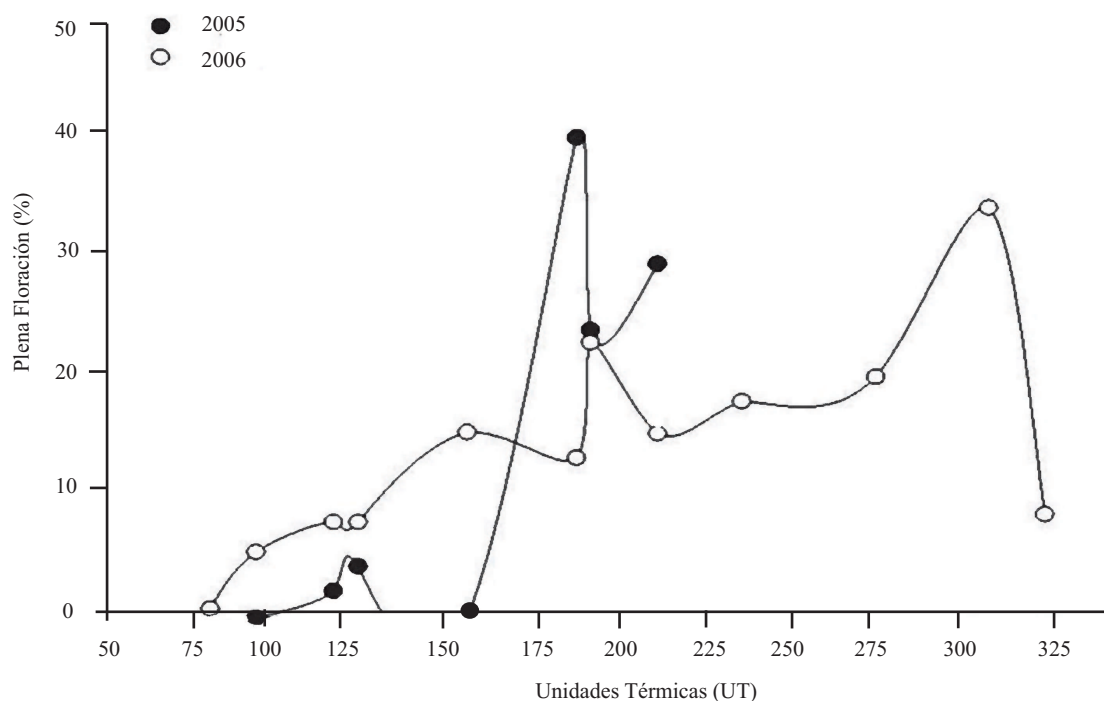


Figura 1. Cinética del estadio de plena floración en manzanos cv. 'Golden Delicious' durante los dos años evaluados. Cuauhtémoc, Chihuahua, México 2005-2006.

Figure 1. Kinetics of the full flowering stage in apple cv. 'Golden Delicious' during the two years under evaluation. Cuauhtémoc, Chihuahua, Mexico 2005-2006.

única fecha con presencia de lluvia (0.60 mm), registrando una humedad del 78% (UNIFRUT, 2005), mientras que al acumularse 112 UT el riesgo de infección fue moderado (M). El bajo porcentaje de poblaciones epifíticas de *Ea* durante 2005, se deben posiblemente a las bajas temperaturas registradas durante la evaluación (Figura 2). Estudios realizados por Bubán *et al.* (2004), atribuyen la ausencia de *Ea* en cuatro de cinco huertas muestreadas debido a un período frío antes de la floración. Por otra parte, la incidencia de flores colonizadas con *Ea* durante 2006 registró un mayor porcentaje de poblaciones epifíticas de *Ea* en todas las fechas de muestreo (Figura 2), debido posiblemente a las altas temperaturas y a la menor acumulación de unidades frío (613) (UNIFRUT, 2006), registradas durante la evaluación, condiciones que favorecieron el establecimiento de la bacteria aunado a un

colony growth was observed in the 48 h of incubation while assessing the sensitivity of one hundred isolated strains during the stigma printing in the Miller and Schroth (1972) cultivation medium, supplemented with streptomycin at 100 μLL^{-1} . As reported by Norelli (2004), in some areas of North America, *Ea* streptomycin resistant strains increased steadily from 1994 to 1998, reaching 57%. When the use of streptomycin was prohibited in 1997, this percentage dropped to 15% (Manulis *et al.*, 2003).

Identification of *Erwinia amylovora* by PCR. The PCR technique confirmed the identity of the isolated strains during the stigma printing in the CCT culture medium, but no changes were revealed by some samples in lanes 3 and 14 (Figure 3A). Similar results were reported by Llop *et al.* (2006), who conducted tests for the different *Ea* isolates performing molecular characterization by PCR, using

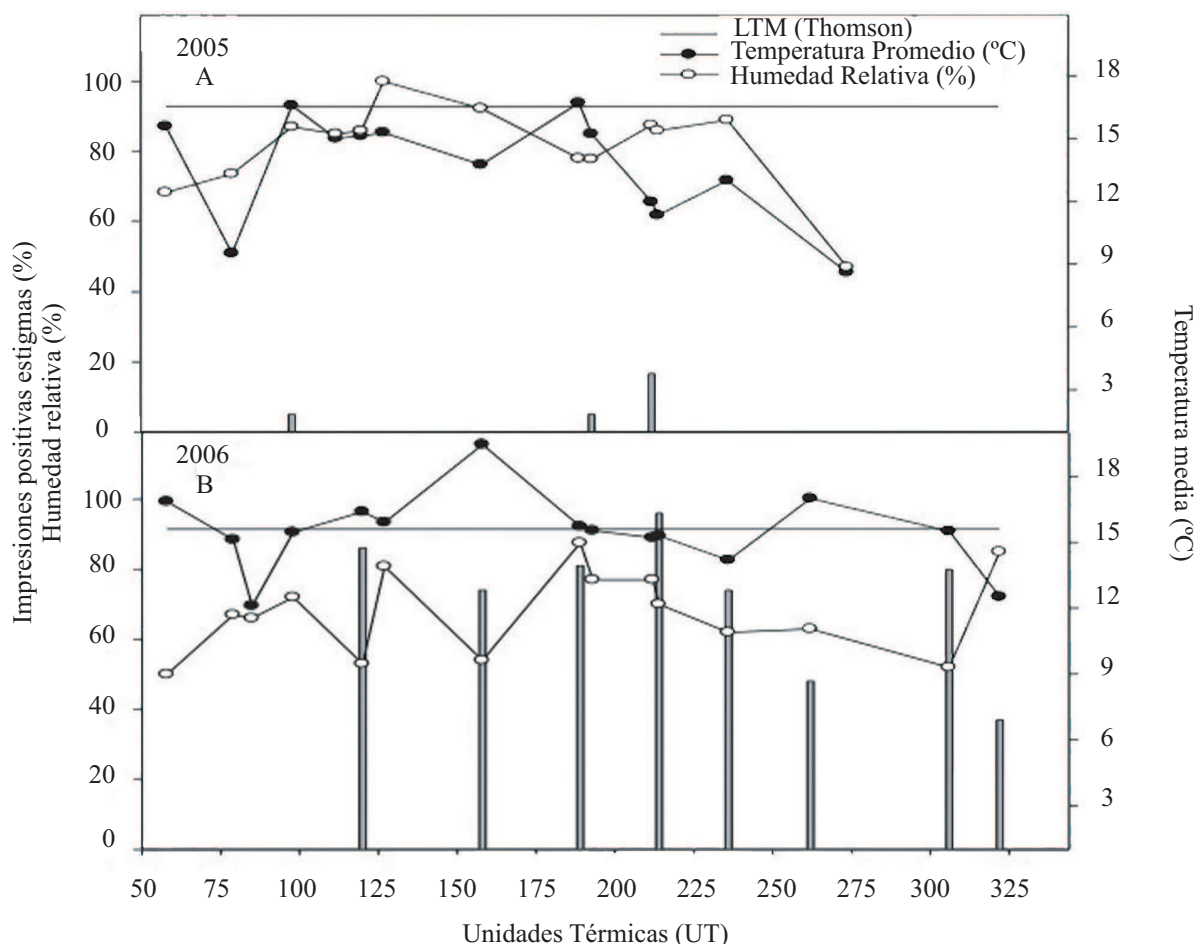


Figura 2. Condiciones ambientales prevalecientes durante el estadio de plena floración y porcentaje de poblaciones epifíticas de *Erwinia amylovora* en manzanos cv. 'Golden Delicious'. Cuauhtémoc, Chihuahua, México 2005-2006.

Figure 2. Prevailing environmental conditions during the full flowering stage and percentage of *Erwinia amylovora* epiphytic populations in apple cv. 'Golden Delicious'. Cuauhtemoc, Chihuahua, Mexico 2005-2006.

periodo más extenso en la floración (Figura 1). Durante éste año en la parcela experimental no se registraron eventos de precipitación pluvial, prevaleciendo en la mayoría de los muestreos un riesgo de infección moderado por presentar temperaturas mayores a los 15°C (Bubán *et al* 2004); sin embargo, debido al manejo del productor quien incrementó la humedad por más de una hora mediante la irrigación, modificó el riesgo de infección moderado (M), a la posible ocurrencia de la infección (I). Estudios realizados por Pusey (2000), menciona que la enfermedad inició en las flores solo cuando la humedad y la incidencia fue superior a 77% incluso cuando las aplicaciones de agua fueron seguidas de un periodo de secado inmediato de 52 min. De igual manera menciona que en el huerto la humedad del suelo afecta el potencial de agua del hospedero, por lo que la bacteria podría multiplicarse sobre los estigmas a menor humedad relativa que la que existe en la tasa floral. Por esta razón la aplicación de los tratamientos se realizó a las 214 UT por presentar el mayor porcentaje de flores colonizadas (96%), así como una humedad relativa del 70% (Figura 2). Miller y Schroth (1972) reportaron que el establecimiento de poblaciones epifíticas de *Ea* sobre los estigmas es un paso crítico para la infección de flores. A la fecha en la región productora de manzana del estado de Chihuahua regularmente se realizan de cuatro a siete aplicaciones durante floración, con productos a base de estreptomicina, dependiendo de las condiciones climáticas (temperatura, lluvia o granizo).

Pruebas de sensibilidad a estreptomicina. Al evaluar la sensibilidad de las cien cepas de *Ea* aisladas durante la impresión de estigmas en el medio de cultivo Miller y Schroth (1972), suplementado con estreptomicina a 100 µg mL⁻¹, únicamente se observó el crecimiento de una colonia de *Ea* a las 48 h de incubación. Investigaciones realizadas por Norelli (2004) menciona que en algunas áreas de Norteamérica, las cepas de *Ea* resistentes a estreptomicina, han reducido la efectividad de éste antibiótico. Estas cepas resistentes a estreptomicina se incrementaron constantemente de 1994 a 1998, alcanzando un 57%. Al prohibir el uso de la estreptomicina en 1997 este porcentaje se redujo al 15% (Manulis *et al.*, 2003).

Identificación de *Erwinia amylovora* por PCR. La técnica PCR permitió confirmar la identidad de las cepas aisladas durante la impresión de estigmas en el medio de cultivo CCT; sin embargo algunas muestras no mostraron amplificación en los carriles 3 y 14 (Figura 3A). Resultados similares fueron reportados por Llop *et al.* (2006), quienes realizaron ensayos para la caracterización molecular de diferentes aislados de *Ea* por PCR, utilizando iniciadores específicos para el plásmido pEA29. Esta observación parece estar más ligada a la dificultad de obtener una buena amplificación de las secuencias del primer en las muestras que con la posibilidad de que el primer no se encuentre presente en las cepas analizadas. Sin embargo, en estudios recientes se encontró una cepa sin este plásmido por lo que este problema se puede evitar mediante el uso de métodos de PCR basados en el DNA cromosómico (Obradovic *et al.*, 2007).

Pruebas de resistencia a estreptomicina por PCR.

specific primers for the pEA29 plasmid. This observation seems to be more related to the difficulty to obtain good primer sequence amplification from the samples with the possibility that the primer is not present in the analyzed strains. Although a strain without this plasmid has been revealed in recent studies to avoid such problem by means of PCR methods based on the chromosomal DNA (Obradovic *et al.*, 2007).

Streptomycin resistance testing by PCR. As the streptomycin resistance from the isolated obtained in the Miller and Schroth (1972) cultivation medium was confirmed, a positive result was revealed, showing the characteristic transposon band by means of amplification (Figure 3B). Similar results were reported by Chiou and Jones (1991) to evaluate *Ea* strains resistant to this antibiotic in a King's B medium with 50 µg mL⁻¹, and, subsequently, by PCR containing a plasmid of 3.2 Kb, approximately. Due to the widely spread use of streptomycin for the proper management of fire blight, *Ea* strains resistant to streptomycin are rather common in several regions in the United States. The search for alternatives to either replace or supplement streptomycin is an important objective for future research (Norelli, 2004). The detection of streptomycin resistant genes in *Ea* bacteria isolated in culture media containing this antibiotic is strong evidence for the presence of resistant strains in the state of Chihuahua.

Determination *in vitro* of minimum bactericidal concentration (MBC). The *Ea* viable cell count was significantly reduced as 0.055% (p/v) oregano essential oil was used of 9.60 ± 0.26 in the control at 1.5 ± 0.80 log UFC mL⁻¹ (Figure 4). Similar results have been reported by other researchers. A complete *Bacillus cereus* growth inhibition was obtained by Valero and Giner (2006), in 100 mL of carrot broth with 15 µL of carvacrol, having no growth revealed at all even after 60 incubation days. Nevertheless, a growth decrease or a full reduction of it was obtained with high concentrations only for some of compounds under evaluation. Moreover, a greater inhibitory effect with an increasing oil concentration was revealed when the fungicidal activity of the Mexican oregano oil was evaluated, showing a full inhibition for *Aspergillus* (As6) and *Bipolars* (Bi60); but the effect was different for other *Aspergillus* strains that showed 14% inhibition when being evaluated after seven days at room temperature (Portillo *et al.*, 2005). The main carvacrol antimicrobial activity is probably due to a pH decrease, as a result of the presence hydroxyl group, as well as a delocalized electron system, which affects the ATP synthesis, damaging some relevant cell processes until its death; this does not happen with other compounds similar to carvacrol (Ultee *et al.*, 2002).

Treatment evaluation on the field. Statistically significant differences were registered in assessing the amount of injured flower clusters during 2005, but only between the Agry-Mycin and the Cuprimicin 100^{MR} treatments, having the latter presenting the highest efficiency in disease control (56%). However, none of the treatments was any different to the control where only water was applied (Table 1). Likewise, significant differences among treatments were also revealed in 2006, as well as a

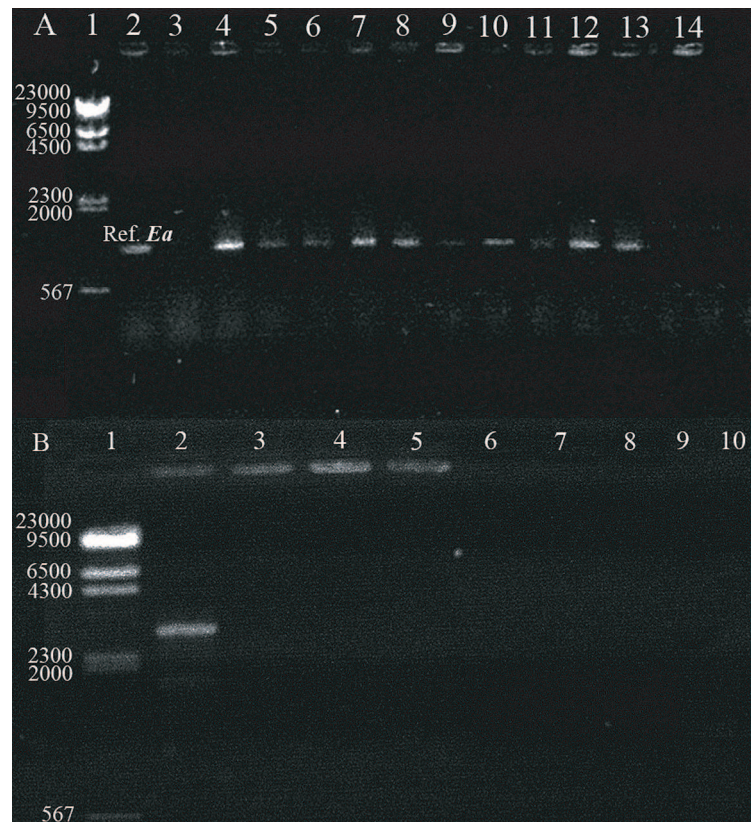


Figura 3. (A) Análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las bandas localizadas en el carril 1 corresponden al marcador de peso molecular, el 2 corresponde a una cepa de *Ea* utilizada como referencia, el carril 3 corresponde al testigo negativo (agua destilada), los carriles del 4 al 14 corresponden a colonias de *Ea* putativas aisladas durante la impresión de estigmas, cuya identificación fue corroborada por éste método.

(B) Análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para determinar cepas de *Ea* resistentes a estreptomicina. La banda del carril 2 corresponde a la cepa resistente a estreptomicina en el medio de cultivo Miller y Schroth, los carriles del 3 al 9 corresponden a cepas de *Ea* sensibles a estreptomicina y el carril 10 corresponde al testigo negativo.

Figure 3. (A) Polymerase chain reaction analysis (PCR). The bands on lane 1 correspond to the molecular weight marker; lane 2 corresponds to an *Ea* strain used as a reference; lane 3 corresponds to the negative control (distilled water); lanes 4 to 14 correspond to putative *Ea* colonies isolated during stigma impression, whose identification was confirmed by this method.

(B) Polymerase chain reaction analysis (PCR) to determine *Ea* strains streptomycin-resistant. The band on lane 2 corresponds to the streptomycin-resistant strain in the Miller and Schroth culture medium; lanes 3 to 9 correspond to the *Ea* streptomycin susceptible strains; lane 10 corresponds to the negative control.

Al confirmar la resistencia a estreptomicina del aislado obtenido en el medio de cultivo Miller y Schroth (1972), ésta dio positiva al transposon mostrando la banda característica mediante la amplificación (Figura 3B). Resultados similares fueron reportados por Chiou y Jones (1991) al evaluar cepas de *Ea* resistentes a este antibiótico en medio B de King's con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, y posteriormente por PCR conteniendo un plásmido de aproximadamente 3.2 Kb. Debido al uso generalizado de estreptomicina para el manejo del tizón de fuego, razas de *Ea* resistentes a estreptomicina son comunes en varias regiones de Estados Unidos. La búsqueda de alternativas que reemplacen o complementen a la estreptomicina es un objetivo importante para investigaciones futuras (Norelli, 2004). La detección

greater number of damaged flower clusters (Table 1), probably due to a longer flowering period (Figure 1), and a higher percentage of epiphytic populations obtained during the stigma impression (37 to 96%; Figure 2B). High *Ea* epiphytic populations in flowers without causing a significant damage have been reported in numerous studies (Bubán *et al.*, 2003). Approximately 50% of healthy flowers in pear orchards infected with 10^6 *Ea* cells per flower had a disease incidence from one to three infected buds per tree, also noting that susceptibility in pear and apple flowers differs from year to year, according to the flowering stage. When the treatments were evaluated during the 2006, the Agry- Mycin 100^{MR} and Cuprimycin 100^{MR} efficiency was similar with 17 and 24%, respectively. The oregano oil

de genes resistentes a estreptomycin en bacterias de *Ea* aisladas en medios de cultivo que contienen éste antibiótico es una fuerte evidencia de la presencia de cepas resistentes en el estado de Chihuahua.

Determinación *in vitro* de la concentración mínima bactericida (CMB). El conteo de células viables de *Ea* se redujo significativamente al utilizar 0.055% (p/v) del aceite esencial de orégano de 9.6 ± 0.26 en el control a $1.5 \pm 0.80 \log \text{ UFCmL}^{-1}$ (Figura 4). Resultados similares han sido reportados por otros investigadores. En estudios realizados por Valero y Giner (2006), obtuvieron una inhibición total del crecimiento de *Bacillus cereus* en 100 mL de caldo de zanahoria con 15 μL de carvacrol, no observaron crecimiento después de 60 días de incubación. Sin embargo la disminución o completa reducción del crecimiento se obtuvo con altas concentraciones, sólo para algunos de los compuestos evaluados. Por otra parte, al evaluar la actividad fungicida del aceite de orégano mexicano, éste mostró mayor efecto inhibitorio conforme se incrementaba la concentración del aceite, con una inhibición total para unas razas de *Aspergillus* (As6) y *Bipolaris* (Bi60), sin embargo, el efecto fue diferente para otras razas de *Aspergillus* las cuales presentaron una inhibición del 14% al evaluarlas después de siete días a temperatura ambiente (Portillo *et al.*, 2005). La principal actividad antimicrobiana del carvacrol se debe probablemente a una disminución en el pH como resultado de la presencia del grupo hidroxilo y un sistema deslocalizado de electrones, lo cual afecta la síntesis de ATP, dañando los procesos esenciales de la célula hasta su muerte, lo cual no sucede con otros compuestos semejantes al carvacrol (Ultee *et al.*, 2002).

Evaluación de los tratamientos en campo. Al evaluar la cantidad de racimos florales con daño durante 2005, se registraron diferencias estadísticamente significativas, únicamente entre los tratamientos de Agry-Mycin y Cuprimicin 100^{MR}, presentando este último la mayor eficiencia en el control de la enfermedad (56%). Sin embargo ninguno de los tratamientos fue diferente al testigo donde solo se aplicó agua (Cuadro 1). De igual manera en 2006 se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, así como un mayor número de racimos florales con daño (Cuadro 1), debido posiblemente al periodo más extenso en la floración (Figura 1) y al mayor porcentaje de poblaciones epifíticas obtenidas durante la impresión de estigmas (37 hasta 96%; Figura 2 B). Altas poblaciones epifíticas de *Ea* en flores sin ocasionar daños significativos, han sido reportadas en numerosos estudios (Bubán *et al.*, 2003). Aproximadamente el 50% de las flores sanas en huertos de peral al ser infestadas con 10^6 células de *Ea* por flor presentaron una incidencia de la enfermedad entre uno o tres brotes infectados por árbol, observando también que la susceptibilidad en flores de peral y manzano varía año con año de acuerdo a la fase de floración.

Al evaluar los tratamientos durante 2006, la eficiencia de Agry-Mycin 100^{MR} y Cuprimicin 100^{MR} fue similar con 17 y 24%, respectivamente. El tratamiento de aceite de orégano presentó una mayor eficiencia en el control de la enfermedad (39%), mientras que el

treatment had a higher efficiency of disease control (39%); whereas a lack of control was revealed by the Agrygen Plus 800^{MR} treatment (Table 1). No significant differences between treatments and the control were exposed in both years (Table 1). As revealed by studies performed by Tsiantos *et al.* (2003) to evaluate the efficiency of different products as an alternative for fire blight management in pear trees under artificial inoculation conditions, the best preventive and curative control was obtained from Agrepet (streptomycin 20%) with 90 and 63%, respectively; while Bactosan (Pongamin, extract from the plant *Pongamia pinnata*), worked only as a preventive when the inoculum concentration was less than or equal to 10^5 CFUmL^{-1} . The low treatment efficiency in the *Ea* control, in the study hereby, is most likely due to a lack of optimal humidity conditions for infection to take place (Bubán *et al.*, 2004), even though the percentage of epiphytic populations was high in the 2006 cycle (Figure 2B). It was concluded in studies performed by Pusey (2000) under laboratory conditions, where different humidity ranges were simulated, that the stigma colonization by *Ea* does not cause flower damage under dry conditions, unless the pathogen movement to the flower receptacle where the infection occurs is facilitated by the rain. According to the results obtained in this investigation, when there is no humidity event (rain or irrigation) and other conditions are present, such as high *Ea* populations temperatures above threshold, the risk is high; yet the chemicals application can be omitted for the handling of this bacterium. Spraying with over 1000 L of water per hectare could assist the movement of the bacteria to the flower receptacle where the infection occurs, resulting in more than 500 flower clusters with standard tree damage (data not published). The damage caused by *Ea* during flowering in arid regions can be controlled to a certain degree, particularly in sites with sandy soils limiting irrigation during flowering and early fruit set (Pusey, 2000). An incidence between 21 and 368 infected fruits with an average of 149 was obtained in studies performed by Rosenberger and VanCamp (2003), finding that the highest *Ea* incidence in the fruits was revealed in the southeast and in the location of the irrigation barrel, while in the section where the gun irrigation hose was not used within the same block and orientation, there were only one or two infected fruits per tree.

CONCLUSIONS

A lower cold accumulation prevailed during 2006 with a more extensive floral period, which favored bacteria multiplication. Thus, a higher flower percentage with bacterial epiphytic populations, and an increase on the damage caused by *Ea*, was obtained. It was in this year when a greater effect was obtained with oregano application. Still, in order to show its efficiency it is necessary to evaluate it when the conditions for *E. amylovora* infection are optimal, since the results obtained in the two cycles are not conclusive.

The importance of alternatives usage is revealed by the first detection of streptomycin-resistant strain in the region for disease management in apple trees, or the

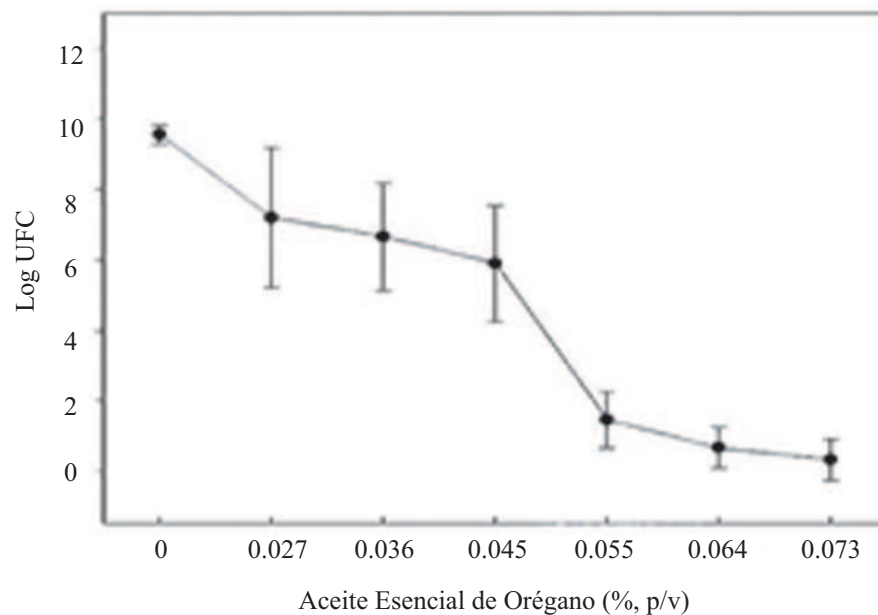


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones del aceite de orégano (*L. berlandieri*) sobre el conteo de células viables de *Erwinia amylovora* (*Ea*) después de 48 h de crecimiento en medio LB ($29 \pm 1^\circ\text{C}$). Los valores de las medias representan los datos de tres mediciones, las barras indican la desviación estándar. Cuauhtémoc, Chihuahua, México 2005-2006.

Figure 4. Effect of different concentrations of oregano oil (*L. berlandieri*) on *Erwinia amylovora* (*Ea*) viable cell counts after 48 h of growth in an LB medium ($29 \pm 1^\circ\text{C}$). The mean values represent data from three measurements; bars indicate standard deviation. Cuauhtémoc, Chihuahua, Mexico 2005-2006.

tratamiento con Agrygen Plus 800^{MR} no presentó control (Cuadro 1). En ambos ciclos no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo (Cuadro 1). ‘En estudios realizados por Tsiantos *et al.* (2003), al evaluar la eficiencia de diferentes productos como alternativa para el manejo del tizón de fuego en árboles de peral y bajo condiciones de inoculación artificial, Agrepet (estreptomycin 20%), presentó el mejor control preventivo y curativo con 90 y 63%, respectivamente, mientras que Bactosan (Pongamin, extracto de la planta *Pongamia pinnata*), funcionó sólo como preventivo cuando la concentración del inóculo fue menor o igual a 10^5 UFCmL⁻¹. En el presente estudio, la baja eficiencia de los tratamientos en el control de *Ea*, se debe posiblemente a que no se presentaron condiciones óptimas de humedad (Bubán *et al.*, 2004), para

que ocurriera la infección, aún cuando el porcentaje de poblaciones epifíticas fue alto en 2006 (Figura 2 B). En estudios realizados por Pusey (2000) bajo condiciones de laboratorio, simulando diferentes rangos de humedad en las flores, concluyó que la colonización de estigmas por *Ea* bajo condiciones secas, no ocasiona daño a las flores, a menos que la lluvia facilite el movimiento del patógeno al receptáculo floral donde generalmente ocurre la infección. De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, cuando no existe un evento de humedad (lluvia o riego) y están presentes las demás condiciones como son poblaciones altas de *Ea* y temperaturas por encima del umbral, el riesgo es alto; sin embargo se puede omitir la aplicación de los productos químicos para el manejo de esta

awareness of optimal *Ea* infection conditions in order to reduce the number of antibiotics application when they are not required, and as a result, the development of resistant strains.

Acknowledgements. The authors thank Fundación Produce Chihuahua, A. C., and the Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua, A.C. (UNIFRUT), for their financial support; to Mr. Johan Letkeman Wibe, for the facilities extended to establish the experimental plot in his garden; to Agroindustrial Don Pablo Licón, for providing the oregano oil; to Alfonso A. Gardea Béjar, Ph.D. and to Agustín Rascón Chu, Ph.D. for their comments on the manuscript.

LITERATURA CITADA

- Anstey TH. 1965. Prediction of full bloom date for apple, pear, cherry, peach and apricot from air temperature data. *Journal of American Society for Horticultural Science* 88:57-66.
- Beer SV. 1978. Techniques for field evaluation of spray material to control fire blight of apple and pear blossoms. Pp: 46-50. In: Zher E. (ed). *Methods for evaluating plant fungicides, nematicides and bactericides*. American Phytopathological Society. St Paul Minnesota, USA. 141p.
- Bereswill S, Pahl A, Bellemann P, Zeller W and Geider K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3522-

Cuadro 1. Evaluación de diferentes tratamientos para el manejo de *Erwinia amylovora* en racimos florales de manzano cv. 'Golden Delicious'. Cuauhtémoc, Chihuahua, México 2005-2006.

Table 1. Different treatments evaluation for *Erwinia amylovora* management on 'Golden Delicious' apple cv. flower clusters. Cuauhtemec, Chihuahua, Mexico 2005-2006.

Tratamiento	Ingrediente activo	2005		2006	
		Total de racimos florales con daño/árbol	Eficiencia (%)	Total de racimos florales con daño/árbol	Eficiencia (%)
Testigo	Agua	6.5 ab*		28.5 ab*	
Agry-Mycin 100	Sulfato de estreptomicina 80% de 18.75 %/kg=150g de IA y oxitetraciclina 75% de 2.0%/kg	9.7a	0	23.8 ab	17
Agrygen Plus 800	Sulfato de gentamicina 2.0%=20.0 g IA y oxitetraciclina 6%=20.0 g IA	7.8 ab	0	29.4 a	0
Cuprimicin 100	Sulfato de estreptomicina 80% de 18.75%/kg=150g IA y oxitetraciclina 75% de 2.0%/kg	2.85 b	56	21.7 ab	24
Aceite de Orégano	Carvacrol al 80%	8.2 ab	0	17.5 b	39

*Medias con letras iguales dentro de la misma columna, no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$)

bacteria. Aspersiones con más de 1000 L de agua por hectárea, podría facilitar el desplazamiento de la bacteria hacia el receptáculo floral donde ocurriría la infección, ocasionando más de 500 racimos florales con daño en árboles estándar (datos no publicados). En regiones áridas, el daño ocasionado por *Ea* durante floración puede ser controlado en cierto grado, particularmente en sitios con suelos arenosos limitando la irrigación durante el período de floración e inicio de amarre de frutos (Pusey, 2000). En estudios realizados en perales por Rosenberger y VanCamp (2003), se obtuvo una incidencia entre 21 y 368 frutos infectados con una media de 149, encontrando que la mayor incidencia de *Ea* en los frutos, fue en la orientación sureste y en la localización del cañón de riego, mientras que en la sección en que no se utilizó el cañón dentro del mismo bloque y orientación, se registraron uno o dos frutos infectados por árbol.

CONCLUSIONES

Durante el año 2006 se registró una menor acumulación de frío, con un período floral más extenso, que

3526.

Bubán T, Orosz-Kovács Zs and Farkas Á. 2003. The nectary as primary site of infection by *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.*: a mini review. Plant Systematics and Evolution 238: 183-194.

Bubán T, Rutkai E, Dorgai L and Thomson ST. 2004. Prediction infection risk on the basis of weather-related factors and *Erwinia amylovora* colonization in apple and pear flowers. International Journal of Horticultural Science 10: 39-54

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.

Chiou CS and Jones AL. 1991. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. Phytopathology 81: 710-714.

Guerrero PVM, Romo CA, Orozco AJA, Berlanga RDI, Gardea BAA y Parra QAR. 2006. Polinización en manzanos 'Red Delicious' y 'Golden Delicious'. Revista Fitotecnia Mexicana 29: 41-45.

Hauagge R and Cummins JN. 1991. Phenotypic variation of

favoreció la multiplicación de la bacteria, debido a esto se obtuvo un mayor porcentaje de flores con poblaciones epifitas bacterianas y un incremento del daño ocasionado por *Ea*; fue en este año cuando se obtuvo un mayor efecto con la aplicación del aceite de orégano. Sin embargo para demostrar su eficiencia es necesario evaluarlo cuando las condiciones para la infección de *E. amylovora* sean las óptimas ya que los resultados obtenidos en los dos años no son concluyentes.

La detección de la primera cepa resistente a estreptomycin en la región, demuestra la importancia del uso de alternativas para el manejo de enfermedades en el manzano o del conocimiento de las condiciones óptimas de infección de *E. amylovora* con la finalidad de disminuir el número de aplicaciones de los antibióticos cuando estos no sean necesarios, y por ende el desarrollo de cepas resistentes.

Agradecimientos. Los autores agradecen a Fundación Produce Chihuahua, A. C., y a la Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua, A.C. (UNIFRUT), por el apoyo financiero, al Sr. Johan Letkeman Wibe, por las facilidades prestadas para establecer la parcela experimental en su huerto, a la empresa AgroIndustrial Don Pablo Licón, por facilitarnos el aceite de orégano, así como al Dr. Alfonso A. Gardea Béjar y al Dr. Agustín Rascón Chu por sus comentarios al manuscrito.

length of bud dormancy in apple cultivars and related *Malus* species. Journal of the American Society for Horticultural Science 116: 100-106.

Ishimaru C and Klos EJ. 1984. A new medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. Phytopathology 74:1342-1345.

Johnson KB and Stockwell VO. 2000. Biological control of fire blight. Pp 319-337. In: Vanneste JL. Fire blight: The Disease and its Causative Agent *Erwinia amylovora*. Eds. Cab International. Wallingford UK. 370 p.

Kritzman G, Shwartz H, Marcus R, Manulis S, Kleitman F, Oppenheim D, Zilberstaine M and Shtienberg D. 2003. Testing a rapid diagnostic medium for *Erwinia amylovora* and development of a procedure for sampling blossoms in pear orchard. Phytopathology 93:931-940.

Lecomte P, Manceau Ch, Paulin JP and Keck M. 1997. Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. European Journal of Plant Pathology 103:91-98.

Llamas LJ, Carvajal ME, Orozco AJA, Rascón CA, Romo CA, Guerrero PVM, González HVA y Gardea BAA. 2002. Respuesta metabólica y brotación de yemas de manzano por la aplicación de promotores de brotación. Revista Fitotecnia Mexicana 25:411-417.

Llop P, Donat V, Rodríguez M, Cabrefiga J, Ruz L, Palomo JL, Montesinos E and López MM. 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEa29. Phytopathology 96:900-907.

Manulis S, Kleitman F, Shtienberg D, Shwartz H,

Oppenheim D, Zilberstaine M and Shabi E. 2003. Changes in the sensitivity of *Erwinia amylovora* populations to streptomycin and oxolinic acid in Israel. Plant Disease 87: 650-654.

Manulis S, Zutra D, Kleitman F, Dror O, David I, Zilberstaine M and Shabi E. 1998. Distribution of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in autumn. Phytoparasitica 26:223-230.

Miller TD and Schroth MN. 1972. Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. Phytopathology 62:1175-1182.

Momol MT, Norelli JL, Piccioni DE, Momol EA, Gustafson HL, Cummins JN and Aldwinckle HS. 1998. Internal movement of *Erwinia amylovora* through symptomless apple scion tissues into the rootstock. Plant Disease.82:646-650.

Norelli JL. 2004. Fire Blight Pp: 443-447. In: Goodman RM (ed). Encyclopedia of Plant and Crop Science. Marcel Dekker, Inc. NY., USA. 1329p.

Norelli JL, Jones AL and Aldwinckle HS. 2003. Fire management in the twenty-first century, using new technologies that enhance host resistance in apple. Plant Disease 87:756-765.

Obradovic D, Balaz J and Kevresan S. 2007. Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. Microbiology 76:748-756.

Portillo RMC, Viramontes RS, Muñoz CLN, Gastelum FMG and Nevarez MVG. 2005. Antifungal activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Shauer). Journal of Food Protection 68:2713-2717.

Pusey LP. 2000. The role of water in epiphytic colonization and infection of pomaceous flowers by *Erwinia amylovora*. Phytopathology 90: 1352-1357.

Rosenberg DA and VanCamp KL. 2003. Temperature declines during storms and irrigation may contribute to fire blight infection of pear fruit. Plant Health Progress. (doi:10.1094/PHP-2003-0310-01-RS).

SAS Institute. 2003. Version 9.1. SAS institute Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.

SIAP. 2006. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Sagarpa. Anuario estadísticas de la producción agrícola. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/> (consulta, julio 2006).

Shtienberg D, Shwartz H, Oppenheim D, Zilberstaine M, Herzog H, Manulis S and Kritzman G. 2003. Evaluation of local and imported fire blight warning systems in Israel. Phytopathology 93:356-363.

Taylor RK, Guilford PJ, Clark RG, Hale CN and Forster RLS. 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 29:35-43.

Thomson SV. 1992. Monitoring flowers for presence of epiphytic *Erwinia amylovora* by stigma streaking. Phytopathology 82:1077.

Thomson SV, Schroth MN, Moller WJ and Reil WO. 1982. A forecasting model for fire blight of pear. Plant Disease 66:576-579.

Thomson SV and Gouk SC. 2003. Influence of age of apple flowers on growth of *Erwinia amylovora* and biological control agents. Plant Disease 87:502-509.

Tsiantos J, Psallidas P and Chatzaki A. 2003. Efficacy of alternatives to antibiotic chemicals for the control of fire blight of pears. Annals of Applied Biology 143: 319-323.

Ultee A, Bennik MHJ and Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food born pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 68:1561-1568.

UNIFRUT, Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua, A. C. 2005. Estadísticas realizadas p o r U N I F R U T .

http://www.unifrut.com.mx/index_archivos/estaciones (Consulta, junio 2005).

UNIFRUT, Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua, A. C. 2006. Estadísticas realizadas p o r U N I F R U T . http://www.unifrut.com.mx/index_archivos/estaciones (Consulta, junio 2006).

Valero M and Giner MJ. 2006 Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cerus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. International Journal of Food Microbiology 106:90-94.