

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LA RESINA DE *Larrea tridentata* Cav. SOBRE *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith EN LABORATORIO E INVERNADERO

Martha M. Guevara Martínez¹
Federico A. González Sánchez²
Eugenio Guerrero Rodríguez³

RESUMEN

La resina de *Larrea tridentata*, fracción etanótica, en dosis de 250 a 750 ppm, mantiene su efecto bactericida hasta los 60 días posteriores a su extracción; con Agrimycin 100, *in vitro*, se obtienen iguales resultados. En mezcla de la resina con adherentes, los mejores resultados fueron con el Tritón y Sponto-234, sólo que con una dosis de resina de 750 ppm. En las pruebas de invernadero, la resina mostró prioridades sistemáticas, al controlar el ataque del patógeno en tres de las seis plantas inoculadas, cuyo nivel de marchitamiento existía sólo en hojas inferiores. En las dosis de 750 y 500 ppm se obtuvieron los mismos resultados que al tratamiento de Agrimycin 100. En los tres tratamientos restantes, debido al avance vascular de la enfermedad, no fue posible lograr el control del patógeno.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cultivo de la papa ocupa el cuarto lugar en la alimentación mundial, pero su producción se ve limitada por el ataque de la bacteria *Pseudomonas solanacearum*, conocida como vaquita de la papa y es considerada como la enfermedad más peligrosa y más difícil de combatir. Esta bacteria sólo puede ser controlada por antibióticos, por lo cual es necesario encontrar fuentes compuestas que ayuden en su combate. Al respecto se ha reportado que, en pruebas *in vitro* los extractos de *Larrea tridentata* manifiestan actividades contra la bacteria; sin embargo, se desconoce por cuanto tiempo la conservan, así como si se expresa en plantas de papa, por lo cual los objetivos del presente trabajo son: determinar el tiempo de degradación de la resina de gobernadora, observar su efecto en mezclas con adherentes, y evaluar su actividad bacteriana en invernadero.

1 y 3. Biol. e Ing. M.C. Maestros del Departamento de Parasitología. Div. de Agronomía, UAAAN.
2. Tesista licenciatura

REVISIÓN DE LITERATURA

Existen algunos reportes de extracto de plantas con actividad bactericida en estudios a nivel de laboratorio; así, Zalewski y Sequeira (1973), indican que extractos etanólicos de tubérculos, tallo y tejidos de hojas de *Solanum phureja* y *S. tuberosum* inhibieron el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas solanacearum*, pero no mostraron efecto alguno sobre *Erwinia atroseptica* y *E. carotovora*; Karim, et al. (1979), señalan que los aceites esenciales de las semillas del cilantro (*Coriandrum sativum*) fueron activos contra *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea*; Maiti, et al. (1985), mencionan que los aceites de *Mentha piperita* y *M. citrata* inhibieron significativamente el crecimiento de *Xanthomonas campestris* en la dilución 10:1.

Velázquez (1983), reporta que la resina de gobernadora en su fracción etanólica manifestó una acción selectiva contra bacterias, ya que en especies de *Erwinia* no presentó efecto alguno, en cambio contra *P. solanacearum* presentó un excelente efecto aun a 250 ppm, comparativamente igual al Agrimycin 100 que fue el testigo convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

De acuerdo a los objetivos planteados, el trabajo se realizó en tres etapas. Para ello se conservó la cepa patogénica de *P. solanacearum* en agua destilada estéril en tubos de ensayo, en condiciones de refrigeración para utilizarlos en cada uno de los bioensayos.

En esta primera etapa se extrajo resina de gobernadora por el método Soxhlet, la cual se separó en dos porciones de 25 gr: una que se mantuvo bajo condiciones de medio ambiente y otra en refrigeración, para determinar por medio de bioensayos el tiempo en el cual las muestras pierden la actividad bactericida. Se evaluaron dosis del extracto de 750, 500 y 250 ppm, incluyendo un testigo absoluto, un testigo etanólico y un testigo bactericida a base de Agrimycin 100, (200 ppm) con cinco repeticiones por tratamiento; la evaluación de la resina se efectuó en medio líquido al cual se agregó de una solución "stock" de la bacteria, una dilución 10:5 tomando 0.1 ml de ésta y depositándola en un matraz que contenía 50 ml del medio de cultivo específico Tetrazolium sin agar. Después de esterilizados estos matraces se procedió a agregar las dosis del tratamiento correspondiente las que se colocaron, durante 48 horas, en una incubadora a 33°C; luego se tomó 0.1 ml del medio y se depositó en una caja Petri con sólo medio de Tetrazolium con agar, pero sin solidificar todavía; se agitó para que se destruyeran las bacterias, lo cual se hizo en cada uno de los tratamientos con sus respectivas repeticiones. Los matraces se sellaron y colocaron en forma invertida durante 72 horas, en la incubadora, a 33°C; al término de este tiempo se verificó el efecto de la resina sobre el patógeno por medio de un

conteo de colonias desarrolladas en la placa del medio. En total se realizaron cuatro bioensayos, uno cada 15 días, con la resina que tenía 30 días de haberse obtenido, al iniciar los bioensayos.

En la segunda etapa se extrajo nuevamente resina para evaluarla en mezcla con adherentes, con el propósito de conocer con que producto y a que dosis manifestaba afinidad, sin ser inhibido su efecto bactericida. Los tratamientos se separaron, de igual forma, de la etapa anterior, se evaluaron los adherentes Bionex, Arcopal-NF 060, Sponto 234 y Tritón 20, que fueron agregados en el medio de cultivo líquido que contenía a la bacteria, con y sin tratamiento de resina. Se realizaron 11 tratamientos ya que nuevamente se incluyeron los testigos absoluto y etanólico, y se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. El conteo de las colonias de bacterias resultantes se realizó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

En la tercera etapa, consistente en las pruebas de invernadero, se utilizaron plantas de papa de la variedad Alpha, sembradas en suelo estéril y los tubérculos tratados con fungicida y bactericida (Agrimycin 100). Estas plantas fueron inoculadas con el patógeno que se encontraba en solución bacterial, según la técnica de Winstead y Kelman (1952), colocó una gota de esta solución en una punción que se realizó en la unión axilar de la tercera hoja con el tallo; se repitió la operación en 30 plantas. Esta operación (inoculación) se realizó en dos ocasiones, por que las plantas inoculadas no presentaron desarrollo de la enfermedad, la cual se expresó una vez que se cambiaron de lugar a las plantas, puesto que el invernadero no reunió las condiciones adecuadas para el desarrollo de la enfermedad. Al confinarlas en cámara bioclimática, previa poda de las plantas, ya que se encontraban en estado fisiológico muy avanzado, y dejando solamente los brotes principales con un tamaño de 10 cm, al tercer día de permanecer en la cámara se presentaron síntomas de enfermedad; sin embargo, ya que no se tenía la seguridad de que fuera a causa de la bacteria, puesto que no se habían manifestado síntomas anteriormente, se procedió a realizar una prueba para determinar si los síntomas aparecidos eran provocados por el ataque de la bacteria. Una vez que los resultados mostraron la confirmación del ataque de la bacteria, se realizó la primera aplicación de la resina a los cinco días de aparición de los síntomas de la enfermedad; una segunda aplicación se realizó a los siete días siguientes; ambas se hicieron en forma de aspersión foliar, aplicando 300 ml de la solución correspondiente a cada tratamiento, excepto al testigo natural, al cual no se le inoculó ni se le aplicó nada. A los siete días posteriores a la segunda aspersión se observó el efecto de la resina sobre el patógeno, por lo que se determinó no realizar una tercera aplicación. Las dosis evaluadas de la resina fueron de 750 y 500 ppm, se incluyeron un tratamiento bactericida a base de Agrimycin 100, un testigo absoluto, un testigo etanólico, un testigo absoluto y un testigo natural, constando de esta manera de seis tratamientos con seis repeticiones cada uno. Los resultados en esta etapa fueron analizados por un diseño de bloques al azar.

La clasificación de los síntomas en las plantas inoculadas se realizó según al grado de ataque de la clasificación desarrollada por Winstead y Kelman (1952), que es la siguiente.

- 0 Sin síntomas
- 1 Ligero marchitamiento de las hojas inferiores
- 2 Marchitamiento de las hojas inferiores
- 3 Marchitamiento de todas las hojas excepto el brote terminal
- 4 Completa marchitez sin desecación de las hojas
- 5 Marchitez completa

El análisis de los resultados se hizo en un diseño de bloques al azar por medio de la prueba de Friedman, la cual detectó una diferencia estadística entre tratamientos al 1 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los Cuadros 1 y 2 se observa el gran efecto bactericida causado por la resina de gobernadora sobre la bacteria *P. solanacearum* durante el desarrollo del trabajo *in vitro*; en contraste con los tratamientos del testigo absoluto y testigo etanólico, que presentan la superficie del medio, llena de colonias en cuatro bioensayos realizados y sin efecto alguno en el desarrollo de las colonias por causa del etanol. Por lo que respecta a los resultados obtenidos en los tres primeros bioensayos, muestran que en cualquiera de las tres dosis de resina evaluadas, el desarrollo de colonias de la bacteria fue nulo, al igual que en el tratamiento del Agrimycin 100 (bactericida convencional). Estos resultados fueron

Cuadro 1. Promedio de colonias de *Pseudomonas solanacearum* a las 72 horas, en los tratamientos en los bioensayos corridos cada 15 días con y sin resina de *Larrea tridentata* mantenida bajo condiciones de medio ambiente, UAAAN. 1988.

Tratamientos	Promedio de colonias por bioensayo			
	1º* 30 días	2º 45 días	3º 60 días	4º 75 días
Testigo Absoluto	3,442	3,442	3,442	3,442
Testigo Etanólico	3,442	3,442	3,442	3,442
Testigo Agrimycin 100	0	0	0	0
Resina Fr. Etanólica 200 ppm	0	0	0	374.2
Resina Fr. Etanólica 500 ppm	0	0	0	872.9
Resina Fr. Etanólica 250 ppm	0	0	0	1,749

* La resina utilizada presentaba 30 días de haberse obtenido al iniciar el 1er. bioensayo.

Cuadro 2. Promedio de colonias de *Pseudomonas solanacearum* a las 72 horas en los tratamientos en los bioensayos corridos cada 15 días con y sin resina de *Larrea tridentata* mantenida bajo condiciones de refrigeración. UAAAN. 1988.

Tratamiento	Promedio de colonias por bioensayo			
	1º* 30 días	2º 45 días	3º 60 días	4º 75 días
Testigo Absoluto	3,442	3,442	3,442	3,442
Testigo Etanólico	3,442	3,442	3,442	3,442
Testigo Agrimycin 100 200 ppm	0	0	0	0
Resina Fr. Etanólica 750 ppm	0	0	0	16
Resina Fr. Etanólica 500 ppm	0	0	0	516.3
Resina Fr. Etanólica 250 ppm	0	0	0	698.4

* La resina utilizada presentaba 30 días de haberse obtenido al iniciar el 1er bioensayo.

iguales para las dos muestras de resina que se mantuvieron bajo condiciones refrigeradas y en el medio ambiente. Es en el cuarto bioensayo (75 días) donde se aprecia que la resina pierde su acción bactericida en las dos muestras; se observa que hubo un poco más colonias en la muestra que estuvo en medio ambiente (Cuadro 1) que la mantenida en refrigeración (Cuadro 2); el número de colonias fue menor a mayor concentración y viceversa, en ambas muestras de la resina de gobernadora.

En lo referente a la mezcla con adherentes del extracto de gobernadora, los mejores resultados se obtuvieron a la dosis de 750 ppm con los adherentes tritón 20 y sponto-234, (Cuadro 3) ya que a dosis de 250 y 500 ppm en combinación con los adherentes, éstos antagonizaron la acción bactericida de la resina, lo que permitió un desarrollo de bacterias igual que en los testigos; en los tratamientos que solamente contenían el medio específico en mezcla con los adherentes, no se observó efecto alguno sobre el desarrollo de la bacteria, puesto que todos se manifestaron llenos de colonias en las cajas Petri.

Por lo que respecta a las pruebas de invernadero, primero se realizaron pruebas de patogenicidad de la bacteria para comprobar que seguía conservándola y, como ya se mencionó, si en invernadero no se manifestó la enfermedad fue porque las condiciones presentes no permitieron el desarrollo de la enfermedad ya que, en el día, la temperatura que se presentaba era de 40°C y una HR menor del 30 % mientras que en la noche era de 30°C. Una vez que se presentaron los síntomas en la cámara a que se trasladaron las plantas de papa, se confirmó el desarrollo de la enfermedad causada por *P. solanacearum*. Los síntomas en las plantas iniciaron con un marchitamiento parcial de las hojas inferiores y, posteriormente, avanzó hacia la parte superior; al momento de

Cuadro 3. Promedio de colonias de *Pseudomonas solanacearum* a las 72 horas, en los tratamientos con los adherentes con y sin resina de *Larrea tridentata*. UAAAN. 1989.

Tratamientos	Número de colonias para las dosis de resina en ppm		
	250	500	750
Testigo Absoluto (M.T.*)	3,442	3,442	3,442
Testigo Etanólico	3,442	3,442	3,442
M.T. + Resina	0	0	0
M.T. + Bionex	3,442	3,442	3,442
M.T. + Sponto 234	3,442	3,442	3,442
M.T. + Arkopal NF 060	3,442	3,442	3,442
M.T. + Tritón	3,442	3,442	3,442
M.T. + Bionex + Resina	3,442	3,442	890.5
M.T. + Sponto 234 + Resina	3,442	3,442	0
M.T. + Arkopal NF 060 + Resina	3,442	3,442	378.2
M.T. + Tritón + Resina	3,442	3,442	0

M.T: Medio Tetrazolium

realizar la primera aplicación de productos químicos la mayoría de las plantas presentaban marchitez de las hojas inferiores, y, al momento de la segunda aplicación del tratamiento correspondiente al testigo absoluto, las seis plantas presentaban marchitamiento total de las hojas inferiores, y en la mayor parte de las hojas medias, al igual que en el testigo etanólico, excepto en una planta que solamente presentaba marchitez en las hojas inferiores. Por lo que respecta a los tratamientos de la dosis de 750 y 500 ppm de la resina y del testigo Agrimycin 100, los síntomas fueron iguales, presentando en tres de las seis plantas un ligero marchitamiento y en las otras tres los síntomas avanzaban rápidamente a la parte superior.

A los 14 días de iniciadas las aplicaciones, se observó que las plantas del testigo absoluto estaban muertas (Cuadro 4); en el testigo etanólico cinco estaban muertas, mientras que en una el marchitamiento era general, pero aún no moría; en tanto que en los tratamientos con las dosis de resina a 750 y 500 ppm y de Agrimycin 100, los resultados fueron iguales, ya que en las tres plantas con marchitez ligera de las hojas inferiores permanecieron igual, es decir, la enfermedad paró su desarrollo, por lo que se determinó no realizar la tercera aplicación, aunque en las otras tres plantas que manifestaban un grado de enfermedad más avanzada, el extracto de gobernadora y el Agrimycin 100 fueron incapaces de parar el desarrollo de la enfermedad, muriendo las tres plantas en todos los casos, lo cual indica que ambos productos son capaces de parar la enfermedad, pero sólo en ciertos niveles de su avance. De esta manera, se demostró que la resina de gobernadora presenta actividad sistémica, ya que pa-

Cuadro 4. Grado de ataque visual de *Pseudomonas solanacearum* en las plantas inoculadas, en tratamientos de invernadero con y sin resina de *Larrea tridentata*. según escala de Winstead y Kelman (1952). UAAAN. 1989.

Tratamientos	Repeticiones						Índice de la enfermedad en %
	I	II	III	IV	V	VI	
Testigo Natural	0	0	0	0	0	0	0
Testigo Absoluto	5	5	5	5	5	5	100.00
Testigo Etanólico	5	5	5	5	5	3	83.33
Agrimycin 100 + Tritón	2	2	2	5	5	5	49.99
Resina 750 ppm + Tritón	2	2	2	5	5	5	49.99
Resina 500 ppm + Tritón	2	2	2	5	5	5	49.99

ra poder controlar el avance de la enfermedad en las plantas la resina requirió de penetrar al interior de la planta, controlando la enfermedad, lo mismo sucede con el Agrimycin 100.

Así pues los mejores tratamientos para el control de *P. solanacearum* fueron el Agrimycin 100 y la resina de gobernadora a 750 y 500 ppm, en tanto que el testigo etanólico y el absoluto se comportaron como tales. En cambio, el testigo natural, que no fue inoculado, no presentó la enfermedad y sólo sirvió para observar la diferencia de las plantas en cuanto aparecieron los síntomas de la enfermedad.

El análisis de los resultados se hizo en un diseño de bloques al azar por medio de la prueba de Friedman, la cual detectó una diferencia estadística entre tratamientos al 1%.

CONCLUSIONES

La resina de gobernadora fracción etanólica presentó acción bactericida sobre *P. solanacearum* por un período de 60 días contados a partir de su extracción, con iguales resultados al Agrimycin 100, ya sea en refrigeración o en el medio ambiente.

Ningún adherente afecta el desarrollo de colonias de la bacteria *In vitro*, pero todos los adherentes presentan antagonismo sobre la acción bactericida de la resina de gobernadora a las dosis de 500 y 250 ppm. El tritón y el sponto 234 fueron los adherentes que *in vitro* no ejercieron efecto antagonista sobre la resina de gobernadora a 750 ppm.

En pruebas de invernadero, las dosis de resina a 750 y 500 ppm así como el Agrimycin 100 mostraron ser los mejores tratamientos con resultados iguales en el control del patógeno en las plantas inoculadas con *P. solanacearum*, por lo que se considera que dicho extracto presenta propiedades sistémicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Karim, A., M. Ashraf, y M.K. Bhatti. 1979. Studies of the essential oils of the family Umbeliferæ *Coriandrum sativum* L. oil of the seeds and the plant. Horticultural Abstracts. 51(7). Ref. 5,701.
- Maiti, D., C.R. Kole and C. Sen. 1985. Antimicrobial efficacy of some essential oils. Biological Abstracts. 80(4) Ref. 34,785.
- Velázquez, M.J.J. 1983. Evaluación del poder bactericida o bacteriostático de la resina de gobernadora contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *Erwinia atroseptica* y *Pseudomonas solanacearum*. Tesis de Licenciatura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 136 p.
- Winstead, N.N. y A. Kelman. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 42 (11): 628-634.
- Zalewski, J.C. y L. Sequeira. 1973. Inhibition of bacterial growth by extracts from potato tubers. Phytopathology 63(7): 942- 943.