



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

## **IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DEL ANILLO ROJO DEL AGAVE TEQUILERO (*Agave tequilana* Weber var. Azul)**

MIRIAM MEZO VILLALOBOS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DEL ANILLO ROJO DEL AGAVE TEQUILERO (*Agave tequilana* Weber var. Azul)**, realizada por la alumna: **Miriam Mezo Villalobos** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

---

Dr. Sergio Aranda Ocampo

ASESOR

---

Dr. David Espinoza Victoria

ASESOR

---

Dr. Daniel L. Ochoa Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2014

## IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DEL ANILLO ROJO EN EL AGAVE TEQUILERO

(*Agave tequilana* Weber var. Azul)

Miriam Mezo Villalobos, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

### RESUMEN

El cultivo del agave tequilero es parte de una larga tradición del estado de Jalisco, México. Esta actividad que culmina con la obtención del tequila, un tipo de mezcal tan característico, que se ha legislado su producción bajo la Denominación de Origen. La cadena producto agave-tequila es de suma importancia económica y social, no sólo para la región productora, sino para el país, dadas las elevadas cantidades de tequila que se exportan a todo el mundo. Esta investigación tuvo como objetivo principal identificar al agente causal del anillo rojo del agave, enfermedad que ocasiona la aparición de zonas corchosas de color rojo en las hojas, las cuales forman un cinturón alrededor de las mismas que las constriñe; con frecuencia se tiene un endurecimiento y retraso del crecimiento, que afecta la producción. A partir de muestras de tejido foliar tomadas durante el 2011 y el 2012 con los síntomas antes descritos, se aisló una bacteria. Mediante un enfoque polifásico que incluyó el análisis del perfil bioquímico y fisiológico, microscopía electrónica y la secuenciación del gen 16S ADNr con los iniciadores 8f y 1492R, genes de nucleación de hielo con los iniciadores inaF e inaR y los genes PagR y PagI con los iniciadores pagR-fw y pagI-rev, así como pruebas de patogenicidad en plantas de agave. Se determinó que *Pantoea agglomerans* es el agente causal del anillo rojo del agave tequilero.

**PALABRAS CLAVE:** *Pantoea agglomerans*, enfoque polifásico.

## IDENTIFICATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF THE RED RING OF THE BLUE AGAVE

(*Agave tequilana* Weber var. Azul)

Miriam Mezo Villalobos, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

### ABSTRACT

The crop of agave tequila is part of a long tradition of state of Jalisco, México. This activity culminates in the production of tequila, mezcal with such a characteristic, that its production has legislated under the Denomination of Origin. This agave-tequila product chain is very important economic and socially, not only for the producing region, but for Mexico, because of the high amounts of tequila exported worldwide. The main objective of this study was to identify the causative agent of the agave red ring, a disease that causes the appearance of red corky areas on the leaves of the agave, which form a belt around that constricts them, tightening and empooring the plant growth, affecting production. From samples of diseased vegetal tissue taken during 2011 and 2012, a bacterium was isolated. Using a polyphase approach that included a biochemical and physiological profile analysis, electron microscopy, the sequencing of the 16S rDNA gene with primers 8F and 1492R, the ice nucleation genes with the inaF and inaR primers, and the *quorum sensing* regulatory genes PagR and PagI with pagR-fw and PagI-rev primers, and the pathogenicity tests on agave plants. It was determinaded that *Pantoea agglomerans* is the causative agent of the red ring of the blue agave.

**KEY WORDS:** *Pantoea agglomerans*, polyphase approach.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento otorgado durante la realización de mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por las facilidades brindadas para continuar con mi preparación profesional.

Al Dr. Leopold Fucikovsky (q. e. p. d.), porque durante el breve tiempo que lo conocí y conviví con él, se comportó siempre como una gran persona, además de ser un buen maestro.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo, por todos los consejos, por la confianza y las enseñanzas. Gracias por el empeño puesto para llevar esta investigación a buen término.

Al Dr. David Espinoza Victoria, por los buenos consejos y aportar una visión diferente, gracias por el apoyo y las enseñanzas.

Al Dr. Daniel Ochoa Martínez, por todas las observaciones hechas desde el primer borrador del anteproyecto, han sido muy valiosas.

Gracias al Sr. Carlos Martínez por el apoyo en el laboratorio, por los consejos y las pláticas.

A Magnolia y Ana María, sin su ayuda y apoyo, los últimos meses habrían sido muy complicados, muchas gracias por su amistad.

*Para Luís, gracias por el apoyo incondicional*

*Para Camila y Juan Emilio, gracias por la motivación*

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Pantoea agglomerans</i> ASOCIADA A PLANTAS DE AGAVE TEQUILERO CON SÍNTOMAS DE ANILLO ROJO</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
1.2.1 Sitios de muestreo de material vegetal de <i>Agave tequilana</i> .....	13
1.2.2 Aislamiento de bacterias a partir de tejido de agave con síntomas de anillo rojo.....	15
1.2.3 Inducción de reacción de hipersensibilidad en tabaco.....	15
1.2.4 Evaluación de patogenicidad en bulbos de cebolla.....	16
1.2.5 Crecimiento en medio semi-selectivo PA20 .....	16
1.2.6 Caracterización fisiológica y bioquímica.....	17
1.2.7 Observación de colonias bacterianas con microscopía electrónica de barrido (MEB).....	17
1.3.8 Observación de tejido de agave con síntomas de anillo rojo con microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	18
<b>1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>20</b>
1.3.1 Incidencia de la enfermedad .....	20
1.3.2 Aislamiento de bacterias a partir de tejido de agave con síntomas de anillo rojo.....	21
1.3.3 Inducción de reacción de hipersensibilidad en tabaco.....	23
1.3.4 Evaluación de patogenicidad en bulbos de cebolla.....	25
1.3.5 Crecimiento en medio semi-selectivo PA20 .....	26
1.3.6 Caracterización fisiológica y bioquímica.....	28
1.3.7 Observación de colonias con microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	30
1.3.8 Observación de tejido de agave con síntomas de anillo rojo con microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	31
<b>1.4 LITERATURA CITADA</b> .....	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DE <i>Pantoea agglomerans</i> COMO AGENTE CAUSAL DEL ANILLO ROJO EN EL AGAVE TEQUILERO (<i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul)</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
2.2.1 Obtención e identificación de las cepas .....	47
2.2.2 Inoculación en plantas sanas de agave.....	47
2.2.3 Reaislamiento bacteriano a partir de plantas inoculadas .....	50
<b>2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
2.3.1 Inoculación en plantas sanas de agave.....	52
2.3.2 Reaislamiento bacteriano a partir de plantas inoculadas .....	55
<b>2.4 LITERATURA CITADA</b> .....	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE <i>Pantoea agglomerans</i>, AGENTE CAUSAL DEL ANILLO ROJO DEL AGAVE TEQUILERO</b> .....	<b>59</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>61</b>
<b>3.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>64</b>
3.2.1 Obtención de las cepas.....	64
3.2.2 Extracción de ADN de las cepas bacterianas .....	64
3.2.3 Amplificación de genes <i>ina</i> con iniciadores específicos para <i>Pantoea ananatis</i> .....	65
3.2.4 Amplificación de genes <i>PagRI</i> con iniciadores específicos para <i>Pantoea agglomerans</i> .....	65
3.2.5 Amplificación del gen 16s ribosomal de <i>Pantoea agglomerans</i> .....	66
3.2.6 Secuenciación de los genes <i>PagRI</i> y del gen 16S ribosomal .....	67
<b>3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>67</b>

3.3.2 Amplificación de genes PagRI con iniciadores específicos para <i>Pantoea agglomerans</i> y del gen 16s ribosomal.....	67
3.3.3 Secuenciación de los genes PagRI y del gen 16S ribosomal .....	69
<b>3.4 LITERATURA CITADA .....</b>	<b>69</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>73</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>74</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1.</b> Composición del medio de cultivo semi-selectivo PA 20, para <i>P. ananatis</i> .....	16
<b>Cuadro 1.2.</b> Resultados de los ensayos bioquímicos realizados con las cepas PA7, PA11 y PA13, comparadas con los resultados esperados para <i>Pantoea ananatis</i> y <i>P. agglomerans</i> .....	28
<b>Cuadro 2.1.</b> Tratamientos y métodos de inoculación en plantas de agave de las cepas PA7 y PA11 de <i>P. agglomerans</i> .....	48
<b>Cuadro 3.1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Pantoea agglomerans</i> .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Mapa de localización de los municipios de Arandas y Tequila, Jalisco, México.	14
<b>Figura 1.2.</b> Planta de agave tequilero con síntomas típicos de anillo rojo: reducción del crecimiento y lesiones rojizas en varias hojas. Las plantas adyacentes a la planta enferma son asintomáticas.....	20
<b>Figura 1.3.</b> Plantas seccionadas de agave para el aislamiento de bacterias.....	21
<b>Figura 1.4.</b> Colonias de la bacteria aislada de las plantas de agave con síntomas de anillo rojo, creciendo en medio YP. El centro de las colonias se observa más oscuro y corresponde a las simplasmata. ....	23
<b>Figura 1.5.</b> Hoja de tabaco infiltrada con la bacteria problema y los testigos. La suspensión acuosa de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> produjo la reacción de hipersensibilidad .....	24
<b>Figura 1.6.</b> Bulbo de cebolla inoculado con la cepa bacteriana PA7. ....	25
<b>Figura 1.7.</b> Crecimiento bacteriano en el medio de cultivo PA20, donde se observa la presencia de inclusiones de color oscuro en el centro de las colonias. ....	27
<b>Figura 1.8.</b> Simplasmata de colonias de las cepas PA7, PA11 y PA13 observadas con el microscopio electrónico de barrido .....	31
<b>Figura 1.9.</b> Tejido de plantas de agave sana y con síntomas de anillo rojo .....	32
<b>Figura 1.10.</b> Degradación de la pared de una célula de tejido de agave con síntomas de anillo rojo.. ....	32
<b>Figura 2.1.</b> Método de inoculación por inyección de una suspensión bacteriana de <i>P. agglomerans</i> a una concentración de $3 \times 10^8$ ufc/mL en la base de la planta de agave. ....	49
<b>Figura 2.2.</b> Método de inoculación por aspersión foliar de una suspensión bacteriana de <i>P. agglomerans</i> a una concentración de $3 \times 10^8$ ufc/mL. ....	50
<b>Figura 2.3.</b> Método de incubación de las plantas inoculadas, sin cubierta plástica y con cubierta plástica.....	50

<b>Figura 2.4.</b> Tratamiento 1 en planta de agave: inoculación por inyección con la cepa PA7 en la base de la planta e incubación por 24 h antes de la inoculación en cámara húmeda..	53
<b>Figura 2.5.</b> Tratamiento 2 en planta de agave: incubación 24 h en cámara húmeda y posterior inoculación con la cepa PA11 por inyección de suspensión bacteriana en la base de la planta.	54
<b>Figura 2.6.</b> Tratamiento 3 en planta de agave: inoculación con agua destilada estéril inyectada después de incubarse 24 h en cámara húmeda.....	54
<b>Figura 2.7.</b> Tejido de planta inoculada con tratamiento 1 sembrada en AN después de desinfectarse con hipoclorito de sodio al 1 %, o ser enjuagada sólo con agua destilada estéril.....	56
<b>Figura 2.8.</b> Morfología de las colonias bacterianas reisladas de las plantas de agave inoculadas con <i>P. agglomerans</i> que presentaron síntomas de anillo rojo. ....	56
<b>Figura 3.1.</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR con los iniciadores pagR-fw y pagl-rev de las muestras de ADN de las cepas de <i>P. agglomerans</i> aisladas de plantas de agave tequilero con síntomas de anillo rojo..	68

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo del agave tequilero es uno de los más importantes en el estado de Jalisco, México. Esta actividad da trabajo directo a más de 33 mil personas, y cerca de 300 mil empleos en toda la cadena productiva agave-tequila (CRT, 2004). En 2013 se cosecharon más de 756 mil toneladas de agave para la obtención de tequila. El consumo de esta bebida ha ocasionado el alza de la producción del cultivo en los últimos años, con 615 mil toneladas cosechadas en el 2000 y alrededor de un millón de toneladas 2007 y el 2011 (CRT, 2010b). Por otra parte, existe la posibilidad de emplear el resto de la planta para obtener alimento de buena calidad para el ganado, azúcares, fibra y papel (Íñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001a, 2001b;). Incluso, la planta se ha usado como medio de cultivo para la obtención de enzimas extracelulares de importancia comercial a partir de hongos (Huitron *et al.*, 2008).

Hace más de 200 años que el agave tequilero se cultiva en México, concentrándose la mayor parte de la producción en el estado de Jalisco, a causa de la denominación de origen del tequila. Durante todo este tiempo, pocas modificaciones se habían realizado al sistema de cultivo del agave y al de obtención de tequila. Fue hasta la última década del siglo pasado que se incrementó enormemente la demanda de esta bebida en el mercado nacional así como en el extranjero. Lo anterior propició que el agave tequilero haya recibido mayor apoyo para la investigación y desarrollo tecnológico, logrando con ello una mejora en la productividad y calidad del cultivo. Con esto se ha conseguido abastecer el creciente mercado del tequila sin dejar de respetar las limitaciones que marca la denominación de origen (CRT, 2004).

El género *Agave* es uno de los más representativos de la flora mexicana, y muchas de sus especies han sido fundamentales en el desarrollo de la cultura mexicana. Se le ha utilizado como

alimento, fibra, medicinal, en la construcción, etc., además de la obtención de bebidas alcohólicas. Al igual que ha sucedido con otras plantas que son de interés para el humano, los agaves han pasado por un largo proceso de selección, en el que las plantas que mejor sirvieran a sus propósitos son conservadas mientras se desechan aquellas que parecen no tener alguna utilidad. Debido a que la multiplicación del agave tequilero es asexual se ha incrementado progresivamente su vulnerabilidad al ataque de todo tipo de enfermedades, plagas y, en general, ante cualquier factor de cambio en su ambiente (CRT, 2004; Rodríguez-Garay, 2004; Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villareal, 2007; Vargas-Ponce *et al.*, 2007).

Entre las plagas que es posible encontrar en las plantaciones de agave tequilero se encuentran la gallina ciega (*Phyllophaga* spp., *Cyclocephala* spp.), el escarabajo rinoceronte (*Strategus aloeus* L.), el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*), el cerambicido del agave (*Acanthoderes funerarius*), el piojo harinoso (*Pseudococcus* sp.), la escama armada (*Acutaspis agavis*) y la chinche del agave (*Caulatops agavis*), entre otros (Pérez-Domínguez y Rubio-Cortés, 2007).

Las enfermedades que afectan al cultivo son la mancha gris o tizón foliar ocasionado por *Cercospora* sp. (Ayala-Escobar y Yañez-Morales, 2004), la mancha anular producida por *Didymosphaeria* sp. (Virgen-Calleros, 2005), la pudrición del cogollo ocasionada por *Bacillus pumilus* (Ceen-Caamal, 2012), la marchitez por *Fusarium oxysporum* (Castañeda-Vásquez, 2002), la mancha foliar por *Rhizoctonia solani*, *Botryodiplodia* sp. y *Didymosphaeria* sp. (Rubio-Cortés, 2007) y el anillo rojo de etiología desconocida.

De acuerdo con datos del Consejo Regulador del Tequila (CRT, 2010a), la enfermedad del anillo rojo se presenta en cinco de las seis zonas en que se divide el territorio del estado de Jalisco: Los

Altos, el Centro, la Ciénega, Tequila y el Sur, la única región donde no se ha reportado es en los Valles. En el periodo comprendido entre los años 2006 y 2008, la incidencia de esta enfermedad ha sido mayor en la zona de Los Altos (3,3 %) y del Sur (4 %). Flores-López *et al.* (2002) señalan que además de Los Altos y el Sur de Jalisco, este problema se presenta también en el sur de Nayarit.

La enfermedad se caracteriza por causar zonas corchosas de color rojizo en las hojas, que comienzan en los márgenes en las zonas de las espinas, creciendo hacia el centro hasta coalescer, tanto en el haz como en el envés, formando un cinturón que estrangula la hoja. Las hojas afectadas se endurecen, y posteriormente el resto de la planta también se torna más rígida, deteniendo su crecimiento y tomando un aspecto arrosetado (Virgen-Calleros, 2005; Rubio-Cortés, 2007; Fucikovsky, 2011, comunicación personal). Las plantas afectadas al no alcanzar el tamaño requerido por la industria, no se cosechan, con lo que se reduce la producción y el ingreso monetario del productor, además de constituir una fuente de inóculo secundaria (Fucikovsky, 2011, comunicación personal).

Durante mucho tiempo se ha sostenido que la enfermedad es de naturaleza abiótica, debida a un desbalance nutrimental (Valenzuela-Zapata, 1997; Rubio-Cortés, 2007; Ávila-Miranda, 2011). Por otro lado, Fucikovsky y Aranda-Ocampo (2006) señalan que el agente causal es *Pantoea ananatis*, al comprobar su patogenicidad, cumplir los postulados de Koch y analizar los perfiles bioquímicos de esta bacteria.

*Pantoea ananatis* es citado como el agente causal del marmoleado del fruto de la piña (Mergaert *et al.*, 1993; CAB International, 2007). Esta especie posee alta diversidad genética y ecológica. Algunas cepas pueden actuar como agentes de control biológico, por su capacidad de

infectar las uredias de *Puccinia graminis* (De Baere *et al.*, 2004). Otras tienen actividad antagónica *in vitro* contra *Alternaria solani* y *Fulvia fulva*, hongos patógenos del jitomate (Enya *et al.*, 2007). Algunas cepas de esta especie pueden formar núcleos de hielo y han sido usadas en el control de larvas cuando colonizan el intestino de las mismas (Watanabe y Sato, 1999); *P. ananatis* puede actuar también como patógeno humano oportunista (De Baere *et al.*, 2004). Esta bacteria se ha reportado como patógeno de diversos cultivos alrededor del mundo, entre los que destacan cebolla (Gitaitis y Gay, 1997; Schwartz y Otto, 2000), pasto Sudán (Azad *et al.*, 2000), maíz, sorgo (Bomfeti *et al.*, 2008; Pérez-y-Terrón *et al.*, 2009; Alippi y López, 2010; Lana *et al.*, 2012), melón (Kido *et al.*, 2008) y arroz (Yan *et al.*, 2010) entre otros. Brady *et al.* (2009) menciona que algunas de las cepas aisladas de maíz y eucalipto son especies nuevas diferentes de *P. ananatis*.

*Pantoea ananatis* es una bacteria Gram negativa, que forma colonias amarillas con la capacidad de crecer en condiciones anaerobias, producen indol y catalasa, carecen de actividad oxidasa, no reduce nitratos y utiliza sorbitol, inositol, melibiosa, maltosa, manitol, arabinosa, celobiosa, lactosa, glicerol, galactosa, sacarosa, trehalosa, lactato y citrato; no puede utilizar dulcitol, adonitol,  $\alpha$ -metil-D-glucósido, dextrina, tartrato ni malonato (Kido *et al.*, 2008).

*Pantoea agglomerans* es una especie que en los últimos años ha sido identificada cada vez con mayor frecuencia en cultivos de cebolla (Edens *et al.*, 2006) y algodón (Medrano y Bell, 2007) en Estados Unidos; en nogales en China (Yang *et al.*, 2011); y maíz y sorgo en México (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007). Algunas cepas de *P. agglomerans* son benéficas, como la cepa YS19 que promueve el crecimiento del arroz (Feng *et al.*, 2005). Fujikawa y Akimoto (2011) han estudiado una cepa de *P. agglomerans* capaz de producir un pigmento azul en determinadas densidades

celulares y temperaturas específicas, que puede ser empleado como un indicador de temperatura. *P. agglomerans* es el ingrediente activo de varios productos comerciales recomendados para el control de *Erwinia amylovora*, causante del tizón de fuego en las pomáceas (Nunes *et al.*, 2001; Pusey *et al.*, 2008; Pusey y Wend, 2012; Johnson y Temple, 2013). En humanos, *P. agglomerans* puede ser un patógeno oportunista, y causar síntomas muy severos (Kratz *et al.*, 2003; Paik-Seong *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2012). Estudios recientes demuestran que las cepas de *P. agglomerans* aisladas de humanos tienen poca relación genética con la cepa tipo LMG 1286 (Rezzonico *et al.*, 2009). Los iniciadores específicos para cepas altamente relacionadas con la cepa tipo de *P. agglomerans* LMG 1286, lograron diferenciar entre las cepas aisladas de plantas de aquellas procedentes de hospitales. Estas últimas no estuvieron relacionadas filogenéticamente con la cepa tipo, por lo que la identificación de esta especie considerando únicamente sus características fenotípicas ha sido incorrecta, especialmente en el caso de cepas muy semejantes a *P. agglomerans* aisladas de humanos.

Una de las características más sobresalientes de esta bacteria, es la formación de estructuras llamadas simplasmata. Un simplasmatum es un agregado de al menos dos células y hasta cientos de ellas, unidas fuertemente (Feng *et al.*, 2005). *P. agglomerans* es un bacilo Gram negativo, móvil, capaz de utilizar urea y arabinosa, positivo a la catalasa y malonato; negativo a oxidasa, lisina, producción de indol y uso de lactosa; además produce un pigmento amarillo en agar nutritivo (Fujikawa y Akimoto, 2011).

Resulta complicado diferenciar especies del género *Pantoea* con base en su fenología, ya que por ejemplo *P. agglomerans* y *P. dispersa* se diferencian únicamente por dos características, la

capacidad de utilizar malonato y eritritol (Gavini *et al.*, 1989). Las características morfológicas de las colonias de ambas especies son muy parecidas y *P. agglomerans* es la única que forma simplasmata (Feng *et al.*, 2005).

Con base en lo anterior, el presente estudio tuvo los siguientes objetivos:

- a) Caracterizar e identificar a la bacteria asociada al anillo rojo del agave tequilero con un enfoque polifásico basado en la caracterización de perfiles fisiológicos y bioquímicos, microscopía electrónica y genética molecular.
- b) Determinar la patogenicidad de la bacteria.

## **CAPÍTULO I. Aislamiento e identificación de *Pantoea agglomerans* asociada a plantas de agave tequilero con síntomas de anillo rojo**

Miriam Mezo-Villalobos, Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, David Espinosa-Victoria, Colegio de Postgraduados, Programa de Edafología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez y Sergio Aranda-Ocampo, Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230. Correspondencia: [saranda@colpos.mx](mailto:saranda@colpos.mx).

### **Resumen**

Durante los años 2011 y 2012 se realizaron muestreos en plantaciones de agave tequilero ubicadas en los municipios de Arandas y Tequila, Jalisco, con el objetivo de obtener tejido foliar de plantas con síntomas de crecimiento deficiente y marcas corchosas de color rojo en forma de cinturón rodeando las hojas; asociados a la enfermedad denominada anillo rojo. Se analizaron 80 muestras en el laboratorio de bacteriología del Colegio de Postgraduados, de las cuales se aisló en forma consistente una bacteria cuyo perfil y características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas coinciden en un alto porcentaje con *Pantoea agglomerans*. Hasta donde los autores tienen conocimiento, este es el primer reporte de *P. agglomerans* asociada a la enfermedad denominada “anillo rojo” del agave tequilero.

Palabras clave adicionales: *Pantoea agglomerans*, *Agave tequilana* Weber var. Azul, enfoque polifásico.

## **Abstract**

During the years 2011 and 2012 surveys were conducted in blue agave plantations located in the towns of Arandas and Tequila, Jalisco, in order to obtain samples of plant material of agave with symptoms like poor growth and red corky areas forming a belt around the leaves. 80 samples were analyzed in the laboratory of bacteriology of the Colegio de Postgraduados, from which a bacterium was isolated consistently whose profile and morphological, physiological and biochemical characteristics coincide in a high percentage with *Pantoea agglomerans*. As far as the authors are aware, this represents the first report of the presence of *P. agglomerans* associated with the disease called red ring of agave tequila.

Additional keyword: *Pantoea agglomerans*, *Agave tequilana* Weber var. Azul, polyphase approach.

## **1.1 INTRODUCCIÓN**

El agave tequilero es un cultivo de gran importancia en el estado de Jalisco donde ocupa el cuarto lugar en superficie con una producción que asciende a más de 1.5 millones de pesos (SIAP, 2014). Su cultivo da trabajo directo a más de 33 mil personas, y se emplean aproximadamente 300 mil trabajadores en toda la cadena productiva agave-tequila (CRT, 2004). Este cultivo enfrenta actualmente una serie de problemas fitosanitarios ocasionados principalmente por la reproducción asexual que se practica desde hace más de 200 años. Uno de estos problemas es la enfermedad conocida como el anillo rojo del agave tequilero (CRT, 2004), la cual se presenta en casi toda la zona del estado de Jalisco: Los Altos, el Centro, la Ciénega, Tequila y el Sur. La única región donde no se ha reportado esta enfermedad es en los

Valles. De 2006 a 2008, se tuvo una alta incidencia de plantas con síntomas en las zonas de Los Altos (3,3%) y del Sur (4%) (CRT 2010). Este problema se ha observado también en el sur de Nayarit (Flores-López *et al.*, 2002).

Esta enfermedad se caracteriza por causar lesiones corchosas de color rojizo en las hojas, que comienzan en los márgenes en las zonas de las espinas, y crecen hacia el centro hasta coalescer, avanzando tanto en el haz como en el envés, formando un cinturón que estrangula la hoja. Las hojas con estos síntomas se endurecen y con el paso del tiempo también lo hace el resto de la planta, deteniendo su crecimiento y tomando un aspecto arrosado (Virgen, 2005; Rubio-Cortés, 2007; Fucikovsky, 2011, comunicación personal).

Algunas investigaciones sugieren que la enfermedad es debida a un desbalance nutrimental (Valenzuela-Zapata, 1997; Rubio-Cortés, 2007; Ávila-Miranda, 2011). Por su parte, Fucikovsky y Aranda-Ocampo (2006) señalan a *Pantoea ananatis* como el agente causal, al determinar su patogenicidad y cumplir con los postulados de Koch en plantas de agave. Sin embargo, la identificación de la bacteria se fundamentó primordialmente en algunas expresiones fenotípicas y la caracterización de perfiles fisiológicos y bioquímicos. Existe muy poca información disponible acerca de la detección eficiente de este patógeno, su variabilidad genética y su rango de hospedantes alternos en diferentes patosistemas.

Diferentes especies del género *Pantoea* han sido citadas con mayor frecuencia en los últimos años y han llegado a ser fitopatógenos importantes. Dentro de este contexto, *Pantoea ananatis* infecta a un amplio rango de cultivos económicamente valiosos en todo el mundo y es considerado como un patógeno emergente debido a su gran virulencia en muchas especies monocotiledóneas y dicotiledóneas (Coutinho y Venter, 2009). *P. ananatis* es citado como el

agente causal del marmoleado del fruto de la piña (Mergaert *et al.*, 1993; CAB International, 2007) y se ha reportado infectado pastos (Gitaitis *et al.*, 2002) y plántulas de maíz (Rijavec *et al.*, 2007); en sorgo causa manchas blancas en las hojas (Cota *et al.*, 2010); se trata de una especie bastante diversa genotípica y ecológicamente; se ha encontrado colonizando la rizósfera de genotipos de maíz altamente eficientes en la asimilación de fósforo (Oliveira *et al.*, 2009). Algunas cepas se han usado como agentes de control biológico por su capacidad de infectar las uredias de *Puccinia graminis* (De Baere *et al.*, 2004) y otras por tener actividad antagónica *in vitro* contra *Alternaria solani* y *Fulvia fulva*, hongos patógenos del jitomate (Enya *et al.*, 2007). Otras cepas forman núcleos de hielo lo que permite usarlas en el control de larvas cuando colonizan el intestino de las mismas (Watanabe y Sato, 1999). Existen cepas que incluso son patógenas oportunistas en el ser humano (De Baere *et al.*, 2004). Las cepas fitopatógenas se han en diversos cultivos alrededor del mundo, entre los que destacan la cebolla (Gitaitis y Gay, 1997; Schwartz y Otto, 2000), pasto Sudán (Azad *et al.*, 2000), maíz, sorgo (Bomfeti *et al.*, 2008; Pérez-y-Terrón *et al.*, 2009; Alippi y López, 2010; Lana *et al.*, 2012), melón (Kido *et al.*, 2008), y arroz (Yan *et al.*, 2010) entre otros. Brady *et al.* (2009) mencionan que algunas de las cepas aisladas de maíz y eucalipto no son de *P. ananatis*, sino que se trata de especies nuevas. No obstante, existe evidencia visual y molecular de que *P. ananatis* es la causante de la mancha blanca del maíz en Brasil. Bomfeti *et al.* (2008) realizaron una investigación para corroborar la identidad del agente causal de esta enfermedad, que se atribuía tanto a *P. ananatis* como a un complejo de hongos fitopatógenos. Mostraron evidencias fenológicas, moleculares y cumplimiento de los postulados de Koch, así como su localización en los espacios intercelulares del tejido enfermo utilizando la microscopía electrónica de transmisión (MET).

*Pantoea ananatis* es una bacteria Gram negativa que forma colonias amarillas con la capacidad de crecer en condiciones anaerobias y de producir indol y catalasa; sin actividad oxidasa, no reduce nitratos ni induce reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco; utiliza sorbitol, inositol, melibiosa, maltosa, manitol, arabinosa, celobiosa, lactosa, glicerol, galactosa, sacarosa, trehalosa, lactato y citrato; no utiliza dulcitol, adonitol,  $\alpha$ -metil-D-glucósido, dextrina, tartrato ni malonato (Kido *et al.*, 2008).

*P. agglomerans* es otra especie perteneciente al mismo género que se ha identificado recientemente en varios cultivos como cebolla (Edens *et al.*, 2006) y algodón (Medrano y Bell, 2007) en Estados Unidos, nogal en China (Yang *et al.*, 2011) y maíz y sorgo en México (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007). Existen cepas de esta especie que han demostrado ser benéficas (Feng *et al.*, 2005; Fujikawa y Akimoto, 2011). *P. agglomerans* es el ingrediente activo de varios productos comerciales recomendados para el control de *Erwinia amylovora*, causante del tizón de fuego en las pomáceas (Nunes *et al.*, 2001; Pusey *et al.*, 2008; Pusey y Wend, 2012; Johnson y Temple, 2013). En humanos puede presentarse como patógeno oportunista ocasionando síntomas que pueden ser muy severos (Kratz *et al.*, 2003; Paik-Seong *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2012). Sin embargo, estudios recientes de Rezzonico *et al.* (2009) demuestran que las cepas aisladas de humanos en realidad están poco relacionadas genéticamente con la cepa tipo de *P. agglomerans* LMG 1286. Además, estos autores exponen la dificultad existente para identificar correctamente esta especie con base en sus características fenotípicas.

*Pantoea agglomerans* es un bacilo Gram negativo, móvil, capaz de utilizar la urea y arabinosa, positivo a la catalasa y malonato; negativo a la oxidasa, lisina, producción de indol, uso de

lactosa y a la inducción de la reacción de hipersensibilidad en tabaco. Además produce un pigmento amarillo cuando crece en agar nutritivo (Kido *et al.*, 2008; Fujikawa y Akimoto, 2011).

Como ya se ha mencionado anteriormente, resulta complicado diferenciar entre las especies del género con base en su fenología, *e. g.*, *Pantoea agglomerans* y *P. dispersa* se diferencian únicamente por dos características, la capacidad de utilizar malonato y eritol (Gavini *et al.*, 1989). Las características morfológicas de las colonias son muy parecidas entre ellas, sin embargo, en el caso particular de *P. agglomerans* la principal característica distintiva es la presencia de estructuras llamadas simplasmata en las colonias (Euzéby, 1997; Parte, 2014). Un simplasmatum es un agregado de al menos dos células y hasta cientos de ellas, unidas fuertemente (Feng *et al.*, 2005).

En observaciones hechas con el microscopio electrónico de barrido (MEB) se muestran las células individuales y los simplasmata de *P. agglomerans* en medio líquido. Los simplasmata se diferencian del resto del crecimiento únicamente por ser conglomerados de células estrechamente unidas, del mismo tamaño y forma de las células individuales (Cook *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2010). Estos conglomerados no se observan en el caso de *P. stewartii* subsp. *stewartii* (Koutsoudis *et al.*, 2006).

Otra opción para diferenciar entre las especies de este género, es la utilización de medios selectivos. El medio semi-selectivo PA20 desarrollado por Goszczynska *et al.* (2006) fue diseñado para permitir el crecimiento casi exclusivo de *P. ananatis* a partir de muestras de semilla de cebolla. Con base en los resultados de esta investigación, en este medio de cultivo sólo hubo crecimiento de *P. ananatis* y *P. stewartii* subsp. *indologenes*, con diferencias en morfología de la colonia. De acuerdo con la evaluación hecha por Goszczynska *et al.* (2006),

otras especies y géneros bacterianos no observaron crecimiento en este medio, tales como *P. agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* y algunos saprófitos aislados de semillas de cebolla.

Regularmente *P. ananatis* y *P. agglomerans* no inducen una reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco; sin embargo, al inocular *Pantoea ananatis* en frutos de melón se ocasionó una pudrición blanda cuando la bacteria se hizo crecer en medio YP (extracto de levadura y peptona) (Kido *et al.*, 2008).

Con estos antecedentes, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar e identificar a las bacterias aisladas de tejido de agave tequilero en la zona de Denominación de Origen, con síntomas de anillo rojo, mediante el análisis de perfiles bioquímicos y fisiológicos, así como de microscopía electrónica.

## **1.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *1.2.1 Sitios de muestreo de material vegetal de Agave tequilana*

Se realizaron 3 muestreos (en julio y septiembre de 2011, y en julio de 2012) en los municipios de Arandas (20°42'N 102°18'O) y Tequila (20°52'58"N 103°50'12"O), en el estado de Jalisco (figura 1.1). Estos municipios fueron seleccionados debido a que la enfermedad del anillo rojo se presenta con mayor incidencia (Flores-López *et al.*, 2002). En el municipio de Tequila, únicamente se realizó el muestreo de material vegetal en el mes de julio de 2011, debido a la baja incidencia observada de la enfermedad en campo; en contraste, en Arandas se realizaron los tres muestreos dado que se observó una mayor incidencia de esta enfermedad en la zona productora.

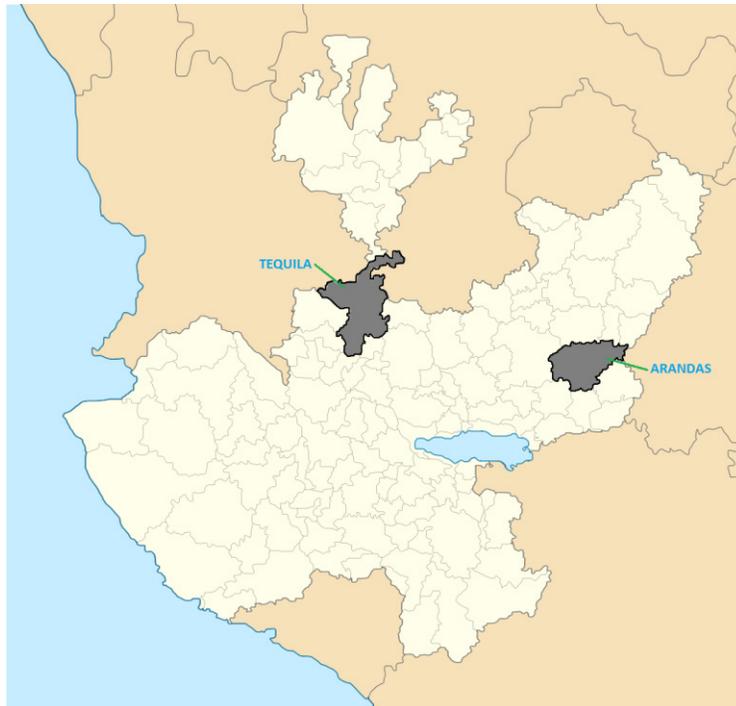


Figura 1.1. Mapa de localización de los municipios de Arandas y Tequila, Jalisco, México.

Se colectaron plantas que presentaban crecimiento deficiente, pudrición seca rojiza en forma de cinturón de 2 cm de ancho aproximadamente, que rodea y constriñe la penca a diferentes alturas. Se colectaron 20 plantas en cada muestreo y en cada localidad. Por otro lado, se colectaron hijuelos de entre 10 y 20 cm de altura, de plantas con síntomas con una pala de jardinería, así como plantas con síntomas de un año de edad, las cuales se pretendían utilizar para establecer nuevas plantaciones en la misma zona productora, las cuales fueron proporcionadas por el productor.

Las muestras tomadas se trasladaron al laboratorio de Laboratorio de Bacteriología del Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en bolsas de plástico etiquetadas con la fecha y lugar de la colecta.

### 1.2.2 Aislamiento de bacterias a partir de tejido de agave con síntomas de anillo rojo

Cinco plantas de cada muestreo y localidad fueron seleccionadas aleatoriamente a las cuales se les separaron todas las hojas. Las hojas con síntomas típicos de la enfermedad, se lavaron con agua destilada estéril y una vez eliminado el exceso de agua, se realizó una punción en la zona de avance de la infección con una aguja de disección previamente esterilizada por calor. Con esta muestra de tejido, se realizó un estriado en placas Petri con medio de cultivo agar nutritivo (AN). Las placas se incubaron a una temperatura de 28 °C durante 48 h.

### 1.2.3 Inducción de reacción de hipersensibilidad en tabaco

Del total de los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de tejido enfermo con morfología similar a *Pantoea* sp., se prepararon suspensiones de tres cepas diferentes (PA7, PA11 y PA13) en agua destilada estéril, a una concentración de  $10^8$  UFC/mL. Adicionalmente, se prepararon cultivos líquidos en medio YP (extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, agua 1000 mL, pH 6.8), de acuerdo con lo propuesto por Kido *et al.* (2008). Las tres cepas se sembraron por separado en tubos criogénicos que contenían 1 mL del medio de cultivo y se incubaron a 28 °C durante dos días antes de realizar la infiltración con una jeringa hipodérmica en las hojas de tabaco. Como testigo positivo se utilizó una suspensión de una cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de la colección del Laboratorio de Bacteriología del Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, a una de  $3 \times 10^8$  UFC/mL. Los testigos negativos consistieron de hojas de tabaco infiltradas con agua destilada estéril y medio YP.

Las plantas de tabaco infiltradas se mantuvieron a temperatura ambiente y se observaron entre las 24-48 h para registrar la reacción de hipersensibilidad.

#### 1.2.4 Evaluación de patogenicidad en bulbos de cebolla

Debido a que previamente se reportaron a *Pantoea agglomerans* y *P. ananatis* como patógenos de cebolla (Walcott *et al.*, 2002; Gitaitis *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2003; Edens *et al.*, 2006; Goszczyńska *et al.*, 2006), se realizó un ensayo para determinar si las cepas aisladas del agave con morfología similar a *Pantoea* sp. eran también patógenas de la cebolla.

Los bulbos de cebolla se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1%. La inoculación de éstos se realizó directamente mediante punción con palillos estériles con masa bacteriana de las cepas PA7, PA11 y PA13 con un crecimiento de 48 a 72 h a 28 °C. El testigo consistió de bulbos de cebolla punzados con un palillo estéril sin masa bacteriana. Se realizaron dos punciones en cada bulbo, una con masa bacteriana y otra sin ella; se establecieron tres repeticiones. Los bulbos se incubaron dentro de bolsas de plástico a 28 °C durante cinco días.

#### 1.2.5 Crecimiento en medio semi-selectivo PA20

La composición del medio se especifica en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1. Composición del medio de cultivo semi-selectivo PA 20, para *P. ananatis*.

Reactivo	g/L
NaCl	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Azul de bromotimol (solución acuosa al 1.6%)	1 mL
Cristal violeta (solución acuosa al 0.075%)	2 mL

Agar	15 g
D-arabitol	3 g
Nitrato de talio (solución acuosa al 1%)	2 mL
pH	8

El medio de cultivo se esteriliza a 121 °C/20 minutos. D-arabitol y nitrato de talio se esterilizan por filtración y se agregan posteriormente a una temperatura máxima de 50 °C.

### *1.2.6 Caracterización fisiológica y bioquímica*

La caracterización de las cepas PA7, PA11 y PA13 se realizó siguiendo los protocolos descritos por Lelliot y Stead (1987) y Schaad (1988). El programa de caracterización incluyó la evaluación de las cepas en la utilización de diferentes fuentes de carbono y actividad enzimática; todas ellas se realizaron por triplicado y con testigos sin inocular para usarse como referencia. Las pruebas que se llevaron a cabo fueron inducción de reacción de hipersensibilidad en tabaco, tinción de Gram, hidrólisis de almidón, hidrólisis de gelatina, catalasa, oxidasa, reducción de nitratos, producción de indol, metabolismo oxidativo-fermentativo, tolerancia a NaCl al 3, 4 y 5 %, utilización de arabinosa, arabitol, arbutina, arginina, celobiosa, dulcitol, aesculina, galactosa, glicerol, glucosa, lactosa, maltosa, manosa, manitol, melibiosa, rafinosa, trehalosa, valina y xilosa.

### *1.2.7 Observación de colonias bacterianas con microscopía electrónica de barrido (MEB)*

Para la observación de las características morfológicas de las células bacterianas, las cepas PA7, PA11 y PA13 se sembraron en placas de agar nutritivo (AN), y se incubaron a 28 °C durante 24 h.

Se seccionaron cubos de la placa de AN en donde se observaba crecimiento bacteriano incipiente y se mantuvieron inmersos en glutaldehído al 2.5% durante 24 h; posteriormente se enjuagaron tres veces con amortiguador de fosfatos de Sorensen, durante 5 minutos en cada enjuague. Las muestras se deshidrataron gradualmente con cambios cada hora de alcohol etílico a diferentes concentraciones, iniciando con 30% posteriormente 40, 50, 60 % y así sucesivamente, hasta el 100 %, donde permanecieron por una hora con cambios cada 20 min. Finalmente, las muestras se desecaon con CO<sub>2</sub> en una secadora de punto crítico Tousimis, modelo Samdri 780A a 0 °C durante 40 minutos.

Los portamuestras se pulieron, lavaron y secaron con alcohol y se les colocó en la superficie una tira de cinta conductiva de carbón, sobre la cual se montaron las muestras. En seguida, se recubrieron las muestras con una placa de oro-paladio usando una ionizadora Jeol modelo JFC-1100, al vacío durante 10 min.

Las muestras así preparadas, se observaron con un microscopio electrónico de barrido marca Jeol en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados.

### *1.3.8 Observación de tejido de agave con síntomas de anillo rojo con microscopía mlectrónica de transmisión (MET)*

Para saber si había bacterias en tejidos con anillo rojo se seleccionaron 3 pencas con zonas corchosas de color rojizo y diferentes niveles de severidad, en las cuales se seccionaron porciones de 0.5 x 0.5 cm en la zona de avance de la lesión. Como testigos, se seccionaron hojas sin síntomas de la misma edad. El tejido se preparó e incluyó siguiendo el protocolo empleado en la Central de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Para la fijación del material, se utilizó glutaraldehído al 6 %, durante 4 h, seguido de tres lavados con PBS (amortiguador de fosfatos) [0.1 M] pH 7.2, a intervalos de 15 min. Se continuó con el proceso de post-fijación en osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2 %, pH 7.2, dentro de una campana de extracción durante 2 h. Se dieron tres lavados con PBS a intervalos de 15 min. Se procedió con la deshidratación en una serie etanólica (etanol al 10 %, 30%, 50 %, 70%, 80 %, 90 % y 100%), con cambios cada 20 min, excepto para la concentración al 70 %, en donde se quedó el tejido toda la noche; al final se hicieron dos cambios de etanol al 100 %. Se realizó la inclusión en resina, para lo cual se hicieron pasar las muestras por un tren de preinclusión etanol absoluto-óxido de propileno (OP) en proporción 2:1, 1:1 y 1:2 y OP absoluto (15 min en cada cambio), pasando dos veces por OP absoluto. Después pasaron por el tren de inclusión en resina utilizando OP-resina, en proporción 2:1, 1:1 y 1:2 y resina pura, con cambios cada hora. Se pasó por resina pura dos veces y se refrigeró dos horas en el último cambio. Finalmente, se colocaron las muestras en los moldes para realizar cortes de 65 nm de grosor, con un ultramicrotomo. Los cortes se recogieron en una rejilla de cobre previamente montada con una membrana de formvar al 0.3 %, se dejaron secar y se almacenaron en cajas de Petri etiquetadas.

Las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo al 4 % y citrato de plomo. En tres cajas Petri forradas con papel aluminio y algodón humedecido, se colocaron piezas de parafilm de 2 x 2 cm pegadas al fondo. En la primera caja se colocó una gota de acetato de uranilo sobre el parafilm; en la segunda, una gota de agua destilada estéril; y en la tercera, una gota de citrato de plomo y unas lentejas de hidróxido de sodio. Las rejillas se hicieron pasar por el acetato de uranilo dejándolas inmersas durante 15 minutos; se transfirieron a la caja con la gota de agua y dejaron 15 minutos; finalmente, se pasaron a la caja con la gota de citrato de plomo, en donde

permanecieron durante 20 minutos. Se realizaron tres lavados en agua y se dejaron secar sobre papel filtro. Los reactivos se cambiaron entre muestra y muestra.

Las muestras se observaron al microscopio electrónico de transmisión Jeol modelo JEM-1010, en la Central de Microscopia de la ENCB del IPN.

### 1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1.3.1 Incidencia de la enfermedad

Durante los muestreos se observó que la incidencia de la enfermedad anillo rojo en las plantaciones del municipio de Tequila fue menor que en Arandas. Además, también fue bastante notorio que la distribución espacial de la enfermedad, cuando la incidencia es baja, es en manchones dispersos aleatoriamente en toda la plantación; es frecuente observar plantas con síntomas de manera aislada rodeada de plantas asintomáticas (Figura 1.2).



Figura 1.2. Planta de agave tequilero con síntomas típicos de anillo rojo (al centro): reducción del crecimiento y lesiones rojizas en varias hojas (flechas). Las plantas adyacentes a la planta enferma son asintomáticas.

En total se tuvieron 80 plantas en los cuatro muestreos (20 plantas/muestreo). Se seleccionaron 20 plantas para realizar los aislamientos. El resto de las plantas se trasplantaron en macetas de plástico con suelo estéril y se mantuvieron en invernadero durante el desarrollo de la investigación.

### 1.3.2 Aislamiento de bacterias a partir de tejido de agave con síntomas de anillo rojo

En algunos casos, los anillos de color rojizo se encontraban a la misma altura en todas las hojas de las plantas afectadas (Figura 1.3 A). En la mayoría de los casos, las lesiones en las hojas se encontraban a diferentes alturas, de manera consistente se observó que las hojas más jóvenes presentan el anillo rojo a mayor altura y en las hojas maduras la lesión se encuentra en la parte baja (Figura 1.3 B).

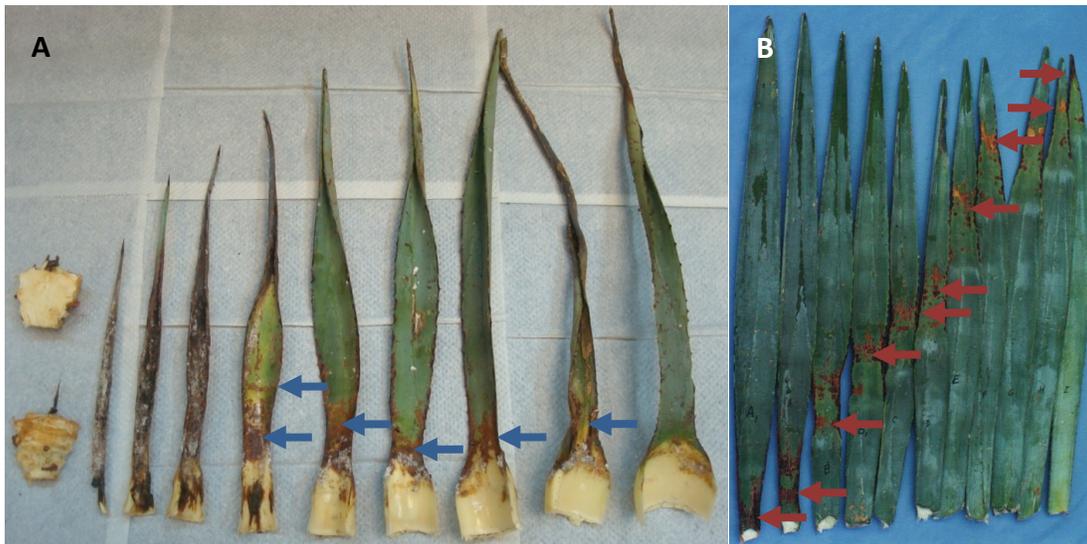


Figura 1.3. Plantas seccionadas de agave para el aislamiento de bacterias. Las flechas indican la localización de los anillos rojos de donde se hicieron los aislamientos. A) planta con anillos en la base de las hojas; B) hojas con los anillos distribuidos en diferentes niveles.

En todas las placas Petri con AN sembradas con el material obtenido de las plantas con síntomas de anillo rojo, se aislaron consistentemente bacterias, esporádicamente crecieron algunos hongos como contaminantes.

La bacteria obtenida consistentemente en todos los aislamientos formaba una colonia translúcida, amarillenta, pequeña, de borde liso, redonda y convexa, con simplasmata al centro (Figura 1.8), de apariencia más oscura que el resto de la colonia.

Cuando estas colonias bacterianas fueron transferidas al medio YP (extracto de levadura, peptona), el desarrollo de las simplasmata fue más notorio y el crecimiento más rápido, al tiempo que la colonia tomó un color amarillo más intenso pero manteniendo la misma forma que en el AN (Figura 1.4).

Las características de las colonias bacterianas obtenidas de tejidos con anillo rojo corresponden con las descritas para *Pantoea agglomerans* citadas en otras investigaciones, especialmente la presencia de las simplasmata, que son una característica de la especie que la distingue de otras que pertenecen al mismo género (Achouak *et al.* 1994; Feng *et al.*, 2003).

De esta característica proviene el nombre específico, *agglomerans* significa “formarse en una pelota” (Gavini *et al.*, 1989), haciendo alusión a la formación de las simplasmata que se observan en la colonia como una zona oscura consistente de conglomerados de bacterias que se encuentran estrechamente unidas.

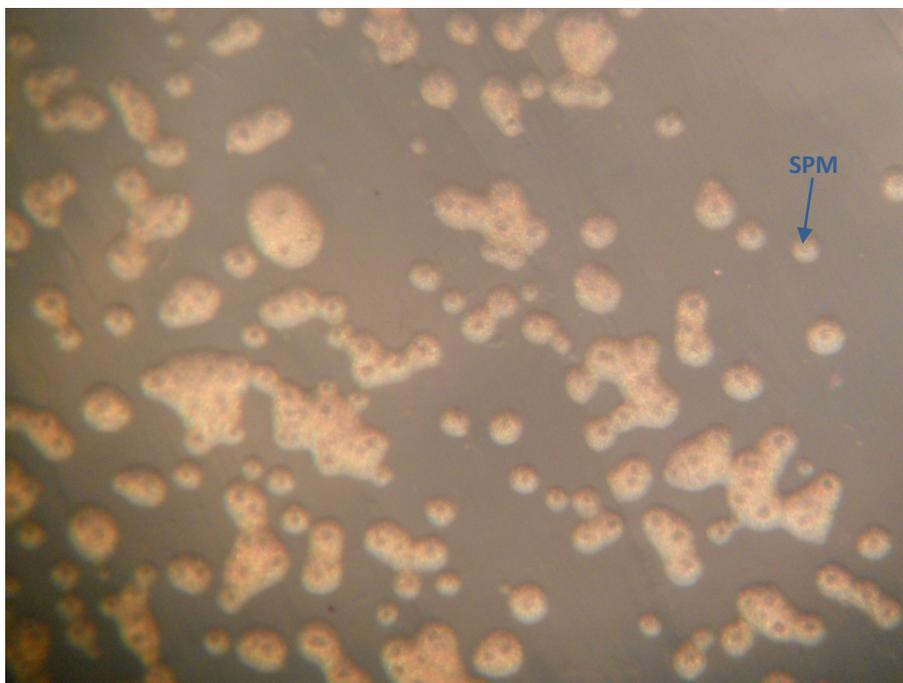


Figura 1.4. Colonias de la bacteria aislada de las plantas de agave con síntomas de anillo rojo, creciendo en medio YP. El centro de las colonias se observa más oscuro y corresponde a las simplasmata (SPM).

### 1.3.3 Inducción de reacción de hipersensibilidad en tabaco

La infiltración de la suspensión bacteriana con las tres cepas evaluadas no produjo reacción de hipersensibilidad en tabaco después de 48 h de la inoculación. Lo anterior se ha observado en infiltraciones hechas con *Pantoea agglomerans* (Kido *et al.*, 2008). La infiltración de las bacterias cultivadas en medio YP tampoco indujo una reacción de hipersensibilidad en tabaco (Figura 1.5). La infiltración de la suspensión acuosa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tabaco produjo la reacción de hipersensibilidad; la infiltración con agua destilada estéril y el medio YP, no la produjeron.

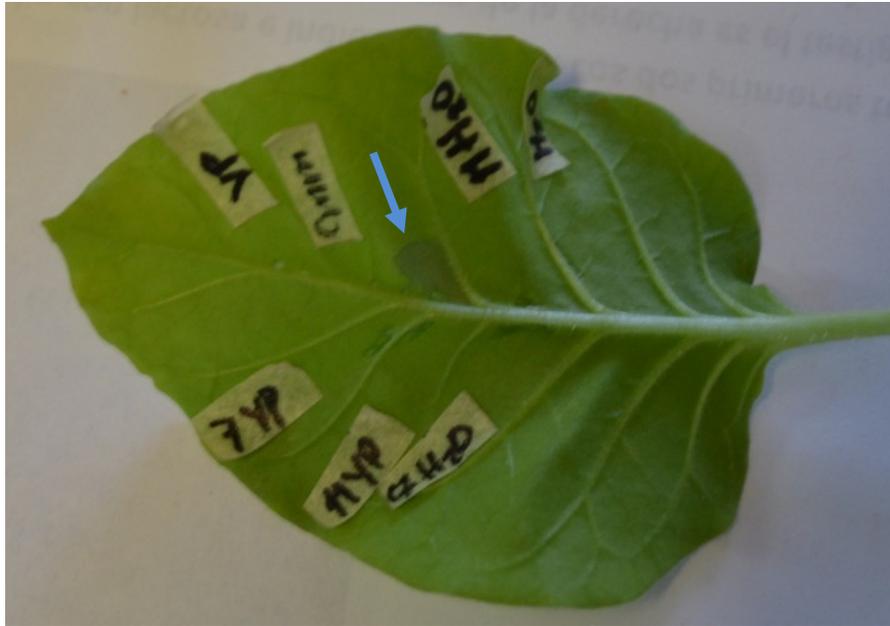


Figura1.5. Hoja de tabaco infiltrada con la bacteria problema y los testigos. La suspensión acuosa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* produjo la reacción de hipersensibilidad (flecha). 7YP = cepa PA7 en medio YP, 11YP = cepa PA11 en medio YP, 7H<sub>2</sub>O = cepa PA7 en suspensión acuosa, 11 H<sub>2</sub>O = cepa PA11 en suspensión acuosa, CMM = *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en suspensión acuosa, YP = medio YP sin inóculo bacteriano, H<sub>2</sub>O = agua destilada estéril.

Dado que se trata de patógenos emergentes, no se conoce del todo la genética de las bacterias del género *Pantoea*. Barash y Manulish-Sasson (2007) realizaron un estudio sobre los mecanismos de virulencia y la especificidad de hospedante de *P. agglomerans*, utilizando como modelos los patovares *gypsophila* y *betae*; Barash y Manulish-Sasson (2007) concluyeron que esta bacteria, hasta hace poco considerada epífita o endófita de una gran variedad de plantas, ha adquirido, mediante mecanismos aún desconocidos, una isla de genes que incluyen los genes *hrp* (de reacción de hipersensibilidad y patogenicidad) en un plásmido. Estos genes, de acuerdo con el mismo estudio, son de reciente evolución, considerando que se encuentran en un plásmido y no en el ADN cromosómico, además de ser muy diferentes a los genes *hrp* de otras especies bacterianas.

Que la bacteria no induzca la reacción de hipersensibilidad en tabaco, probablemente se deba a lo anteriormente expuesto. El mecanismo de inducción de la reacción de hipersensibilidad podría no estar suficientemente desarrollado, dado que originalmente la bacteria era endófito o epífita.

#### 1.3.4 Evaluación de patogenicidad en bulbos de cebolla

Los bulbos inoculados con las cepas aisladas de hojas de agave con anillo rojo presentaron una pudrición blanda de color café alrededor de la zona donde se indujo el palillo con masa bacteriana en cinco días después de la inoculación. Lo anterior no se observó en el caso de la punción con los palillos sin masa bacteriana (Figura 1.6). De los bulbos de cebolla con pudrición blanda, se realizaron estriados en medio de cultivo AN, obteniéndose consistentemente la cepa bacteriana original inoculada, cumpliendo de esta forma con los postulados de Koch.

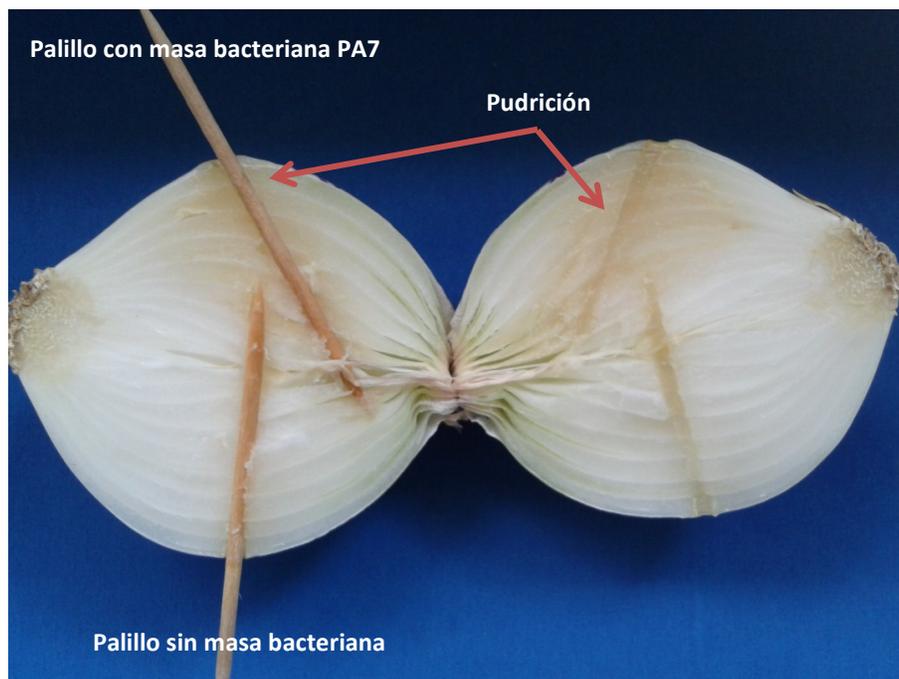


Figura 1.6. Bulbo de cebolla inoculado con la cepa bacteriana PA7.

Estos resultados demuestran que las cepas aisladas del agave son patógenos de la cebolla, al igual que algunas cepas de *Pantoea ananatis* y *P. agglomerans* de diferente origen, y que al menos parte de los mecanismos de virulencia expresados por estas cepas es de origen enzimático, primordialmente pectinolítico.

Existen reportes de *P. agglomerans* ocasionando daño en cebolla en Sudáfrica y en Estados Unidos (Hattingh y Walter, 1981; Edens *et al.* 2006). La cepa aislada en Sudáfrica ocasionó necrosis en el tallo de la inflorescencia, síntoma que difícilmente se produjo en invernadero cuando la bacteria se inoculó en bajas concentraciones en plantas sanas de cebolla. Por esta razón Hattingh y Walter (1981) atribuyeron el brote de la enfermedad en campo a la presencia en alta concentración de la bacteria sumada a las condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo de la misma. Edens *et al.* (2006) aislaron a *P. agglomerans* de bulbos de cebolla con pudrición blanda de coloración café en el centro y tizón, síntomas típicos de *P. ananatis*. Tomando en consideración la relación entre ambas bacterias y la similitud en los síntomas ocasionados, estos investigadores concluyeron que es probable que exista una asociación de ambas bacterias para conformar un complejo de pudrición central de la cebolla, como ocurre en el área de Georgia donde se han ubicado los aislamientos de estas especies.

#### *1.3.5 Crecimiento en medio semi-selectivo PA20*

Los aislados bacterianos cultivados en medio PA20 formaron colonias amarillas, brillantes, redondas, con presencia de inclusiones oscuras al centro (Figura 1.7). Dichas características resultan similares a las observadas en colonias de *P. ananatis* descritas por Goszczyńska *et al.*

(2006). Este resultado indicaría que las cepas aisladas de hojas de agave con anillo rojo corresponden a *P. ananatis*, ya que cepas de *P. agglomerans* evaluadas en esta investigación (tres en total y dos de ellas aisladas de cebolla) no crecieron en este medio semi-selectivo. Sin embargo, el reducido número de aislamientos de *P. agglomerans* evaluados (tres en total) puede ser una limitante para interpretar que todos los aislamientos de *P. agglomerans*, de diferente origen, se comporten de manera similar, independientemente de que el crecimiento o no en un medio semi-selectivo sea suficiente como herramienta confirmatoria de identificación. Adicionalmente, la formación de simplasmata en las colonias aisladas de agave en los medios AN y YP no corresponden con *P. ananatis*, sino con *P. agglomerans*, la cual se considera una característica distintiva y estable entre ambas especies.

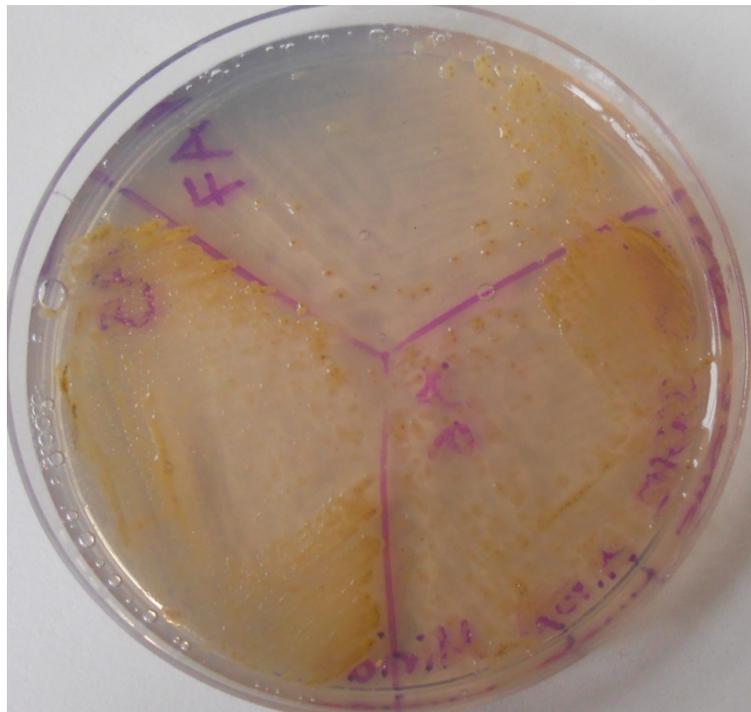


Figura 1.7. Crecimiento bacteriano en el medio de cultivo PA20, donde se observa la presencia de inclusiones de color oscuro en el centro de las colonias.

### 1.3.6 Caracterización fisiológica y bioquímica

Los resultados obtenidos a partir de estos ensayos se muestran en el Cuadro 1.2.

Cuadro 1.2. Resultados de los ensayos bioquímicos realizados con las cepas PA7, PA11 y PA13, comparadas con los resultados esperados para *Pantoea anantis* y *P. agglomerans*.

Ensayo	PA7	PA11	PA13	<i>P. agglomerans</i>	<i>P. anantis</i>
Tinción de Gram	-	-	-	-	-
Reacción de hipersensibilidad en suspensión acuosa	-	-	-	-	-
Reacción de hipersensibilidad con medio YP	-	-	-	ND	ND
Pudrición de papa	-	-	-	-	-
Pudrición de cebolla	+	+	+	V	V
Crecimiento en medio PA20	+	+	+	-	+
Oxidación/fermentación de glucosa	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	ND
Hidrólisis de gelatina	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	ND
Reducción de nitratos a nitritos	+	+	+	+	-
Producción de indol	-	-	-	-	+
Utilización de:					
Arabinosa	+	+	+	+	+
Arabitol	+	+	+	ND	+
Arbutina	+	+	+	+	ND
Arginina	-	-	-	-	-

Ensayo	PA7	PA11	PA13	<i>P. agglomerans</i>	<i>P. ananatis</i>
<b>Celobiosa</b>	-	+	-	V	+
<b>Dulcitol</b>	-	-	-	-	-
<b>Esculina</b>	-	-	-	+	ND
<b>Galactosa</b>	+	+	+	+	+
<b>Glicerol</b>	+	+	+	+	+
<b>Glucosa</b>	+	+	+	+	+
<b>Lactosa</b>	-	+	-	-	+
<b>Maltosa</b>	+	+	+	+	+
<b>Manosa</b>	+	+	+	+	ND
<b>Manitol</b>	+	+	+	+	+
<b>Melibiosa</b>	+	+	+	+	+
<b>Rafinosa</b>	-	+	+	+	+
<b>Trehalosa</b>	+	+	+	+	+
<b>Valina</b>	+	+	+	ND	ND
<b>Xilosa</b>	+	+	+	+	ND
<b>Tolerancia a:</b>					
<b>NaCl 3%</b>	+	+	+	+	-
<b>NaCl 4%</b>	+	+	+	+	-
<b>NaCl 5%</b>	+	+	+	+	-

V = Reacciones variadas; + = reacción positiva en un máximo de 14 días; - = reacción negativa en un máximo de 14 días; ND = no determinada. Fuentes: Wells *et al.* (1987), Gavini (1989), Asis y Adachi (2003), Gitaitis *et al.* (2003), De Baere *et al.* (2004), Goszczynska *et al.* (2006), Kido *et al.* (2008), Brady *et al.* (2009), y Fujikawa y Akimoto (2011).

Los tres aislamientos bacterianos de agave varían en algunas de sus respuestas fisiológicas en los diferentes sustratos evaluados; sin embargo, la mayoría coinciden en un alto porcentaje con las características reportadas para *Pantoea agglomerans*, especialmente en las respuestas al

uso de lactosa, la producción de indol, la reducción de nitratos y la tolerancia a la salinidad, que son consideradas características fisiológicas y bioquímicas distintivas entre aislamientos que corresponden con *P. agglomerans* y no con *P. ananatis*. Los resultados de la caracterización fisiológica y bioquímica de las cepas aisladas de tejido con el síntoma de anillo rojo coinciden en un alto porcentaje con los reportados en la literatura para *P. agglomerans*.

### *1.3.7 Observación de colonias con microscopía electrónica de barrido (MEB)*

En las imágenes captadas observan bacilos rectos en conglomerados que se insertan en el medio de cultivo, formando una protuberancia sobre la superficie del mismo (Figura 1.8). En el estéreomicroscopio estos conglomerados se observan como una zona central más oscura que no se retira al pasar el asa bacteriológica sobre la colonia, sólo se arrastra el resto de la masa bacteriana. Esto último sucedió en las colonias observadas con el MEB, en las cuales la mayor parte de la colonia se desprendió del medio, quedando únicamente las simplasmata.

Estas observaciones fueron hechas también por Fucikosvky (comunicación personal, 2011). Sin embargo, él no asoció la presencia de simplasmata con el hecho de ser considerada una característica propia e intrínseca de *Pantoea*, y particularmente de la especie *agglomerans* y de la cual carece *P. ananatis*.

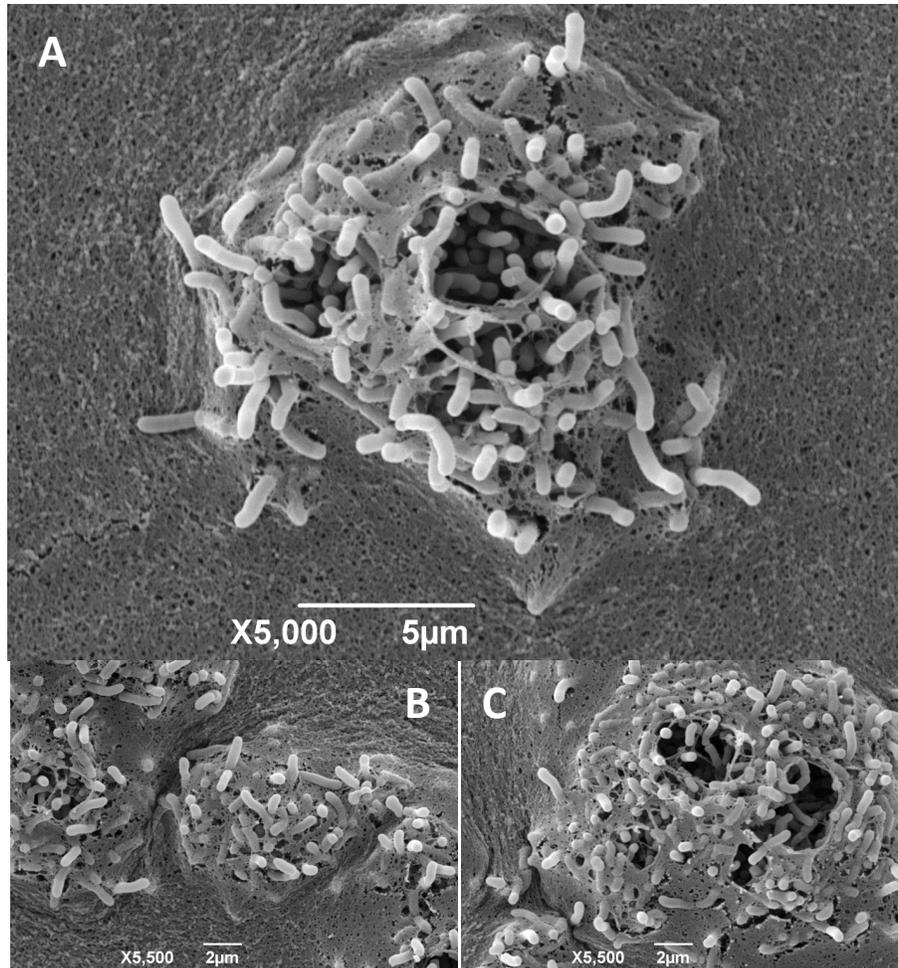


Figura 1.8. Simplasmata de colonias de las cepas PA7 (A), PA11 (B) y PA13 (C) observadas con el microscopio electrónico de barrido. Fotos de G. Hanako-Rosas.

### 1.3.8 Observación de tejido de agave con síntomas de anillo rojo con microscopía electrónica de transmisión (MET)

No se observó a la bacteria dentro de las células ni en los espacios intercelulares de los tejidos de agaves enfermos analizados con diferente nivel de severidad de la enfermedad (Figura 1.9). Sólo se pudo apreciar la degradación de una parte de la pared celular en tejido enfermo (Figura 1.10). Es recomendable observar un mayor número de muestras e incluir tejidos inoculados artificialmente con la bacteria.

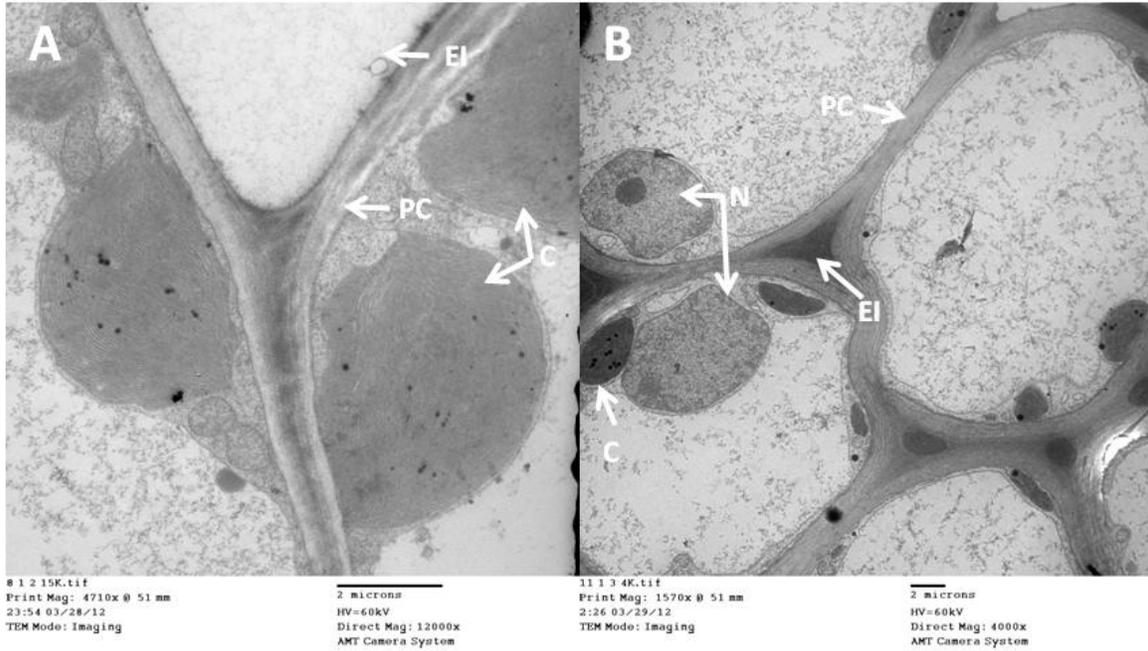


Figura1.9. Tejido de plantas de agave sana (A) y con síntomas de anillo rojo (B). EI = espacio intercelular, PC = Pared celular, C = cloroplastos, N = núcleo. Foto de G. Valdovinos-Ponce.

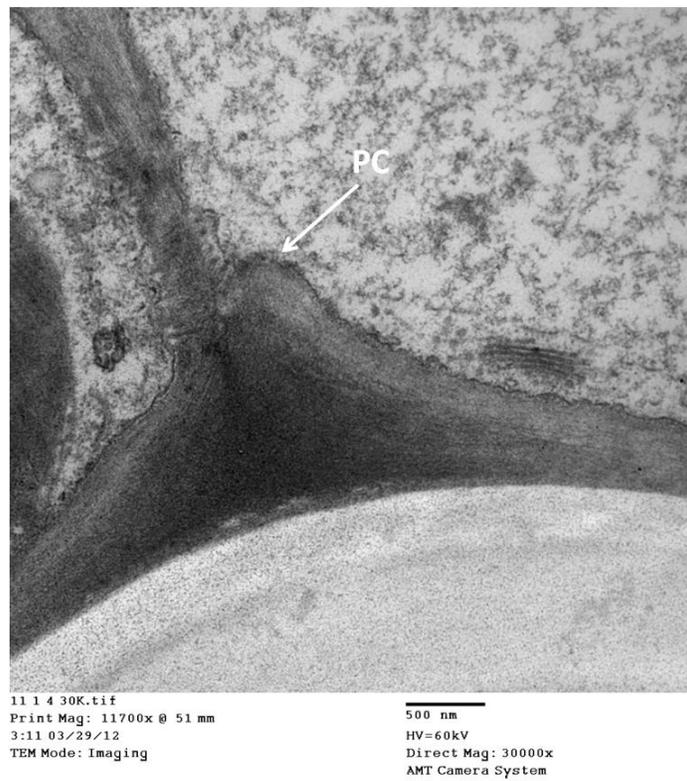


Figura1.10. Degradación de la pared de una célula de tejido de agave con síntomas de anillo rojo. PC = pared celular. Foto de G. Valdovinos-Ponce.

Este resultado difiere de lo expuesto anteriormente por Fucikovsky y Aranda-Ocampo (2006), quienes identificaron a la bacteria *Pantoea ananatis* como el agente causal del anillo rojo. Sin embargo, es evidente que las cepas aisladas de agave forman simplasmata en sus colonias, lo cual no es una característica de *P. ananatis*. Además, los resultados de la caracterización fisiológica y bioquímica (Cuadro 1.2), específicamente el uso de lactosa, producción de indol y reducción de nitratos corresponden a de *P. agglomerans* y no a *P. ananatis*. Goszczynska *et al.* (2006) establecen que aislamientos de *P. ananatis* tienen un óptimo crecimiento en medio de cultivo con 2 % de sal y que su crecimiento es reducido si el porcentaje de sal es menor o mayor al 2 %. En el presente estudio los aislados de agave crecieron eficientemente en el medio de cultivo con concentraciones mayores al 2%, incluso hasta del 5%.

En la descripción original de *P. ananatis* hecha por Serrano en 1928 así como en estudios posteriores realizados por diferentes investigadores se consideró que esta especie era indistinguible de *P. agglomerans*. Actualmente, se ha documentado que existen diferencias en patogenicidad y en la prueba de indol, pruebas que permiten distinguir ambas especies (Gavini *et al.* 1989). Lo anterior indica que los aislados de *P. agglomerans* y *P. ananatis* presentan un perfil fisiológico y bioquímico muy similar y que solamente pueden ser diferenciados en algunos aspectos de esta naturaleza, lo cual resalta la necesidad de integrar un enfoque polifásico en la caracterización además de la elaboración de un perfil genético de estas poblaciones bacterianas para que, en conjunto, se dispongan de elementos más concluyentes.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado para la realización del presente estudio. Al Colegio de Postgraduados, por el apoyo económico y técnico brindado durante la realización de esta investigación.

Al Sr. Carlos Martínez, por el apoyo en el trabajo técnico de laboratorio.

A la Dra. Hilda A. Zavaleta Mancera, por las facilidades brindadas y a la M. C. Greta Hanako Rosas, por el apoyo brindado durante el trabajo de microscopía electrónica de barrido y la obtención de las imágenes.

A la Central de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y a la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, por la asesoría otorgada durante el trabajo de microscopía electrónica de transmisión.

## 1.4 LITERATURA CITADA

Achouak, W., Heulin, T., Villemin, G., y Balandreau, J. 1994. Root colonization by symplasmata forming *Enterobacter agglomerans*. FEMS Microbiology Ecology 13: 287-294.

Alippi, A. M., y López, A. C. 2010. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. Plant Disease 94: 487.

Asis, C. A., y Adachi, K. 2003. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. Letters in Applied Microbiology 38: 19-23.

Ávila-Miranda, M. E. 2011. Enfermedades del agave y su manejo. pp. 115-126. In: L. A. Rendón-Salcido, M. E. Ávila-Miranda, B. Rodríguez-Garay, y J. I. del Real-Laborde (eds). Manual

- técnico para el establecimiento de huertas madre de agave azul. Libro técnico No. 1. Consejo Regulador del Téquila A. C. Guadalajara, México. 127p.
- Azad, H. R., Holmes, G. J., and Cooksey, D. A. 2000. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. *Plant Disease* 84: 973-979.
- Barash, I., y Manulis-Sasson, S. 2007. Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans*. *Trends in Microbiology* 15 (12): 538-545.
- Bomfeti, C. A., Souza-Pacolla, E. A., Massola Junior, N. S., Marriel, I. E., Meirelles, W. F., Casela, C. R., y Paccola-Meirelles, L. D. 2008. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot diseases using transmission electron microscopy and molecular techniques. *Tropical Plant Pathology* 33: 63–66.
- Brady, C. L., Venter, S. N., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Vancanneyt, M., Swings, J., y Coutinho, T. A. 2009. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov., and *Pantoea anthophila* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2339-2345.
- CAB International. 2007. Crop Protection Compendium. In: <http://www.cabcompendium.org/NamesLists/CPC/Full/ERWIAN.htm> (consultado el 28 de enero de 2011).
- Cook, D. W. M., Long, P. G., Ganesh, S., y Cheah, L. H. 1997. Attachment microbes antagonistic against *Botrytis cinerea*-biological control and scanning electron microscope studies *in vivo*. *Annals of Applied Biology* 131: 503-518.

- Cota, L. V., Costa, R. V., Silva, D. D., Parreira, D. F., Lana, U. G. P., y Casela, C. R. 2010. First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. Australasian Plant Disease Notes 5: 120–122.
- Coutinho, T. A., y Venter, S. N. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. Molecular Plant Pathology 10: 325–335
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2010. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario. In: <http://www.crt.org.mx/images/documentos/inventarioagave2010b.pdf> (consultado el 5 de febrero de 2011).
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2004. Avances en la Investigación del Agave Tequilero. Guadalajara, México: CRT-CONACyT. 453 p.
- Cruz, A. T., Cazacu, A. C., y Allen, C. H. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. Journal of Clinical Microbiology, 49 (6): 1989–1992.
- De Baere, T., Verhelst, R., Labit, C., y Verschraegen, G. 2004. Bacteremic Infection with *Pantoea ananatis*. Journal of Clinical Microbiology 42 (9): 4393–4395.
- Edens, D. G., Gitaitis, R. D., Sanders, F. H., y Nischwitz, C. 2006. First report of *Pantoea agglomerans* causing a leaf blight and bulb rot of onions in Georgia. Plant Disease 90: 1551.
- Enya, J., Shinohara, H., Yoshida, S., Tsukiboshi, T., Negishi, H., Suyama, K., y Tsushima, S. 2007. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. Microbial Ecology, 53 (4): 524-536.

- Euzéby, J. P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47 (2): 590-592.
- Feng, Y., Shen, D., Dong, X., y Song., W. 2003. *In vitro* symplasmata formation in the rice diazotrophic endophyte *Pantoea agglomerans* YS19. *Plant and Soil* 255: 435-444.
- Feng, Y., Shen, D., y Song, W. 2005. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology* 100: 938-945.
- Flores-López, H. E., Byerly, K. F., y Aceves-Rodríguez, J. J. 2002. Diagnóstico del sistema de producción agave con énfasis en problemas sanitarios. Informe de Investigación. INIFAP-CIRPAC C. E. Altos de Jalisco. Pp. 14.
- Fucikovsky, L., y Aranda-Ocampo, S. 2006. *Pantoea ananas* a new pathogen of agave in Mexico. *Phytopathology* 96: S37.
- Fujikawa, H., y Akimoto, R. 2011. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (1): 172-178.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., y De-Ley, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. As *Pantoea agglomerans* comb. nov. And description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 337-345.
- Gitaitis, R. D., y Gay, J. D. 1997. First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. *Plant Disease* 81: 1096.

- Gitaitis, R. D., Walcott, R., Culpepper, S., Sanders, H., Zolobowska, L., y Langston, D. 2002. Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. *Crop Protection* 21: 983–989.
- Gitaitis, R. D., Walcott, R. R., Wells, M. L., Diaz-Perez, J. C., y Sanders, F. H. 2003. Transmission of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, by tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. *Plant Disease* 87: 675-678.
- Goszczyńska, T., Venter, S. N., y Coutinho, T. A. 2006. PA 20, a semi-selective medium for isolation and enumeration of *Pantoea ananatis*. *Journal of Microbiological Methods* 64: 225-231.
- Hattingh, M. J., y Walter, D. F. 1981. Stalk and leaf necrosis of onion caused by *Erwinia herbicola*. *Plant Disease* 65: 615-618.
- Jain, S., Bohra, I., Mahajan, R., Jain, S., y Chugh, T. D. 2012. *Pantoea agglomerans* infection behaving like a tumor after plant thorn injury: An unusual presentation. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 55 (3): 386-388.
- Johnson, K. B., y Temple, T. N. 2013. Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. *Plant Disease* 97: 402-409.
- Kido, K., Adachi, R., Hasegawa, M., Yano, K., Hikichi, Y., Takeuchi, S., Atsuchi, T., y Takikawa, Y. 2008. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 74: 302–312.
- Koutsoudis, M. D., Tsaltas, D., Minogue, T. D., y von-Bodman, S. B. 2006. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in

- Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (15): 5983-5988.
- Kratz, A., Greenberg, D., Barki, Y., Cohen, E., y Lifshitz, M. 2003. *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. Archives of Disease in Childhood 88: 542-544.
- Lana, U. G. D. P., Gomes, E. A., Silva, D. D., Costa, R. V., Cota, L. V., Parreira, D. F., Souza, I. R. P. y Guimarães, C. T. 2012. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with white spot disease in maize, sorghum and crabgrass in Brazil. Journal of Phytopathology, 160: 441–448.
- Lelliott, R. A., y Stead, D. E. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications. Boston, U. S. A. 216 p.
- Medrano, E. G., y Bell, A. A. 2007. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. Journal of Applied Microbiology 102: 134-143
- Mergaert, J., Verdonck, L., y Kersters, K. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stuartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 43: 162–173.
- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D., Valadez-Moctezuma, E., Alarcón-Zúñiga, B., Zelaya-Molina, L. X., Córdova-Téllez, L., Mendoza-Onofre, L., Vaquera-Huerta, H., Carballo-Carballo, A., Farfán-Gómez, A., y Ávila-Quezada, G. 2007. First report of

- Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Disease* 91: 1356.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N. y Viñas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology* 70: 53-61.
- Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., Guimaraes, C. T., Schaffert, R. E., Sa, N. M. H. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1782–1787.
- Paik-Seong, L., Shun-Liang, C., Ching-Yi, T., y Mei-Ann, P. 2006. *Pantoea* peritonitis in a patient receiving chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrology* 11: 97-99.
- Parte, A. C. 2014. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research* 42 (D1): D613-D616.
- Pérez-y-Terrón, R., Villegas, M. C., Cuellar, A., Muñoz-Rojas, J., Castañeda-Lucio, M., Hernández-Lucas, I., Bustillos-Cristales, R., Bautista-Sosa, L., Munive J. A., Caicedo-Rivas, R., y Fuentes-Ramírez, L. E. 2009. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. *Australasian Plant Disease Notes*, 4: 96–99.
- Pusey, P. L., Stockwell, V. O., y Rudell, D. R. 2008. Antibiosis and acidification of *Pantoea agglomerans* strain E325 contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 98: 1136-1143

- Pusey, P. L., y Wend, C. 2012. Potential of osmoadaptation for improving *Pantoea agglomerans* E325 as biocontrol agent for the fire blight of apple and pear. *Biological Control* 62: 29-37.
- Rezzonico, F., Smits, T. H. M. Montesinos, E., Frey, J. E. y Duffy, B. 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology* 9: 204-222.
- Rijavec, T., Lapanje, A., Dermastia, M., Rupnik, M. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian Journal of Microbiology* 53:802–808.
- Rubio-Cortés, R. 2007. Enfermedades del cultivo de *Agave* spp. 169-195. *In*: J. F. Pérez-Domínguez y J. I. Del-Real-Laborde (eds). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de Denominación de Origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. 195 p.
- Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Second Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, U. S. A. 164 p.
- Schwartz, H. F., y Otto, K. 2000. First report of a leaf blight and bulb decay of onion by *Pantoea ananatis* in Colorado. *Plant Disease* 84: 808.
- Schwartz, H. F., Otto, K. L., and Gent, D. H. 2003. Relation of temperature and rainfall to development of *Xanthomonas* and *Pantoea* leaf blights of onion in Colorado. *Plant Disease* 87: 11-14.
- Serrano, F. B. 1928. Bacterial fruitlet brown-rot of pineapple in the Philippines. *Philippine Journal of Science* 36: 271–305.

- SIAP (Sistema de Información Alimentaria y Pesquera). 2014. Anuario estadístico de la producción agrícola. In: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (consultado el 27 de enero de 2014).
- Valenzuela-Zapata, A. G. 1997. El agave tequilero: Su cultivo e Industria. Guadalajara, México: Ed. Líteris. 215 p.
- Virgen-Calleros, G. 2005. Manejo integrado de enfermedades del cultivo del *Agave tequilana* Weber var. Azul. In: XXXI Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Guadalajara, Jalisco.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D., Castro, A. C., Sanders, F. H., Jr., y Diaz-Perez, J. C. 2002. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. Plant Disease 86:106-111.
- Watanabe, K., y Sato M. 1999. Gut colonization by an ice nucleation active bacterium, *Erwinia (Pantoea) ananatis* reduces the cold hardiness of mulberry pyralid larvae. Cryobiology 38:281–289.
- Wells, J. M., Sheng, W. S., Ceponis, M. J. y Chen, T. A. 1987. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. Phytopathology 77: 511-514
- Yan, H., Yu, S. H., Xie, G. L., Fang, W., Su, T., y Li, B. 2010. Grain discoloration of rice caused by *Pantoea ananatis* (synonym *Erwinia uredovora*) in China. Plant Disease 94: 482.
- Yang, K. Q., Qu, W. W., Liu, X., Liu, H. X., y Hou, L. Q. 2011. First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. Plant Disease 95: 773.

Zhan, X., Li, E., Xiong, X., Shen, D. y Feng, Y. 2010. Colonization of endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 on host rice, with formation of multicellular symplasmata. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 1667-1673.

## **CAPÍTULO II. Determinación de *Pantoea agglomerans* como agente causal del anillo rojo en el agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul)**

Miriam Mezo-Villalobos, Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, David Espinosa-Victoria, Colegio de Postgraduados, Programa de Edafología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez y Sergio Aranda-Ocampo, Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230. Correspondencia: [saranda@colpos.mx](mailto:saranda@colpos.mx).

### **Resumen**

La bacteria *Pantoea agglomerans* se encontró asociada a la enfermedad conocida como anillo rojo del agave. Las cepas aisladas de plantas de agave con síntomas de la enfermedad se sometieron a ensayos de patogenicidad con la finalidad de corroborar los Postulados de Koch y determinar si esta especie era el agente causal de la enfermedad. Se inocularon plantas sanas de agave tequilero micropropagadas *in vitro* para reproducir los síntomas con las cepas aisladas del agave. Una vez que éstos se presentaron, se realsó la bacteria previamente inoculada la cual fue identificada mediante la secuenciación de la región 16s del ADNr. Se concluye que *P. agglomerans* es el agente causal del anillo rojo del agave.

Palabras clave adicionales: *Pantoea agglomerans*, *Agave tequilana* Weber var. Azul, Postulados de Koch

### **Abstract**

*Pantoea agglomerans* was found associated with the disease known as red ring of agave. The isolated strains from agave plants exhibiting the disease symptoms, underwent pathogenicity trials to corroborate Koch's postulates in order to determine if this species was the causative agent of the disease. *In vitro* micropropagated agave plants were inoculated with the strains isolated from agave to reproduce the disease symptoms. Once the symptoms appeared, the previously inoculated bacteria were reisolated and identified through the sequencing of the 16S rDNA gene. It is concluded that *P. agglomerans* is the causative agent of the red ring of agave.

Additional keyword: *Pantoea agglomerans*, *Agave tequilana* Weber var. Azul, Koch's postulates

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

La enfermedad del anillo rojo en agave tequilero se presenta en cinco de las seis zonas en que divide el territorio del estado de Jalisco: Los Altos, el Centro, la Ciénega, Tequila y el Sur. La única región donde no se ha reportado la enfermedad es en Los Valles (CRT, 2010). En el periodo comprendido entre 2006 y 2008, la incidencia fue mayor en las zonas de Los Altos (3,3 %) y del Sur (4 %) con respecto a las otras regiones.

Los síntomas de esta enfermedad consisten en zonas corchosas de color rojizo en las hojas, que inician en los márgenes, en el punto de formación de las espinas. Las zonas de color rojizo crecen hasta coalescer al centro de las hojas, tanto en el haz como en el envés, formando un cinturón que las estrangula. Las hojas con el anillo rojo se endurecen y con el tiempo el resto de

la planta se torna más rígida también, deteniendo su crecimiento y tomando un aspecto arrosado cuando la enfermedad se presenta en forma severa (Virgen-Calleros, 2005; Rubio-Cortés, 2007; Fucikovsky, 2011, comunicación personal).

Rubio-Cortés (2007) y Ávila-Miranda (2011) postulan que el origen de la enfermedad es una deficiencia nutricional. Por otro lado, Valenzuela-Zapata (1997) considera que esta enfermedad se debe a la interacción de un conjunto de factores bióticos y abióticos, sin precisar cuál o cuáles factores, ni los organismos involucrados en esta interacción. Ávila-Miranda (2011) indica además que no se tiene claridad en la identidad del agente causal, ya que se ha reportado que se podría tratar de *Erwinia amylovora*, o bien, a un pH debajo de 5.5 en el suelo, lo que ocasionaría una baja disponibilidad de fósforo y desbalances entre cobre, zinc y boro. De forma similar, Rubio-Cortés (2007) señala que la causa de la enfermedad es consecuencia de un bajo pH, deficiencias de fósforo, zinc y boro, así como un exceso de manganeso. Este investigador estableció plantas de agave micropropagados *in vitro* en condiciones de invernadero, en recipientes que contenían suelo de un terreno donde la enfermedad de anillo rojo se había presentado constantemente. Las plantas tuvieron un menor crecimiento, pero sin expresar los síntomas del anillo rojo. Al aplicar cal para corregir el pH y una mezcla de nitrógeno, fósforo, potasio, cobre, zinc y boro, las plantas se recuperaron.

Los agaves son plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), además de ser suculentas, lo que eficientiza el uso del agua (Nobel y Valenzuela, 1987; Nobel, 1988). Aunado a esto, se tiene que considerar que la cosecha de las piñas que se industrializan para fabricar el tequila, se realiza cuando las plantas tienen entre 6 y 10 años de trasplantadas. Esto provoca que la extracción de nutrientes del suelo sea mínima, en comparación con otros cultivos que

se cosechan anualmente. Este conocimiento ha tenido como consecuencia una limitada investigación de los factores suelo y nutrición en los lugares donde existen plantaciones de agave por lo que su cultivo continuará de la misma forma en que se ha mantenido desde mediados del siglo XIX, aunque las concentraciones de nutrimentos pueden variar en el futuro (Gobeille *et al.*, 2006). Lo que es importante resaltar de este estudio, es que no señala que haya deficiencias de algún nutrimento que pueda ser la causa del anillo rojo. Nikolaeva y Niño-de-la-Cruz (2007), realizaron un estudio sobre el efecto de las deficiencias de diferentes nutrimentos en plantas de agave tequilero cultivadas *in vitro* durante la fase de endurecimiento en invernadero. Con base en sus resultados describen una serie de síntomas específicos para la deficiencia de nitrógeno, fósforo y potasio, sin que alguno de ellos coincida con los síntomas del anillo rojo. Así mismo, la deficiencia de calcio, magnesio hierro, zinc, boro, manganeso y cobre, no manifestaron síntomas de esta enfermedad.

Por su parte, Fucikovsky y Aranda (2006) realizaron un estudio con el cual establecen a *Pantoea ananatis* como agente causal del anillo rojo al cumplir los postulados de Koch. Sin embargo, la identificación del agente causal se fundamentó en la caracterización de perfil fisiológico y bioquímico. En el capítulo I de esta tesis se demostró, con base en una caracterización fisiológica y bioquímica que la identidad de los aislados bacterianos obtenidos a partir de plantas con síntomas de anillo rojo se trata de *Pantoea agglomerans* y no de *Pantoea ananatis*.

En 1884, el bacteriólogo alemán Robert Koch, diseñó una serie de ensayos para demostrar que un cierto microorganismo era el agente causal de una determinada enfermedad. Estos ensayos reciben el nombre de Postulados de Koch y se han convertido en una prueba estándar en la

investigación del origen de las patologías humanas, de animales y plantas (Cohen, 1994; Fuentes-Castillo, 2007).

La prueba consiste en: 1) el aislamiento del microorganismo causal de manera consistente de todos los individuos que presentan o han presentado la enfermedad; 2) crecimiento de dicho microorganismo en cultivo puro; 3) inoculación del microorganismo en hospedantes sanos y para observación de los síntomas de la enfermedad; y finalmente 4) reaislamiento del mismo microorganismo de los individuos a los que se inoculó (Cohen, 1994; Fuentes-Castillo, 2007).

Con base en el conocimiento anterior, el presente estudio tuvo como objetivo realizar pruebas de patogenicidad y corroborar los Postulados de Koch con las cepas identificadas como *Pantoea agglomerans* aisladas a partir de tejidos de agave con síntomas de anillo rojo.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### *2.2.1 Obtención e identificación de las cepas*

Durante 2011 y 2012 se realizaron muestreos en las zonas de mayor incidencia de la enfermedad, los municipios de Arandas y Tequila, en Jalisco. A partir de estas muestras, se aislaron 15 cepas de una especie, que fueron caracterizadas e identificadas fisiológica y bioquímicamente como *P. agglomerans*.

### *2.2.2 Inoculación en plantas sanas de agave*

Se obtuvieron plantas de agave propagadas *in vitro*, para que estuvieran libres de cualquier contaminante que pudiera interferir en el ensayo.

Las plantas se colocaron en macetas de 40x40 cm, con suelo esterilizado con Anibac® Plus (sales cuaternarias de amonio, 46.5%; sulfato de cobre pentahidratado, 20%, equivalente a 4.9% de cobre metálico como mínimo) en una dosis de 1 L del producto en 25 L de agua.

Se seleccionaron dos cepas de *P. agglomerans* (PA7 y PA11) y se cultivaron en AN durante 72 h a 28 °C. Se evaluaron dos métodos de inoculación: 1) inyección en la base de la planta con jeringa hipodérmica (1 mL) de una suspensión bacteriana en agua destilada estéril a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL (Figura 2.1) y 2) aspersión foliar (30 mL) de la misma suspensión bacteriana (Figura 2.2). Las plantas se incubaron en cámara húmeda con bolsas de plástico previo (24 h) o posterior (30 días) a la inoculación (Figura 2.3). En total se tuvieron 12 tratamientos con tres repeticiones (Cuadro 2.1). La unidad experimental consistió de una maceta con una planta.

Los tratamientos se distribuyeron completamente al azar y las plantas se mantuvieron en observación durante 72 días después de la inoculación

Cuadro 2.1. Tratamientos y métodos de inoculación en plantas de agave de las cepas PA7 y PA11 de *P. agglomerans*.

Tratamiento	Cepa bacteriana	Volumen y método de inoculación	Método de incubación
T01	PA07	1 mL inyectado	Cubierto con bolsa 24 h antes de la inoculación
T02	PA11	1 mL inyectado	Cubierto con bolsa 24 h antes de la inoculación
T03	Testigo Agua	1 mL inyectado	Cubierto con bolsa 24 h antes de la inoculación
T04	PA07	10 mL asperjado	Cubierto con bolsa 24 h antes de la inoculación
T05	PA11	10 mL asperjado	Cubierto con bolsa 24 h antes de la inoculación
T06	Testigo	10 mL asperjado	Cubierto con bolsa 24 h antes de la inoculación

Tratamiento	Cepa bacteriana	Volumen y método de inoculación	Método de incubación
	Agua		
T07	PA07	1 mL inyectado	Cubierto con bolsa 30 días después de inoculación
T08	PA11	1 mL inyectado	Cubierto con bolsa 30 días después de inoculación
	Testigo		
T09	Agua	1 mL inyectado	Cubierto con bolsa 30 días después de inoculación
	Agua		
T10	PA07	10 mL asperjado	Cubierto con bolsa 30 días después de inoculación
T11	PA11	10 mL asperjado	Cubierto con bolsa 30 días después de inoculación
	Testigo		
T12	Agua	10 mL asperjado	Cubierto con bolsa 30 días después de inoculación



Figura 2.1. Método de inoculación por inyección de una suspensión bacteriana de *P. agglomerans* a una concentración de  $3 \times 10^8$  ufc/mL en la base de la planta de agave.



Figura 2.2. Método de inoculación por aspersión foliar de una suspensión bacteriana de *P. agglomerans* a una concentración de  $3 \times 10^8$  ufc/mL.



Figura 2.3. Método de incubación de las plantas inoculadas, sin cubierta plástica (A) y con cubierta plástica (B).

### 2.2.3 Reaislamiento bacteriano a partir de plantas inoculadas

Se tomaron muestras de hojas con síntomas de anillo rojo y de plantas asintomáticas. Se tomó la mitad superior de dos hojas de cada planta, utilizando una navaja que se desinfectó entre

cada toma de muestra de tejido con alcohol al 70%. Las hojas se envolvieron en papel secante estéril y se marcó cada paquete con el tratamiento correspondiente. Todas las muestras se mantuvieron en bolsas y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento.

De todos los tratamientos se seleccionaron dos hojas de cada planta. De cada hoja se seccionaron 5 cubos de tejido de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup> dentro de una campana de flujo laminar (10 submuestras/planta). La mitad de las submuestras de cada tratamiento se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min más tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron en una placa Petri con AN. La otra mitad de las submuestras, se enjuagaron con agua destilada estéril y fueron sembradas en placas Petri con AN. Todas las placas se incubaron durante 24 h a 28 °C

Las bacterias reaisladas se sometieron a PCR para determinar su identidad en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

De las colonias bacterianas con 24 h de edad se extrajo el ADN total por lisis enzimática y éste se utilizó para amplificar el fragmento 16s ADNr usando los iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGGTTACCTTGTTACGACTT-3') siguiendo el protocolo descrito por Baker *et al.* (2003). Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante la electroforesis en agarosa 1.2 %, tenido con Gel Red (0.2 µL/mL de agarosa) y se observaron en un transiluminador de luz UV.

Los fragmentos amplificados se secuenciaron en un secuenciador Applied Biosystem modelo 3130 Genetic Analyzer por el método de Sanger.

Las secuencias obtenidas se compararon con la información contenida en la base de datos del GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information), haciendo uso de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ (Altschul *et al.*, 1997), para secuencias altamente similares.

## **2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### *2.3.1 Inoculación en plantas sanas de agave*

Los síntomas de anillo rojo se observaron a los 72 días después de la inoculación en los tratamientos 1 y 2, consistentes en la inoculación de las bacterias PA07 y PA11 por inyección en la base del tallo de plantas sanas que permanecieron cubiertas con bolsas de plástico 24 horas antes de la inoculación (Figuras 2.4 y 2.5).

En el caso de los tratamientos 7 y 8 (inyección de suspensión bacteriana y cubierta plástica durante 30 días después de la inoculación), los síntomas fueron menos severos.

Los tratamientos 4 y 5 (asperjados con suspensión bacteriana y cubiertos 24 h previo a la inoculación), 10 y 11 (asperjado con suspensión bacteriana y cubierto con plástico 30 días después de la inoculación), no produjeron síntomas visibles. Esto sugiere que la bacteria requiere de una herida para penetrar y colonizar el tejido del agave. Esto es equivalente a lo que ocurre en el campo, cuando se retiran los hijuelos de las plantas madre para ser establecidos en nuevas plantaciones. Con esta labor se hiere al hijuelo en la base, favoreciendo la entrada de la bacteria ya que no se llevan a cabo medidas fitosanitarias como la desinfección de las herramientas ni de las plantas.

En ninguno de los testigos inoculados con agua destilada estéril (tratamientos 3, 6, 9 y 12) hubo expresión de síntomas de anillo rojo (Figura 2.7).

Las plantas de agave inoculadas por inyección con la suspensión bacteriana manifestaron una pudrición seca de color rojizo, un poco menos intenso que el observado en campo y en el tiempo de evaluación no se formó el anillo característico de la enfermedad. Lo anterior podría explicarse debido a que las condiciones del suelo, humedad relativa y temperatura, principalmente, existentes en el invernadero donde se realizó el estudio fueron menos favorables que las que se presentan en la zona donde se observa la enfermedad de manera natural. Es conocido que uno de los principales componentes en la progresión de las enfermedades ocasionadas por bacterias en plantas, es su mayor dependencia de las condiciones ambientales para llevar a cabo el proceso de patogénesis que la de otros patógenos. Sin embargo, los síntomas observados corresponden con la descripción para la enfermedad denominada anillo rojo en *Agave tequilana*.



Figura 2.4. Tratamiento 1 en planta de agave: inoculación por inyección con la cepa PA7 en la base de la planta e incubación por 24 h antes de la inoculación en cámara húmeda. A) dos hojas que exhiben los síntomas; B) detalle de la hoja más joven, que muestra el mayor daño. Las flechas señalan los puntos en donde se puede observar el síntoma más típico del anillo rojo, el tejido se vuelve corchoso y de color rojo intenso en el sitio donde penetró la aguja con que se inoculó.



Figura 2.5. Tratamiento 2 en planta de agave: incubación 24 h en cámara húmeda y posterior inoculación con la cepa PA11 por inyección de suspensión bacteriana en la base de la planta. A) planta completa, que presenta los síntomas en diversas hojas; B) síntoma en una de las hojas que presentan el mayor daño. Las flechas señalan las marcas típicas del anillo rojo desarrolladas en el sitio de inoculación con jeringa.



Figura 2.6. Tratamiento 3 en planta de agave: inoculación con agua destilada estéril inyectada después de incubarse 24 h en cámara húmeda. A) planta completa, que se observa completamente sana; B) detalle de una hoja donde quedó la marca del daño ocasionado por la aguja al momento de realizar la inoculación, pero que no muestra el síntoma del anillo rojo (flecha).

### 2.3.2 Reaislamiento bacteriano a partir de plantas inoculadas

En las cajas de AN sembradas con el tejido sintomático que fue desinfectado con hipoclorito de sodio no se observó crecimiento de algún microorganismo (Figura 2.7 A), a diferencia de las cajas en las que este tejido fue solo enjuagado con agua destilada estéril (Figura 2.7 B), en donde se observó el crecimiento de colonias amarillas, brillantes, redondas con presencia de simplasmata, lo cual coincidió con la morfología de las colonias de *P. agglomerans* (Figura 2.9). Este resultado, sumado a que la bacteria no se observó en el tejido de plantas enfermas mediante microscopía electrónica de transmisión, según se ha expuesto ya en el capítulo I de la presente tesis, y al hecho de que únicamente se replicaron los síntomas cuando se inocularon las plantas por inyección de una suspensión bacteriana, podría indicar que la bacteria en realidad no penetra los tejidos de la planta, sino que actúa desde el exterior y necesita de una herida para que algún(os) metabolito(s) que produce penetren al tejido ocasionando daño a la planta. Lo anterior explicaría que, aunque se presenten los síntomas, la bacteria no se puede aislar si se desinfecta exteriormente la hoja, además de que no se puede observar dentro del tejido. Sin embargo, las únicas bases de esta hipótesis son los resultados obtenidos en la presente investigación, por lo que es necesario realizar estudios más profundos acerca de la interacción entre *P. agglomerans* y *Agave tequilana*.

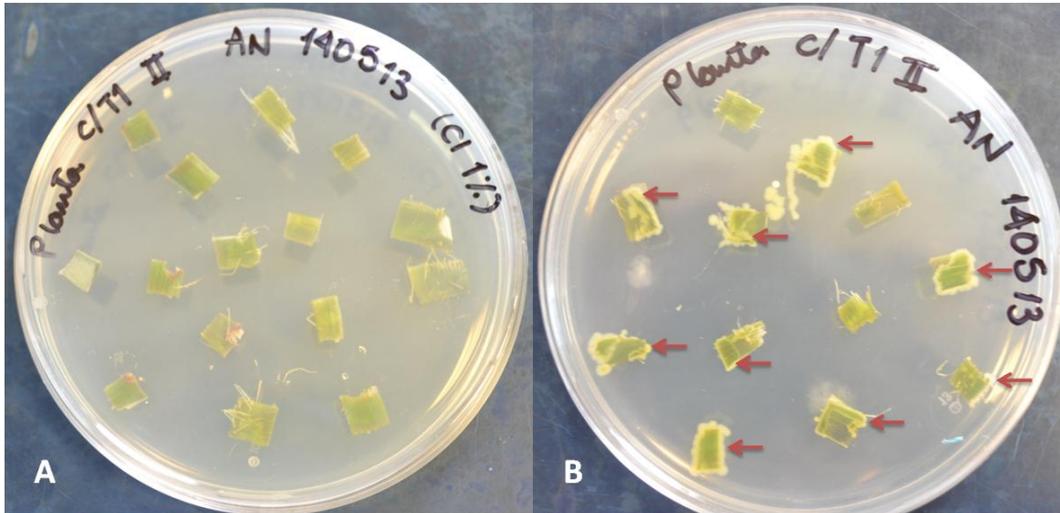


Figura 2.7. Tejido de planta inoculada con tratamiento 1 sembrada en AN después de desinfectarse con hipoclorito de sodio al 1 % (A), o ser enjuagada sólo con agua destilada estéril (B). Las flechas señalan el crecimiento de colonias bacterianas amarillas que sólo se presentaron cuando no hubo desinfección. En ambos casos, el tejido se incubó durante dos días a 28 °C.

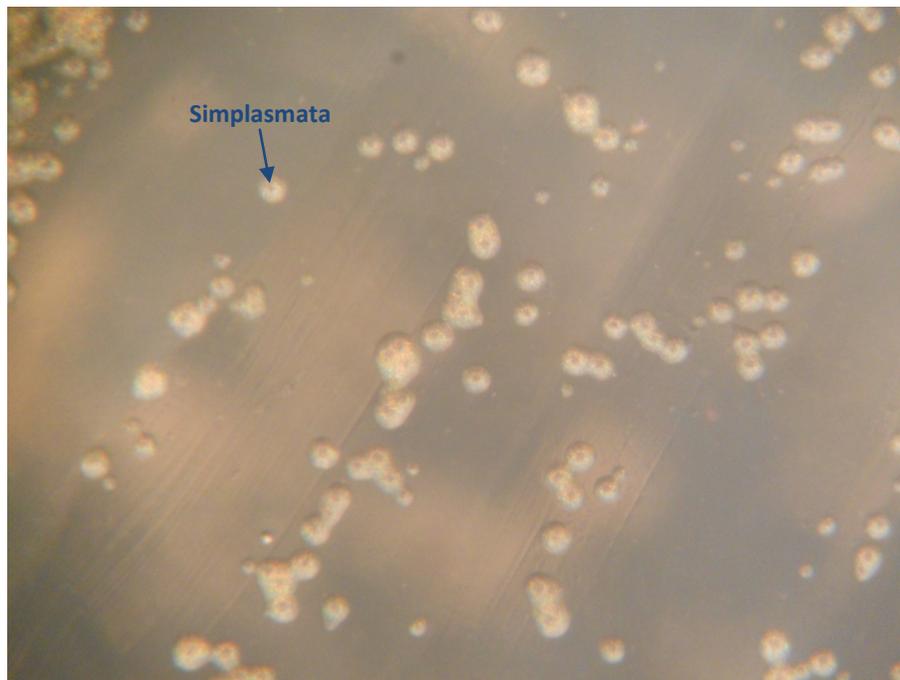


Figura 2.8. Morfología de las colonias bacterianas reaisladas de las plantas de agave inoculadas con *P. agglomerans* que presentaron síntomas de anillo rojo.

La secuencia de la cepa aislada de las plantas del tratamiento 1 coincidió con la secuencia del gen 16s de *Pantoea* sp. B28, con una identidad del 99 %; mientras que la cepa aislada de las

plantas del tratamiento 2 coincidió con la secuencia del gen 16s de *Pantoea agglomerans* cepa HY 5080 con una identidad del 99 %, corroborando que la bacteria aislada de estas plantas, es la misma que se inoculó y ocasionó la enfermedad.

Estos resultados, corroboran los postulados de Koch y se concluye que *P. agglomerans* es el agente causal del anillo rojo del agave tequilero.

### **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado para la realización del presente estudio. Al Colegio de Postgraduados, por el apoyo económico y técnico brindado durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Héctor González Hernández, por su valiosa ayuda para obtener las plantas de agave micropropagadas.

### **2.4 LITERATURA CITADA**

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. 1997.

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

Nucleic Acids Research 25:3389-3402.

Ávila-Miranda, M. E. 2011. Enfermedades del agave y su manejo. pp. 115-126. *In*: L. A. Rendón-

Salcido, M. E. Ávila-Miranda, B. Rodríguez-Garay, y J. I. del Real-Laborde (eds). Manual

técnico para el establecimiento de huertas madre de agave azul. Libro técnico No. 1.

Consejo Regulador del Téquila A. C. Guadalajara, México. 127p.

- Baker, G. C., Smith, J. J., y Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55, 541–555.
- Cohen, J. 1994. Fulfilling Koch's Postulates. *Science* 266: 1647.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2010. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario. In: <http://www.crt.org.mx/images/documentos/inventarioagave2010b.pdf> (consultado el 5 de febrero de 2011).
- Fucikovsky, L., y Aranda-Ocampo, S. 2006. *Pantoea ananas* a new pathogen of agave in Mexico. *Phytopathology* 96: S37.
- Fuentes-Castillo, C. 2007. Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 1 (2): 262-266.
- Gobeille, A., Yavitt, J., Stalcup, P., y Valenzuela, A. 2006. Effects of soil management practices on soil fertility measurements on *Agave tequilana* plantations in Western Central Mexico. *Soil & Tillage Research* 87: 80–88.
- Nikolaeva V., B., Niño-de-la-Cruz, V. 2007. Deficiencia inducida de elementos nutritivos en el cultivo de agave. pp. 89-116. In: J. F. Pérez-Domínguez y J. I. Del-Real-Laborde (eds). *Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. 195 p.
- Nobel, P. S. 1988. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. 275 p.

Nobel, P. S. y. Valenzuela, A. G. 1987. Environmental responses and productivity of the CAM plant, *Agave tequilana*. *Agricultural and Forest Meteorology* 39: 319-334.

Rubio-Cortés, R. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. pp. 169-195. *In*: J. F. Pérez-Domínguez y J. I. Del-Real-Laborde (eds). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. 195 p.

Valenzuela-Zapata, A. G. 1997. El agave tequilero: Su cultivo e Industria. Guadalajara, México: Ed. Líteris. 215 p.

Virgen-Calleros, G. 2005. Manejo integrado de enfermedades del cultivo del *Agave tequilana* Weber var. Azul. *In*: XXXI Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Guadalajara, Jalisco.

### **CAPÍTULO III. Caracterización genética de *Pantoea agglomerans*, agente causal del anillo rojo del agave tequilero**

Miriam Mezo-Villalobos, Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, David Espinosa-Victoria, Colegio de Postgraduados, Programa de Edafología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez y Sergio Aranda-Ocampo, Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230. Correspondencia: [saranda@colpos.mx](mailto:saranda@colpos.mx).

## Resumen

Las cepas de *Pantoea agglomerans*, aisladas de plantas de agave con síntomas de anillo rojo y que cumplieron los postulados de Koch, se utilizaron para amplificar los genes de nucleación de hielo específicos de *Pantoea ananatis* (ina); los iniciadores pagR-fw y pagI-rev para amplificar y secuenciar los genes *housekeeping* PagR y PagI, específicos para *Pantoea agglomerans* y los iniciadores 8F y 1492R para amplificar y secuenciar un fragmento de la región 16s ADNr. Los resultados obtenidos permiten establecer que las cepas aisladas del agave y causantes del anillo rojo corresponden con *Pantoea agglomerans*.

Palabras clave adicionales: *Agave tequilana* Weber var. Azul, 16s ADNr, PagR, PagI, *Pantoea agglomerans*.

## Abstract

The *Pantoea agglomerans* strains isolated from agave plants with symptoms of "red ring" and which fulfilled the Koch's postulates were used to amplify the specific genes of ice nucleation of *Pantoea ananatis* with the inaF and inaR primers; the pagR-fw and pagI-rev primers were used to amplify and sequencing the housekeeping PagR and PagI *Pantoea agglomerans* specific genes and the primers 8F and 1492R were used for amplifying and sequencing a fragment of the 16S rDNA. The results establish that the strains isolated from agave and causing red ring correspond to *Pantoea agglomerans*.

Additional keyword: *Agave tequilana* Weber var. Azul, 16s ADNr, PagR, PagI, *Pantoea agglomerans*.

### 3.1 INTRODUCCIÓN

*Pantoea agglomerans* es un procarionte que pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Cuadro 3.1), es un bacilo Gram negativo, móvil, utiliza urea y arabinosa, positivo a la catalasa y malonato; negativo a la oxidasa, lisina, producción de indol y uso de lactosa; además produce un pigmento amarillo en agar nutritivo y forma simplasmata al crecer en medios sólidos (Feng *et al.*, 2005; Fujikawa y Akimoto, 2011).

Cuadro 3.1. Clasificación taxonómica de *Pantoea agglomerans*.

<b>Reino</b>	Bacteria
<b>Fila</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae
<b>Género</b>	<i>Pantoea</i> Gavini <i>et al.</i> , 1989
<b>Especie</b>	<i>P. agglomerans</i> (Ewing & Fife 1972) Gavini <i>et al.</i> , 1989

Fuente: nzor\_nzfungi, 2012-09-26, acceso vía <http://www.gbif.org/species/117111774> el 27 de enero de 2014.

Las poblaciones de *P. agglomerans* comprenden un complejo de aislados con una alta diversidad genética y ecológica, comúnmente se le encuentra como endófito en una gran variedad de plantas (Ruppel *et al.*, 1992; McInroy y Kloepper, 1995; Asis y Adachi, 2003).

Algunas cepas de esta especie han demostrado ser benéficas, ya sea actuando como promotoras de crecimiento, protección contra el daño por heladas o como organismo antagonista de diversos fitopatógenos (Nunes *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2005; Pusey *et al.*, 2008; Karakurt *et al.*, 2010; Fujikawa y Akimoto, 2011; Pusey y Wend, 2012; Quecine *et al.*, 2012;

Silini-Chérif *et al.*, 2012; Johnson y Temple, 2013; Moreira *et al.*, 2013). Recientemente ha aparecido en varios cultivos ocasionando diversas enfermedades, e incluso en seres humanos (Cruz *et al.*, 2007; Medrano y Bell, 2007; Yang *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2012).

Völksch *et al.* (2009), no pudieron diferenciar entre los aislamientos clínicos de humanos y los de origen vegetal mediante el análisis de la región 16s del ADNr, los ITS de las regiones 16s-23s del ADNr, el gen *gapA*, ni el método de rep-PCR, aún cuando estos genes y regiones han dado buenos resultados para diferenciar cepas de la misma especie de bacterias de la familia Enterobacteriaceae. Sin embargo, en este trabajo demostraron que la virulencia de las cepas de diferentes orígenes es indistinta, *i. e.*, que las cepas que son patógenos vegetales, pueden infectar a humanos y viceversa.

Rezzonico *et al.* (2009) diseñaron un par de iniciadores específicos para identificar cepas altamente relacionadas con la cepa tipo de *P. agglomerans* LMG 1286, con lo que lograron diferenciar entre las cepas aisladas de plantas de aquellas que se han aislado en hospitales. Estos iniciadores pueden ser utilizados en la identificación de *P. agglomerans* aisladas de plantas. La información generada en torno a la diferenciación fenotípica de esta especie de otras cepas estrechamente relacionadas no permite diferenciarlas correctamente.

Los iniciadores *pagR-fw* y *pagI-rev*, amplifican los genes *PagR* y *PagI* de *P. agglomerans*, los cuales regulan el mecanismo de *quorum sensing*, ya que codifican para el receptor y la sintasa de la homoserina lactona. Los resultados de la investigación de Rezzonico *et al.* (2009) demostraron que la amplificación de estos genes, usando los iniciadores *pagR-fw* y *pagI-rev*, sólo ocurre en el caso de las cepas que están altamente relacionadas con la cepa tipo de *P. agglomerans* LMG 1286, de acuerdo con la filogenia de los genes 16s ADNr y *gyrB*.

Otra herramienta, para diferenciar a otra especie de este mismo género bacteriano son los iniciadores inaF e inaR, específicos para *P. ananatis*. Los iniciadores inaF e inaR fueron diseñados por Kido *et al.* (2008) para amplificar los genes de nucleación de hielo activos inaA, inaE e inaU, que se encuentran específicamente en el genoma de *P. ananatis*. Estos iniciadores fueron ensayados por Kido *et al.* (2008) con 8 diferentes aislamientos de *P. ananatis* provenientes de melón, una cepa tipo de *P. ananatis* aislada de cebolla, y tres cepas tipo de *P. agglomerans* de diferentes orígenes vegetales. Estos autores reportaron la amplificación de un fragmento de 400 pb, únicamente en el caso de las cepas identificadas como *P. ananatis*.

El análisis de la secuencia de la región 16s del ADNr es frecuentemente utilizado con la finalidad de establecer la identidad de un amplio rango de organismos y para establecer la relación filogenética que mantienen dichos organismos con otros (Reysenbach *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 2003; Galkiewicz y Kellogg, 2008). Particularmente, en el caso de las bacterias es la región del ADN más utilizada con esta finalidad (Galkiewicz y Kellogg, 2008). Los iniciadores 8F y 1492R son utilizados recurrentemente para la amplificación de la región 16s del ADNr de bacterias, corresponden a las posiciones de los nucleótidos 8 a 27 (8F) y a las posiciones complementarias de los nucleótidos 1510 a 1492 de la región 16s del ADNr de *Escherichia coli* (Reysenbach *et al.*, 1994). Son iniciadores diseñados específicamente para amplificar la región 16s del ADNr bacteriano (Galkiewicz y Kellogg, 2008).

Con base en esta información, el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar genéticamente los aislados bacterianos de *P. agglomerans*, agente causal del anillo rojo del agave tequilero.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Obtención de las cepas

Las cepas bacterianas se obtuvieron de plantas de agave provenientes de Arandas, Jalisco, con síntomas de anillo rojo tomadas durante 2011 y 2012. Las cepas se caracterizaron e identificaron mediante perfiles bioquímicos como *P. agglomerans* y cumplieron los postulados de Koch.

Las cepas aisladas se preservaron en caldo nutritivo y glicerol al 40% (1:1), a -20 °C. Todas las cepas se reactivaron estriando en placas Petri con AN después de raspar con el asa la superficie del cultivo criogénico, sin permitir la descongelación del mismo. Las placas se incubaron a 28 °C por 48 h.

### 3.2.2 Extracción de ADN de las cepas bacterianas

A partir de crecimiento bacteriano puro en AN, se tomó una asada de las colonias de cada cepa y se preparó por duplicado una suspensión celular en 20 µL de agua ultrapura (Gibco®, California, E. U.) en tubos para PCR de 0.2 mL, estériles y libres de DNAsas. Los tubos se agitaron con vortex y se prepararon suspensiones de las 15 cepas de *P. agglomerans*; como testigo se tuvo una cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *helianti*, que forma parte de la colección del Laboratorio de Bacteriología del Programa de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

El ADN de las muestras se obtuvo por lisis térmica, llevando las suspensiones de -20 °C a 95 °C y manteniéndolas en esa última temperatura durante 10 min.

### 3.2.3 Amplificación de genes *ina* con iniciadores específicos para *Pantoea ananatis*

Se realizó PCR con los iniciadores *inaF* (5'-GGGATCGCAAGCAAGCTCTGG-3') e *inaR* (5'-GCGATTATTCTTCGGGTTT-3') (Kido *et al.*, 2008). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, mezclando 1  $\mu$ L de cada iniciador a una concentración de 5 pmol/ $\mu$ L, amortiguador para PCR a concentración final de 1 X; MgCl<sub>2</sub>, a 1.5 mM; dTP's a 10 mM (Thermo Scientific, Lituania); 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Brasil) y 1  $\mu$ L de ADN a 50 ng/ $\mu$ L. Las muestras se amplificaron bajo las siguientes condiciones en un termociclador Mastercycler modelo Nexus gradient (Eppendorf, Alemania): 94 °C durante 3 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 54 °C por 30 s y 72 °C durante 1 minuto, una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis, cargando 5  $\mu$ L de cada uno de los productos en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio (0.2  $\mu$ L/mL de agarosa). La electroforesis se llevó a cabo durante 30 minutos a 90 V. El gel se visualizó en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad, California, E. U. A.).

### 3.2.4 Amplificación de genes *PagRI* con iniciadores específicos para *Pantoea agglomerans*

Se realizó la amplificación del ADN de los genes *PagR* y *PagI* con los iniciadores *pagR-fw* (GTGAAGGATACYTACTACAACG) y *pagI-rev* (CGAATGCATTGACGGCATGG) (Rezzonico *et al.*, 2009). Cada PCR se realizó en un volumen de 25  $\mu$ L, usando 1  $\mu$ L de los iniciadores a una concentración de 40  $\mu$ M; amortiguador para PCR a concentración final de 1 X; MgCl<sub>2</sub>, a 1.5 mM; dNTP's a 10 mM (Thermo Scientific™, Lituania); 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen™, Brasil) y 1  $\mu$ L de ADN a 50 ng/ $\mu$ L. Las condiciones de PCR se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Rezzonico *et al.* (2009), con algunas modificaciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante

5 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C durante 45 s y extensión a 72 °C por 74 s; y 5 min a 72 °C para la extensión final.

Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis, cargando 5 µL de cada uno de los productos en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio (0.2 µL/mL de agarosa). La electroforesis se llevó a cabo durante 30 minutos a 90 V. El gel se visualizó en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad, California, E. U. A.).

### 3.2.5 Amplificación del gen 16s ribosomal de *Pantoea agglomerans*

Se seleccionaron las muestras de ADN de las cepas PA7, PA11 y PA13 para analizar la secuencia de la región 16s. Se emplearon los iniciadores 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Baker *et al.*, 2003). Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µL, usando 1 µL de los iniciadores a una concentración de 50 µM; amortiguador para PCR a concentración final de 1 X; MgCl<sub>2</sub>, a 1.8 mM; dTP's a 200 µM (Thermo Scientific™, Lituania); 1.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen™, Brasil) y 1 µL de ADN a 50 ng/µL. Las condiciones de PCR consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, alineamiento a 54 °C durante 45 s y extensión a 70 °C por 1 min; y 8 min a 70 °C para la extensión final. En este caso, las muestras se ensayaron por duplicado.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler modelo Nexus gradient (Eppendorf, Alemania).

Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis, cargando 5 µL de cada uno de los productos en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio (0.2 µL/mL de agarosa). La electroforesis se llevó a cabo durante 30 minutos a 90 V. El gel se visualizó en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad, California, E. U. A.).

### 3.2.6 Secuenciación de los genes *PagRI* y del gen *16S* ribosomal

Los productos de PCR de dos de las muestras amplificadas con los iniciadores *pagR-fw* y *pagI-rev* (PA7 y PA11) y todos los productos de PCR con los iniciadores 8F y 1492R se enviaron a la empresa Macrogen (Corea) para la secuenciación, junto con los respectivos iniciadores que se emplearon para obtenerlos. Una vez que se obtuvieron las secuencias, se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ (Altschul *et al.*, 1997).

## 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.3.1 Amplificación de genes *ina* con iniciadores específicos para *Pantoea ananatis*

Ninguna de las muestras de ADN de las cepas de *P. agglomerans* amplificaron fragmento alguno al realizarse la PCR con los iniciadores *inaF* e *inaR*, específicos para los genes de nucleación de hielo de *P. ananatis* (*inaA*, *inaE* e *inaU*).

### 3.3.2 Amplificación de genes *PagRI* con iniciadores específicos para *Pantoea agglomerans* y del gen *16s* ribosomal.

Todas las muestras correspondientes a las cepas de *P. agglomerans* amplificaron un fragmento de aproximadamente 1168 pb al realizarse la PCR con los iniciadores *pagRI* (Figura 3.1). Esto se puede interpretar como una confirmación de la identidad de los aislados bacterianos de *agave tequilana* con síntomas de anillo rojo, dado que en los ensayos realizados por Rezzonico *et al.* (2009), únicamente las cepas altamente relacionadas con la cepa tipo de *P. agglomerans* resultaron positivas al realizarse la PCR con estos iniciadores. Las otras cepas identificadas bioquímicamente como *P. agglomerans* y que molecularmente no se relacionaban con la misma

cepa tipo, no dieron como resultado la amplificación de algún fragmento de ADN al someterse a la PCR con los iniciadores pagR-fw y pagI-rev.

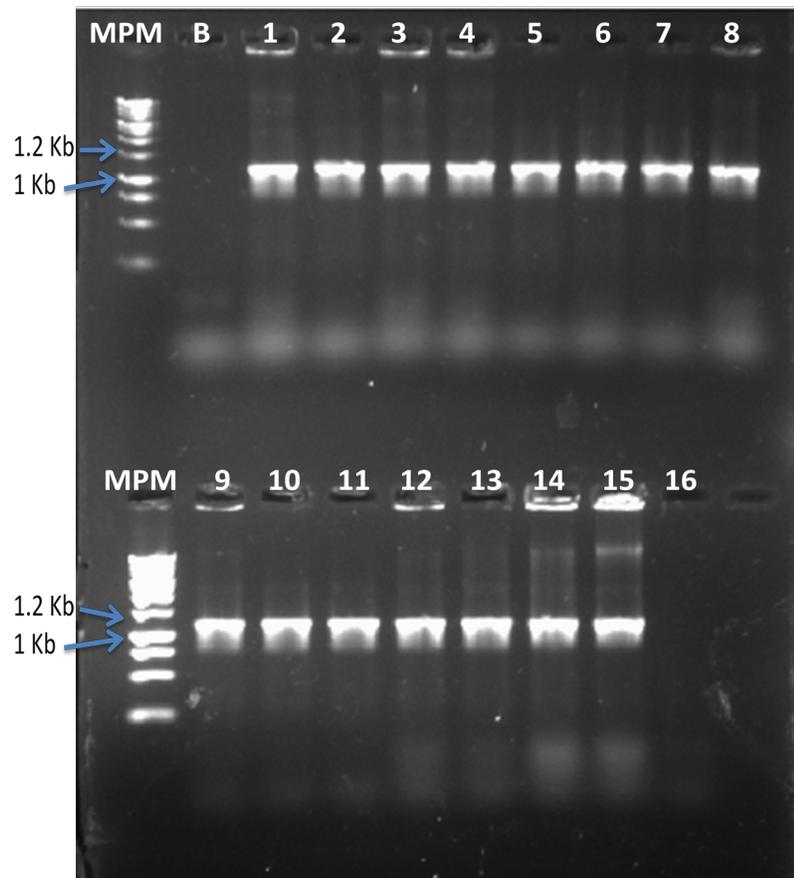


Figura 3.1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR con los iniciadores pagR-fw y pagI-rev de las muestras de ADN de las cepas de *P. agglomerans* aisladas de plantas de agave tequilero con síntomas de anillo rojo. MPM = marcador de pesos moleculares de 1 Kb; B = blanco; 1-15 = cepas PA1 a PA15 de *P. agglomerans*; 16 = *Pseudomonas syringae* pv. *helianti* (control negativo).

Así mismo, Todas las muestras amplificaron un fragmento de aproximadamente 1600 pb como resultado de la PCR con los iniciadores 8F y 1492R, lo que corresponde con el tamaño del amplicón que esperaba para el gen 16s ribosomal.

### 3.3.3 Secuenciación de los genes *PagRI* y del gen *16S* ribosomal

Las secuencias de las muestras PA7 y PA11 amplificadas con los iniciadores pagR-fw y pagI-rev, coincidieron en un 80% con la secuencia parcial de los genes PagR y PagI de la cepa P6WAL de *Pantoea agglomerans*.

En el caso del gen 16s ribosomal, la secuencia de la cepa PA7 coincidió en un 99% con la secuencia del gen 16s de *Pantoea* sp. B28, mientras que las secuencias de las cepas PA11 y PA13 coincidieron con la secuencia del gen 16s de *Pantoea agglomerans* cepa HY 5080 con una identidad del 99%.

### Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado para la realización del presente estudio. Al Colegio de Postgraduados, por el apoyo económico y técnico brindado durante la realización de esta investigación.

A Agro&Biotecnia, por el apoyo otorgado para la compra de los iniciadores que se utilizaron para realizar esta parte de la investigación.

### 3.4 LITERATURA CITADA

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. 1997.

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

Asis, C. A., y Adachi, K. 2003. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and

nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. Letters in Applied

Microbiology 38: 19-23.

- Baker, G. C., Smith, J. J., y Cowan, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55, 541–555.
- Cruz, A. T., Cazacu, A. C., y Allen, C. H. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (6): 1989–1992.
- Feng, Y., Shen, D., y Song, W. 2005. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology* 100: 938-945.
- Fujikawa, H., y Akimoto, R. 2011. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (1): 172-178.
- Galkiewicz, J. P., y Kellogg, C. A. 2008. Cross-Kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (24): 7828-7831.
- Jain, S., Bohra, I., Mahajan, R., Jain, S., y Chugh, T. D. 2012. *Pantoea agglomerans* infection behaving like a tumorafter plant thorn injury: An unusual presentation. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 55 (3): 386-388.
- Johnson, K. B., y Temple, T. N. 2013. Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. *Plant Disease* 97: 402-409.
- Karakurt, H., Kotan, R., Aslantas, R., Dadasoglu, F., y Karagöz, K. 2010. Inoculation effects of *Pantoea agglomerans* strains on growth and chemical composition of plum. *Journal of Plant Nutrition* 33: 1998-2009.

- Kido, K., Adachi, R., Hasegawa, M., Yano, K., Hikichi, Y., Takeuchi, S., Atsuchi, T., y Takikawa, Y. 2008. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 74: 302–312
- McInroy, J. A. y Kloepper, J. W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 337-342.
- Medrano, E. G., y Bell, A. A. 2007. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *Journal of Applied Microbiology* 102: 134-143
- Moreira, M., Silva, S. Q., y Teixeira, M. C. 2013. Identification of a bacterial consortium with biotechnological potential for arsenic bioremediation. *Advanced Materials Research* 825: 540-543.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N. y Viñas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology* 70: 53-61.
- Pusey, P. L., Stockwell, V. O., y Rudell, D. R. 2008. Antibiosis and acidification of *Pantoea agglomerans* strain E325 contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 98: 1136-1143
- Pusey, P. L., y Wend, C. 2012. Potential of osmoadaptation for improving *Pantoea agglomerans* E325 as biocontrol agent for the fire blight of apple and pear. *Biological Control* 62: 29-37.
- Quecine, M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P. T., Mondin, M., Azevedo, J. L., y Pizzirani-Kleiner, A. A. 2012. Sugarcane growth production by the

- endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. Applied and Environmental Microbiology. doi:10.1128/AEM.00836-12.
- Reysenbach, A. L., Wickham, G. S., y Pace, N. R. 1994. Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. Applied and Environmental Microbiology 60 (6): 2113-2119.
- Rezzonico, F., Smits, T. H. M. Montesinos, E., Frey, J. E. y Duffy, B. 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. BMC Microbiology 9: 204-222.
- Ruppel, S., Heck-Buchholz, C., Remus, R., Ortmann, U. y Schmelzer, R. 1992. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. Plant and Soil 145: 261–273.
- Silini-Chérif, H., Silini, A., Ghoul, M., y Yadav, S. 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. Pakistan Journal of Biological Sciences 15(6): 267-276.
- Völksch, B., Thon, S., Jacobsen, I. D., y Gube, M. 2009. Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential. Infections, Genetics and Evolution 9: 1381-1391.
- Yang, K. Q., Qu, W. W., Liu, X., Liu, H. X., y Hou, L. Q. 2011. First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. Plant Disease 95: 773.

## DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que el origen de la enfermedad conocida como anillo rojo del agave tequilero es de origen biótico. En las plantaciones de agave, los síntomas de la enfermedad se presentaron en manchones o en plantas individuales, que es la distribución típica de una enfermedad de origen biótico. Así, los resultados de la presente investigación difieren de la hipótesis existente hasta ahora, de que el origen de la enfermedad está relacionado con un desbalance nutrimental (Valenzuela-Zapata, 1997; Rubio-Cortés, 2007; Ávila-Miranda, 2011). Fucikovsky y Aranda-Ocampo (2006), identificaron a la bacteria *Pantoea ananatis* como el agente causal del anillo rojo; sin embargo, la bacteria que describe es similar morfológicamente a *P. agglomerans*, pues es evidente que las cepas aisladas de agave forman simplasmata en sus colonias, lo cual no es una característica que se observa en aislamientos de *P. ananatis*.

En esta investigación se caracterizó, mediante un enfoque polifásico, aislados bacterianos obtenidos a partir de plantas de agave con síntomas de la enfermedad denominada como anillo rojo. La caracterización de las cepas incluyó el análisis del perfil bioquímico y fisiológico de diversas fuentes de carbono, actividad enzimática y fisiológica de crecimiento en diferentes sustratos de cultivo, microscopía electrónica de barrido y de transmisión y la secuenciación del genes 16S ADNr y PagRI. Los resultados del presente estudio identifican a *Pantoea agglomerans* como el agente causal del anillo rojo en agave tequilero, ya que la identificación tanto por métodos bioquímicos y fisiológicos, coinciden con los resultados obtenidos mediante los ensayos moleculares en la identidad de la bacteria y se ha demostrado la patogenicidad de estos aislamientos en plantas sanas de agave al cumplir con los postulados de Koch.

## CONCLUSIONES GENERALES

1. La bacteria asociada a la enfermedad del anillo rojo del agave tequilero es *Pantoea agglomerans*. Esto se sustenta en la caracterización, mediante un enfoque polifásico, de aislados bacterianos obtenidos a partir de plantas de agave con síntomas del anillo rojo. La caracterización de las cepas incluyó el análisis del perfil bioquímico y fisiológico de diversas fuentes de carbono, actividad enzimática y fisiológica de crecimiento en diferentes sustratos de cultivo, microscopía electrónica de barrido y la secuenciación del genes 16S ADNr y PagRI.
2. La cepa de *P. agglomerans* aislada del agave tequilero es además patógena de la cebolla, como se comprobó al cumplir los Postulados de Koch con esta hortaliza.
3. Hay indicios de que la bacteria requiere de una herida para ocasionar daño en las plantas de agave tequilero, considerando que la inoculación por inyección de suspensión bacteriana en las plantas de agave tuvo más efecto que la inoculación por aspersión de la misma suspensión. Es necesario realizar más investigación en lo que respecta a la propagación y desarrollo a nivel histológico de la enfermedad.
4. Es probable que la bacteria se encuentre en el filoplano del agave tequilero enfermo del anillo rojo, ya que es posible eliminarla de las plantas enfermas mediante la desinfección de la superficie de las hojas. Sin embargo, no se tienen datos acerca del ciclo biológico de la bacteria; no se sabe si vive y se reproduce como epífita en las hojas del agave o si llega a éste y comienza a desarrollar la enfermedad. Resulta necesario realizar más estudios de este aspecto.

5. Los resultados del presente estudio identifican a *Pantoea agglomerans* como el agente causal del anillo rojo en agave tequilero. Se han cumplido con los postulados de Koch al encontrarla siempre asociada a las plantas enfermas, reproducir los síntomas de la enfermedad al inocularla en plantas sanas de agave y reaislar la misma bacteria que se inoculó.
6. Se requiere más investigación acerca de esta enfermedad y su agente causal, como identificación mediante el análisis de secuencias multilocus, dado que la identificación de la bacteria *P. agglomerans* es complicada; estudios histológicos más completos del tejido enfermo y estudios sobre la forma de propagación y desarrollo de la enfermedad, lo que ayudaría a desarrollar un método de control de la misma.

## LITERATURA CITADA

- Achouak, W., Heulin, T., Villemin, G., y Balandreau, J. 1994. Root colonization by symplasmata forming *Enterobacter agglomerans*. FEMS Microbiology Ecology 13: 287-294.
- Alippi, A. M., y López, A. C. 2010. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. Plant Disease 94: 487.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.
- Asis, C. A., y Adachi, K. 2003. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. Letters in Applied Microbiology 38: 19-23.
- Ávila-Miranda, M. E. 2011. Enfermedades del agave y su manejo. pp. 115-126. In: L. A. Rendón-Salcido, M. E. Ávila-Miranda, B. Rodríguez-Garay, y J. I. del Real-Laborde (eds). Manual técnico para el establecimiento de huertas madre de agave azul. Libro técnico No. 1. Consejo Regulador del Téquila A. C. Guadalajara, México. 127p.
- Ayala-Escobar, V., y Yañez-Morales, M. J. 2004. *Cercospora agavicola* sp. nov. causante de una nueva enfermedad foliar en agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) en Pénjamo, Guanajuato, México. Memorias XXXI Congreso Nacional Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Veracruz, Veracruz, México. Resumen p. 42.
- Azad, H. R., Holmes, G. J., and Cooksey, D. A. 2000. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. Plant Disease 84: 973-979.

- Barash, I., y Manulis-Sasson, S. 2007. Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans*. *Trends in Microbiology* 15 (12): 538-545.
- Baker, G. C., Smith, J. J., y Cowan, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55, 541–555.
- Bomfeti, C. A., Souza-Pacolla, E. A., Massola Junior, N. S., Marriel, I. E., Meirelles, W. F., Casela, C. R., y Paccola-Meirelles, L. D. 2008. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot diseases using transmission electron microscopy and molecular techniques. *Tropical Plant Pathology* 33: 63–66.
- Brady, C. L., Venter, S. N., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Vancanneyt, M., Swings, J., y Coutinho, T. A. 2009. *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov., and *Pantoea anthophila* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2339-2345.
- CAB International. 2007. Crop Protection Compendium. In: <http://www.cabcompendium.org/NamesLists/CPC/Full/ERWIAN.htm> (consultado el 28 de enero de 2011).
- Castañeda-Vázquez, H. 2002. Aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la marchitez del agave tequilero. pp 21-24. In: H. E. Flores-López (ed). Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. INIFAP-CIRPAC C. E. Altos de Jalisco. Publicación especial No. 1. Tepatitlán, Jalisco, México.

- Ceen-Caamal, J. C. 2012. Determinación del agente causal de la pudrición del cogollo del *Agave tequilana* Weber var. *Azul* en el estado de Jalisco. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 50 p.
- Cohen, J. 1994. Fulfilling Koch's Postulates. *Science* 266: 1647.
- Colunga-GarcíaMarín, P., y Zizumbo-Villarreal, D. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity Conservation* 16:1653–1667.
- Cook, D. W. M., Long, P. G., Ganesh, S., y Cheah, L. H. 1997. Attachment microbes antagonistic against *Botrytis cinerea*-biological control and scanning electron microscope studies *in vivo*. *Annals of Applied Biology* 131: 503-518.
- Cota, L. V., Costa, R. V., Silva, D. D., Parreira, D. F., Lana, U. G. P., y Casela, C. R. 2010. First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 5: 120–122.
- Coutinho, T. A., y Venter, S. N. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology* 10: 325–335
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2010a. Actualización de la base de datos y diagnóstico fitosanitario. In: <http://www.crt.org.mx/images/documentos/inventarioagave2010b.pdf> (consultado el 5 de febrero de 2011).
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2010b. Información estadística. In: <http://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/> (consultado el 5 de febrero de 2011).
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2004. Avances en la Investigación del Agave Tequilero. Guadalajara, México: CRT-CONACyT. 453 p.

- Cruz, A. T., Cazacu, A. C., y Allen, C. H. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (6): 1989–1992.
- De Baere, T., Verhelst, R., Labit, C., y Verschraegen, G. 2004. Bacteremic Infection with *Pantoea ananatis*. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (9): 4393–4395.
- Edens, D. G., Gitaitis, R. D., Sanders, F. H., y Nischwitz, C. 2006. First report of *Pantoea agglomerans* causing a leaf blight and bulb rot of onions in Georgia. *Plant Disease* 90: 1551.
- Enya, J., Shinohara, H., Yoshida, S., Tsukiboshi, T., Negishi, H., Suyama, K., y Tsushima, S. 2007. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microbial Ecology*, 53 (4): 524-536.
- Euzéby, J. P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47 (2): 590-592.
- Feng, Y., Shen, D., Dong, X., y Song, W. 2003. *In vitro* syntrophism formation in the rice diazotrophic endophyte *Pantoea agglomerans* YS19. *Plant and Soil* 255: 435-444.
- Feng, Y., Shen, D., y Song, W. 2005. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology* 100: 938-945.
- Fuentes-Castillo, C. 2007. Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 1 (2): 262-266.

- Flores-López, H. E., Byerly, K. F., y Aceves-Rodríguez, J. J. 2002. Diagnóstico del sistema de producción agave con énfasis en problemas sanitarios. Informe de Investigación. INIFAP-CIRPAC C. E. Altos de Jalisco. Pp. 14.
- Fucikovsky, L., y Aranda-Ocampo, S. 2006. *Pantoea ananas* a new pathogen of agave in Mexico. *Phytopathology* 96: S37.
- Fujikawa, H., y Akimoto, R. 2011. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (1): 172-178.
- Galkiewicz, J. P., y Kellogg, C. A. 2008. Cross-Kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (24): 7828-7831.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., y De-Ley, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. As *Pantoea agglomerans* comb. nov. And description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 337-345.
- Gitaitis, R. D., y Gay, J. D. 1997. First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. *Plant Disease* 81: 1096.
- Gitaitis, R. D., Walcott, R., Culpepper, S., Sanders, H., Zolobowska, L., y Langston, D. 2002. Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. *Crop Protection* 21: 983–989.

- Gitaitis, R. D., Walcott, R. R., Wells, M. L., Diaz-Perez, J. C., y Sanders, F. H. 2003. Transmission of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, by tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. *Plant Disease* 87: 675-678.
- Gobeille, A., Yavitt, J., Stalcup, P., y Valenzuela, A. 2006. Effects of soil management practices on soil fertility measurements on *Agave tequilana* plantations in Western Central Mexico. *Soil & Tillage Research* 87: 80–88.
- Goszczyńska, T., Venter, S. N., y Coutinho, T. A. 2006. PA 20, a semi-selective medium for isolation and enumeration of *Pantoea ananatis*. *Journal of Microbiological Methods* 64: 225-231.
- Hattingh, M. J., y Walter, D. F. 1981. Stalk and leaf necrosis of onion caused by *Erwinia herbicola*. *Plant Disease* 65: 615-618.
- Huitron, C., Pérez, R., Sánchez, A. E., Lappe, P., y Rocha-Zavaleta, R. 2008. Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes. *Journal of Environmental Biology*, 29 (1): 37-41.
- Íñiguez-Covarrubias, G., Díaz-Teres, R., Sanjuan-Dueñas, R., Anzaldo-Hernández, J., y Rowell, R. M. 2001a. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber *azul* leaves. *Bioresource Technology* 77: 101-108.
- Íñiguez-Covarrubias, G., Lange, S. E., y Rowell R. M. 2001b. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 1: Agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology* 77: 25-32.

- Jain, S., Bohra, I., Mahajan, R., Jain, S., y Chugh, T. D. 2012. *Pantoea agglomerans* infection behaving like a tumor after plant thorn injury: An unusual presentation. Indian Journal of Pathology and Microbiology 55 (3): 386-388.
- Johnson, K. B., y Temple, T. N. 2013. Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. Plant Disease 97: 402-409.
- Karakurt, H., Kotan, R., Aslantas, R., Dadasoglu, F., y Karagöz, K. 2010. Inoculation effects of *Pantoea agglomerans* strains on growth and chemical composition of plum. Journal of Plant Nutrition 33: 1998-2009.
- Kido, K., Adachi, R., Hasegawa, M., Yano, K., Hikichi, Y., Takeuchi, S., Atsuchi, T., y Takikawa, Y. 2008. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. Journal of General Plant Pathology 74: 302–312.
- Koutsoudis, M. D., Tsaltas, D., Minogue, T. D., y von-Bodman, S. B. 2006. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (15): 5983-5988.
- Kratz, A., Greenberg, D., Barki, Y., Cohen, E., y Lifshitz, M. 2003. *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. Archives of Disease in Childhood 88: 542-544.
- Lana, U. G. D. P., Gomes, E. A., Silva, D. D., Costa, R. V., Cota, L. V., Parreira, D. F., Souza, I. R. P. y Guimarães, C. T. 2012. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with white spot disease in maize, sorghum and crabgrass in Brazil. Journal of Phytopathology, 160: 441–448.

- Lelliott, R. A., y Stead, D. E. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications. Boston, U. S. A. 216 p.
- McInroy, J. A. y Kloepper, J. W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 337-342.
- Medrano, E. G., y Bell, A. A. 2007. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *Journal of Applied Microbiology* 102: 134-143
- Mergaert, J., Verdonck, L., y Kersters, K. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stuartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *Int. Journal of Systematic Bacteriology* 43:162–173.
- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D., Valadez-Moctezuma, E., Alarcón-Zúñiga, B., Zelaya-Molina, L. X., Córdova-Téllez, L., Mendoza-Onofre, L., Vaquera-Huerta, H., Carballo-Carballo, A., Farfán-Gómez, A., y Ávila-Quezada, G. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Disease* 91: 1356.
- Moreira, M., Silva, S. Q., y Teixeira, M. C. 2013. Identification of a bacterial consortium with biotechnological potential for arsenic bioremediation. *Advanced Materials Research* 825: 540-543.
- Nikolaeva V., B., y Niño-de-la-Cruz, V. 2007. Deficiencia inducida de elementos nutritivos en el cultivo de *Agave* spp. 89-116. *In*: J. F. Pérez-Domínguez y J. I. Del-Real-Laborde (eds).

- Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. 195 p.
- Nobel, P. S. 1988. Environmental Biology of Agaves and Cacti. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. 275 p.
- Nobel, P. S. y Valenzuela, A. G. 1987. Environmental responses and productivity of the CAM plant, *Agave tequilana*. Agricultural and Forest Meteorology 39: 319-334.
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N. y Viñas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. International Journal of Food Microbiology 70: 53-61.
- Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., Guimaraes, C. T., Schaffert, R. E., Sa, N. M. H. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. Soil Biology and Biochemistry 41: 1782–1787.
- Paik-Seong, L., Shun-Liang, C., Ching-Yi, T., y Mei-Ann, P. 2006. *Pantoea* peritonitis in a patient receiving chronic ambulatory peritoneal dialysis. Nephrology 11: 97-99.
- Parte, A. C. 2014. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic Acids Research 42 (D1): D613-D616.
- Pérez-Dominguez, J. F., y Rubio-Cortés, R. 2007. pp. 135-168. *In*: J. F. Pérez-Domínguez y J. I. Del-Real-Laborde (eds). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. 195 p.

Pérez-y-Terrón, R., Villegas, M. C., Cuellar, A., Muñoz-Rojas, J., Castañeda-Lucio, M., Hernández-Lucas, I., Bustillos-Cristales, R., Bautista-Sosa, L., Munive, J.A., Caicedo-Rivas, R., y Fuentes-Ramírez, L.E. 2009. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. *Australasian Plant Disease Notes*, 4: 96–99.

Pusey, P. L., Stockwell, V. O., y Rudell, D. R. 2008. Antibiosis and acidification of *Pantoea agglomerans* strain E325 contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 98: 1136-1143

Pusey, P. L., y Wend, C. 2012. Potential of osmoadaptation for improving *Pantoea agglomerans* E325 as biocontrol agent for the fire blight of apple and pear. *Biological Control* 62: 29-37.

Quecine, M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P. T., Mondin, M., Azevedo, J. L., y Pizzirani-Kleiner, A. A. 2012. Sugarcane growth production by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.00836-12.

Reysenbach, A. L., Wickham, G. S., y Pace, N. R. 1994. Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (6): 2113-2119.

Rezzonico, F., Smits, T. H. M. Montesinos, E., Frey, J. E. y Duffy, B. 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology* 9: 204-222.

- Rijavec, T., Lapanje, A., Dermastia, M., Rupnik, M. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian Journal of Microbiology* 53:802–808.
- Rodríguez-Garay, B. 2004. La materia prima *Agave tequilana* Weber var. Azul. pp. 1-47. In: CRT (ed.) *Avances en la Investigación del Agave Tequilero*. Guadalajara, México: CRT-CONACyT. 453 p.
- Rubio-Cortés, R. 2007. Enfermedades del cultivo de *Agave* spp. 169-195. In: J. F. Pérez-Domínguez y J. I. Del-Real-Laborde (eds). *Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. 195 p.
- Ruppel, S., Heck-Buchholz, C., Remus, R., Ortmann, U. y Schmelzer, R. 1992. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant and Soil* 145: 261–273.
- Schaad, N.W. 1988. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Second Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, U. S. A. 164 p.
- Schwartz, H. F., y Otto, K. 2000. First report of a leaf blight and bulb decay of onion by *Pantoea ananatis* in Colorado. *Plant Disease* 84: 808.
- Schwartz, H. F., Otto, K. L., and Gent, D. H. 2003. Relation of temperature and rainfall to development of *Xanthomonas* and *Pantoea* leaf blights of onion in Colorado. *Plant Disease* 87: 11-14.

- Silini-Chérif, H., Silini, A., Ghoul, M., y Yadav, S. 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* Ima2. Pakistan Journal of Biological Sciences 15(6): 267-276.
- Serrano, F. B. 1928. Bacterial fruitlet brown-rot of pineapple in the Philippines. Philippine Journal of Science 36: 271–305.
- SIAP (Sistema de Información Alimentaria y Pesquera). 2014. Anuario estadístico de la producción agrícola. In: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (consultado el 27 de enero de 2014).
- Valenzuela-Zapata, A. G. 1997. El agave tequilero: Su cultivo e Industria. Guadalajara, México: Ed. Líteris. 215 p.
- Vargas-Ponce, O, Zizumbo-Villarreal, D., y Colunga-GarciaMarin, P. 2007. *In situ* diversity and maintenance of traditional *Agave* landraces used in spirits production in West-Central Mexico. Economic Botany, 61(4): 362-375.
- Virgen-Calleros, G. 2005. Manejo integrado de enfermedades del cultivo del *Agave tequilana* Weber var. Azul. XXXI Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Guadalajara, Jalisco, México.
- Völksch, B., Thon, S., Jacobsen, I. D., y Gube, M. 2009. Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential. Infections, Genetics and Evolution 9: 1381-1391.
- Walcott, R. R., Gitaitis, R. D., Castro, A. C., Sanders, F. H., Jr., y Diaz-Perez, J. C. 2002. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. Plant Disease 86: 106-111.

- Watanabe, K., y Sato M. 1999. Gut colonization by an ice nucleation active bacterium, *Erwinia (Pantoea) ananatis* reduces the cold hardiness of mulberry pyralid larvae. *Cryobiology* 38:281–289.
- Wells, J. M., Sheng, W. S., Ceponis, M. J. y Chen, T. A. 1987. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. *Phytopathology* 77: 511-514.
- Yan, H., Yu, S. H., Xie, G. L., Fang, W., Su, T., y Li, B. 2010. Grain discoloration of rice caused by *Pantoea ananatis* (synonym *Erwinia uredovora*) in China. *Plant Disease* 94: 482.
- Yang, K. Q., Qu, W. W., Liu, X., Liu, H. X., y Hou, L. Q. 2011. First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. *Plant Disease* 95: 773.
- Zhan, X., Li, E., Xiong, X., Shen, D. y Feng, Y. 2010. Colonization of endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 on host rice, with formation of multicellular symplasmata. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 1667-1673.