



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

*Pantoea agglomerans* CAUSANDO ESTRÍAS  
CLORÓTICAS EN LÍNEAS E HÍBRIDOS COMERCIALES  
DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

**JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ HERRERA**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

2015

La presente tesis titulada: ***Pantoea agglomerans* causando estrías cloróticas en semillas e híbridos comerciales de maíz (*Zea mays* L.)**, realizada por el alumno: **José Antonio Rodríguez Herrera**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

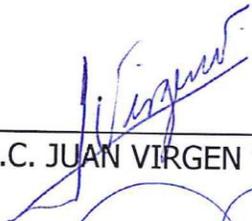
CONSEJERA



---

DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

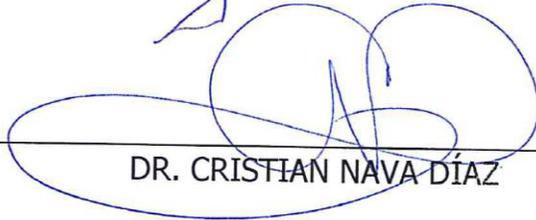
ASESOR



---

M.C. JUAN VIRGEN VARGAS

ASESOR



---

DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2015

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y permitirme descubrir una manera diferente de vivir.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para la realización de mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por proporcionarme las condiciones académicas y de infraestructura para desarrollar la presente investigación.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, con eterna gratitud por dirigir esta investigación, por su paciencia y generosidad para compartir su conocimiento y por haberme adentrado en el mundo de la ciencia.

Al M.C. Juan Virgen Vargas, por su apoyo brindado para la realización de este trabajo, y por su generosidad para compartir sus conocimientos.

Al Dr. Cristian Nava Díaz, por su disposición, sugerencias y el apoyo brindado.

Al laboratorio de Biotecnología y Bioquímica del Programa de Producción de Semillas por brindarme el espacio y equipo necesario para poder realizar esta investigación.

A todos los profesores que con sus conocimientos aportados contribuyeron a finalizar mis estudios de maestría.

A todos los compañeros del Laboratorio de Biotecnología y Bioquímica de Semillas que compartieron su tiempo y amistad conmigo.

## **DEDICATORIA**

*A MI AMADA ESPOSA MARIEL QUIEN ME HA DEMOSTRADO SIEMPRE SU AMOR, QUE ME HA ALENTADO A SEGUIR ADELANTE Y A NUNCA DARME POR VENCIDO*

*A MI MADRE, MA. DEL ROSARIO HERRERA GALLEGOS, CON MUCHO CARIÑO Y AMOR QUIEN ES UN EJEMPLO DE VIDA Y QUE ESTUVO APOYÁNDOME EN TODO MOMENTO*

*A MI PADRE, ANTONIO RODRÍGUEZ MUÑOZ, CON RESPETO Y AMOR QUIEN NUNCA DUDÓ DE MI Y ME ENSEÑÓ A LUCHAR POR MIS OBJETIVOS*

*A MIS HERMANAS MARI Y VERITO CON QUIENES HE VIVIDO INNUMERABLES MOMENTOS, POR HACERME REIR Y POR DARME ALIENTO EN MOMENTOS DIFÍCILES*

*AL RECUERDO DE MIS ABUELOS: ANTONIO, AMPARO, BENITO Y GUADALUPE*

*A LA FAMILIA DÁVILA OROZCO QUIENES AHORA SON MI SEGUNDA FAMILIA Y ME HAN APOYADO INCONDICIONALMENTE*

***Pantoea agglomerans* CAUSANDO ESTRÍAS CLORÓTICAS EN LÍNEAS E  
HÍBRIDOS COMERCIALES DE MAÍZ (*Zea mays* L.)**

Rodríguez Herrera José Antonio, M.C.

**Colegio de Postgraduados, 2013**

**RESUMEN**

En la región de Valles Altos Centrales de México (VAC) que aporta el 16% de la producción nacional de maíz el uso de semilla certificada es únicamente del 6%. En la actualidad las enfermedades causadas por bacterias se han presentado con mayor frecuencia en esta región. Síntomas de estrías cloróticas se han observado en la base del tallo en híbridos comerciales y líneas progenitoras de maíz. Durante el periodo primavera-verano 2012 se sembraron 18 parcelas con el híbrido trilineal H-70 y sus respectivos progenitores en un diseño de bloques completos al azar con dos fechas diferentes de siembra en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) ubicado en Santa Lucía de Prías, Coahuila, Edo de México (2200 msnm). Los primeros síntomas se observaron a los 15 días después de la emergencia de plántulas, los aislamientos se hicieron de la zona de avance de la enfermedad en medio B de King. Después de 48 h se obtuvieron de manera consistente bacterias anaeróbicas, de color amarillo pálido, no mucilaginosas, Gram negativas. La patogenicidad de estos aislamientos se verificó por inoculación en plántulas de maíz de 15 días de edad con el método de inyección en la base del tallo. Después de 8 días se observaron los primeros síntomas, las plántulas inoculadas con agua y no inoculadas no presentaron síntomas. Se realizaron los reaislamientos y se observaron colonias con características similares y con capacidad de utilizar de glicerol, D-glucosa, manitol, arbutina, salicina, celobiosa, maltosa, melobiosa, D-fucosa y D-arabitol. Se observó que estos aislamientos producen biofilm en un rango de 0.07 a 0.38 unidades relativas (Biofilm/crecimiento total). La identificación filogenética se realizó mediante la amplificación y secuenciación del 16S rDNA indicando que las secuencias obtenidas pertenecían a *P. agglomerans*. Se realizó una prueba de viabilidad con 200 semillas obtenidas de plantas con síntomas y asintomáticas; la viabilidad se redujo en un 7.5% en comparación de las semillas obtenidas de plantas asintomáticas. Estos resultados indican que *P. agglomerans* está presente en híbridos de la región y que las semillas obtenidas de plantas con síntomas presentan una disminución en la viabilidad. Estos resultados son útiles para los programas de mejoramiento y certificación de semillas.

**Palabras clave:** Híbridos comerciales, líneas, bacteria, identificación filogenética, pruebas bioquímicas, calidad fisiológica.

***Pantoea agglomerans* CAUSING CHLOROTIC STREAKS IN COMMERCIAL  
HIBRIDS AND PARENT LINES OF MAIZE (*Zea mays* L.)**

Rodríguez Herrera José Antonio, M.C.

**Colegio de Postgraduados, 2013**

**ABSTRACT**

In the Central Highlands region that provides 16% of the national production of maize the use of certificated seed is only of 6% . Actually bacterial diseases have been observed more frequently in this region. Chlorotic strikes have been observed in hybrids and its parents. During 2012 spring-summer was planted 18 plots with trilineal hybrid H-70 and its parents. First symptoms were observed 15 days after emergency, isolations were taken from the affected zone and cultivated in King's medium B. Anaerobic bacterium, light yellow, not mucilaginous, Gram negative were obtained from the leaves. Pathogenicity was tested by inoculation in maize 15-day seedlings. After 8 days it was observed first symptoms. Re-isolations were made and it was observed colonies with equal characteristics able to use glycerol, D-glucose, arbutine, salicine, celobiose, maltose, melobiose, D-fucose and D-arabitol. These strains produced biofilm from 0.07 to 0.38 relative unites (Biofilm/total grow). Phylogenetic identification was realized through amplification and sequencing of 16S rDNA. Sequences were identified as *Pantoea agglomerans*. Physiologic quality seed from hybrid and its parents was tested using a standard germination test without significant differences. A viability test was performed and the viability was reduced 7.5% compared with seeds from healthy plants. *P. agglomerans* is causing chlorotic strikes in the hybrid H-70 and its parents, and the presence of these symptoms affects the viability of seeds. These results are useful to improvement and certification programs of seeds.

**Key words:** Commercial hybrids, lines, bacterium, phylogenetic identification, biochemical tests, physiology quality.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	i
<b>DEDICATORIA</b>	ii
<b>RESUMEN</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	iv
<b>CONTENIDO</b>	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
1.1 Objetivo general	2
1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	3
1.3.1 Hipótesis general	3
<b>CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
2.1 Descripción del cultivo	4
2.1.1 Origen del maíz	4
2.1.2 Importancia mundial	4
2.1.3 Importancia nacional	4
2.2 Importancia de las enfermedades en las plantas	5
2.3 Enfermedades del cultivo de maíz	6
2.4 Enfermedades ocasionadas por hongos y oomycetos	6
2.5 Enfermedades ocasionadas por virus	7

2.6 Enfermedades ocasionados por procariotes	8
2.6.1 Generalidades	8
2.6.2 Enfermedades ocasionadas por procariotes en México	9
2.6.3 Descripción taxonómica de <i>P. agglomerans</i>	10
2.6.3.1 Descripción del Género <i>Pantoea</i> spp.	10
2.6.4 Antecedentes de enfermedades ocasionadas por <i>Pantoea</i> spp. en maíz	11
2.6.4.1 <i>Pantoea stewartii</i>	11
2.6.4.2 <i>Pantoea ananatis</i>	13
2.6.4.3 <i>Pantoea agglomerans</i>	15
2.7 Identificación molecular de procariotes	16
2.7 Literatura citada	19
<b>III. MONITOREO DE SÍNTOMAS DE ESTRÍAS CLORÓTICAS EN EL HÍBRIDO TRILINEAL H-70 Y EN SUS PROGENITORES</b>	28
3.1 INTRODUCCIÓN	28
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.2.1 Material genético	29
3.2.2 Fase de campo	29
3.2.3 Escala de evaluación	30
3.3 RESULTADOS	30
3.4 LITERATURA CITADA	32
<b>CAPÍTULO IV. IDENTIFICACIÓN DE <i>Pantoea agglomerans</i> MEDIANTE MÉTODOS FILOGENÉTICOS Y FORMACIÓN DE BIOFILM</b>	33
4.1 INTRODUCCIÓN	33

<b>4.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	34
<b>4.2.1</b> Aislamientos de los síntomas observados	34
<b>4.2.2</b> Extracción de DNA	35
<b>4.2.3</b> Amplificación del fragmento 16S rDNA	35
<b>4.2.4</b> Secuenciación de productos de PCR	36
<b>4.2.5</b> Análisis bioinformático de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos	36
<b>4.2.6</b> Formación de biofilm	37
<b>4.3 RESULTADOS</b>	38
<b>4.3.1</b> Aislamientos de los síntomas observados	39
<b>4.3.2</b> Amplificación del fragmento 16S rDNA	39
<b>4.3.3</b> Secuenciación de los productos de PCR y análisis de secuencias	39
<b>4.3.4</b> Formación de biofilm	41
<b>4.4 LITERATURA CITADA</b>	43
<b>V. ANÁLISIS DE LA CALIDAD FÍSICA Y FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA POBTENIDA DEL HÍBRIDO TRILINEAL H-70 CON SÍNTOMAS DE <i>Pantoea agglomerans</i></b>	45
<b>5.1 INTRODUCCIÓN</b>	45
<b>5.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	46
<b>5.2.1</b> Prueba de germinación estándar	46
<b>5.2.2</b> Prueba de viabilidad con tetrazolio	46
<b>5.3 RESULTADOS</b>	47
<b>5.3.1</b> Prueba de germinación estándar	47
<b>5.3.2</b> Prueba de viabilidad con tetrazolio	47

<b>5.4 LITERATURA CITADA</b>	49
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES</b>	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Número de accesión de aislamiento, origen geográfico, año de publicación y hospedante de las cepas seleccionadas para este estudio	38
<b>Tabla 2.</b> Cuadrados medios obtenidos del análisis de varianza de la prueba de germinación estándar.	46
<b>Tabla 3.</b> Cuadrados medios obtenidos del análisis de varianza de la prueba de viabilidad con tetrazolio	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución mundial de <i>Pantoea stewartii</i> , agente causal de la enfermedad de Stewart en maíz	13
<b>Figura 2.</b> Distribución mundial de <i>Pantoea ananatis</i>	14
<b>Figura 3.</b> Escala de daño en la lámina foliar con estrías cloróticas	30
<b>Figura 4.</b> Síntomas de estrías cloróticas observadas en el híbrido de maíz H-70	31
<b>Figura 5:</b> Colonias de color amarillo pálido y forma redonda seleccionadas para el análisis molecular	38
<b>Figura 6.</b> Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de 16 S del rDNA, tres de las secuencias obtenidas se agrupan en un solo clado	39
<b>Figura 7.</b> Gráficos de producción de biofilm	40

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad el maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cuatro alimentos más importantes en todo el mundo. En México y Mesoamérica representa el alimento principal de más de la mitad de la población. Sin embargo, existen diversos factores bióticos y abióticos que pueden reducir la producción de semilla y grano de este cultivo, por consiguiente la obtención de alimentos y productos de excelente calidad (White, 2003).

Debido a la importancia del cultivo de maíz en México y en el mundo, los productores e investigadores se han preocupado por mejorar los caracteres de esta planta. Una de las características en las cuales se ha hecho énfasis es la obtención de resistencia a organismos causales de enfermedades. En los últimos años se han puesto en marcha numerosas investigaciones con el fin de obtener híbridos que tengan un mayor rendimiento, que se adapten a las condiciones ambientales de un lugar en específico, o que tengan resistencia a fitopatógenos (Rivas-Valencia et al., 2011).

Sin embargo, este mejoramiento ha ocasionado que el maíz pierda el equilibrio genético lo que ha llevado a la susceptibilidad del cultivo a plagas o agentes patogénicos, e inclusive a las condiciones ambientales. Lo anterior ha derivado en una preocupación a diversos investigadores, los cuales han orientado sus expectativas a la producción de líneas con un alto grado de endogamia (S8), para la obtención de híbridos de cruza simple, trilineales y de cruza doble (Palafox-Caballero et al., 2006).

Los híbridos de maíz han tenido un gran auge en los últimos años, debido a que son materiales que pueden alcanzar una producción superior al promedio nacional (de León et al., 1998). Sin embargo, presentan la desventaja que las líneas utilizadas en la realización de las cruza para la obtención de un híbrido, son capaces de transmitir enfermedades a la progeie;

por medio de la autofecundación o por el uso de progenitores infectados asintómicamente. Debido a la transmisión de enfermedades, el híbrido obtenido no puede contar con la calidad fitosanitaria y fisiológica para la producción de semilla (ISTA, 2012).

Algunas de las enfermedades más importantes a nivel mundial son causadas por bacterias fitopatógenas. En 2007 en los valles altos de México se reportó a *Pantoea agglomerans*; ocasionando estrías cloróticas a lo largo de la lámina foliar, además de marchitez vascular en plantas de maíz (Morales-Valenzuela et al., 2007). Este patógeno tiene la capacidad de transmitirse a las siguientes generaciones a través de la semilla, causando pérdidas en la producción (Silva-Rojas et al., 2010).

Algunas estrategias tecnológicas con las que se cuenta actualmente permiten realizar la detección de organismos fitopatógenos antes de que la semilla se establezca en campo. La detección molecular de este tipo de microorganismos en la actualidad es de suma importancia, debido a que permite la detección oportuna y la correcta identificación de un organismo fitopatógeno (Gadsby et al., 2011). Teniendo esta información se pueden dirigir algunas estrategias de manejo para evitar la presencia de una enfermedad que ocasione daños irreversibles en el cultivo.

## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Identificar mediante métodos moleculares y bioquímicos el agente causal de estrías cloróticas en líneas de maíz con un nivel medio de endogamia (S6), utilizadas para la obtención de híbridos comerciales para la zona de los Valles altos de México y su efecto en la calidad física y fisiológica de las semillas del híbrido.

### **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar mediante métodos moleculares al agente causal de estrías cloróticas en las hojas de líneas altamente homocigóticas de maíz y en el híbrido.
- Determinar la calidad física y fisiológica del híbrido H-70, para observar su potencial de desarrollo y viabilidad.

### **1.4 HIPÓTESIS**

#### **1.4.1 Hipótesis general**

Los síntomas de estrías cloróticas en el cultivo de maíz en valles altos del oriente del Estado de México pueden ser ocasionados por *Pantoea agglomerans* u otra especie del mismo género.

## **II. REVISIÓN GENERAL DE LITERATURA**

### **2.1 Descripción del cultivo**

#### **2.1.1 Origen del maíz**

El maíz es originario de México, actualmente se encuentra distribuido en casi todo el mundo. Los vestigios más antiguos del maíz se han encontrado en el valle de Tehuacán en México y datan de hace aproximadamente 5,000 años a.C. (White, 2003; Kato, 2009).

#### **2.1.2 Importancia mundial**

En el año 2011 se alcanzó una producción mundial de 883.4 millones de toneladas en 161.9 millones de ha cosechadas, dentro de los principales países productores de maíz se encuentra Estados Unidos con una producción de 316.91 millones de toneladas, en segundo lugar China con una producción de 192.9 millones de toneladas y en tercer lugar Brasil con una producción de 55.66 millones de toneladas; los cuales aportan aproximadamente el 64% de la producción mundial (FAOSTAT, 2011).

#### **2.1.3 Importancia nacional**

México está ubicado en el séptimo lugar del ranking mundial de producción de maíz (FAOSTAT, 2011). En el año 2011 México alcanzó una producción de 17.6 millones de toneladas de maíz sembradas en 7.75 millones de ha en todo el país. La producción nacional se encuentra distribuida principalmente en el estado de Sinaloa que produce cerca del 16.4% del total nacional, seguido por el estado de Jalisco que alcanza el 14.2% y el Estado de Chiapas con un 8.5% del total de la producción nacional. Esta producción total alcanzó un valor de 71.9 millones de pesos. Sin embargo, hubo pérdidas por distintos factores dentro de

los que se pueden incluir condiciones ambientales adversas y la aparición de enfermedades. Estos factores ocasionaron que solo se cosecharan 6.06 millones de ha del total nacional (SIAP, 2011).

La región de Valles Altos o Altiplano Central de México, comprende los Valles Altos y fríos de los estados de Guerrero, Morelos, Puebla, Tlaxcala y México (Muñoz, 2003). La producción en el 2011 en el estado de Morelos fue de 89,000 t, en el estado de Tlaxcala fue de 158,000 t, en el Estado de Puebla fue de 611,000 t, en el Estado de México se obtuvo una producción de 649,000 t, el estado de Guerrero tuvo una producción de 1.3 millones de toneladas (SIAP, 2011). Esto nos da un total de 2.8 millones de toneladas que es aproximadamente el 15.9% del total de la producción de maíz a nivel nacional. Lo que nos indica que la región de Valles Altos centrales de México es una zona importante para la producción de maíz dedicado al autoconsumo y a la industria.

## **2.2 Importancia de las enfermedades en plantas**

Las enfermedades en las plantas son de suma importancia para la humanidad, debido a que dañan los productos y subproductos que sirven para la alimentación, muebles, vestido e inclusive para la vivienda. Las pérdidas ocasionadas por las enfermedades pueden ser desde 10% hasta alcanzar el 100% de la producción. La cantidad de la cosecha puede ser reducida por enfermedades en el campo y en el almacén. Frecuentemente pueden ocurrir pérdidas severas en la calidad de los productos agrícolas, debido a que algunos síntomas no afectan la cantidad de la cosecha, sin embargo la afección se ve reflejada en el precio que obtenga el producto en el mercado (Agrios, 2005).

### **2.3 Enfermedades del cultivo de maíz**

Todas las partes de la planta son susceptibles a enfermedades que pueden de reducir el crecimiento de la planta y pueden llegar a producir pérdidas de las cosechas (Donald, 2004). Existen diversos factores adversos que inciden en la baja productividad del cultivo y pueden ser: canículas, suelos pobres en nutrimentos, erosionados, con pendiente pronunciada, presencia de malezas, plagas y enfermedades que en conjunto reducen la producción de maíz en un millón de toneladas (Betanzos et al., 2001). Es imposible medir la pérdida anual real causada por las enfermedades debido a que cada año se presenta alguna enfermedad, por lo que es imposible conocer la producción en ausencia de enfermedades (Donald, 2004).

### **2.4 Enfermedades ocasionadas por hongos y oomycetos**

Los hongos son un grupo diverso de eucariotes, cuyo cuerpo o soma está constituido por micelio. Se reproducen por medio de esporas o conidios que pueden variar en su tamaño, color y forma. Las estructuras propagativas y de reproducción que forman los hongos van desde células simples a grandes cuerpos fructíferos. Este grupo de organismos ocasionan la mayoría de las enfermedades infecciosas de las plantas, se conoce que más de 8,000 especies de hongos son patógenos de plantas. Los hongos pueden causar una gran variedad de síntomas, que van desde pudriciones de raíces, manchas foliares y marchitamientos (Donald, 2004).

Las principales enfermedades del maíz causadas por hongos y oomycetos son ocasionadas por *Pythium ultimum* (Harman et al., 2004), *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*) (Murillo-Williams et al., 2008) y *Pythiogeton zae* (Jee et al., 2000) que causan síntomas de Damping-off y pudriciones de raíz. Otras enfermedades ocasionadas por hongos son las manchas foliares y marchitamientos por *Rhizoctonia solani* (Gonzalez-Vera et al., 2010),

*Bipolaris maydis* (= *Helminthosporium maydis*) (Yuanzeng et al., 2012), *Physoderma maydis* (Zidian et al., 2011), *Colletotrichum graminicola* (Venard and Vaillancourt, 2007), y *Cercospora zea-maydis* (Paul and Munkvold, 2005). Las enfermedades conocidas como carbones y royas son ocasionadas por hongos pertenecientes a los géneros *Ustilago maydis* (Robin et al., 2010), *Sporisorium reiliana* (= *Sphaceloteca reiliana*) (Xu et al., 1999), *Puccinia polysora* (Chávez-Medina et al., 2007); y *Puccinia sorghi* (Deadman et al., 2006).

## **2.5 Enfermedades ocasionadas por virus**

En la actualidad se han descrito más de 400 virus que ocasionan enfermedades en las plantas cultivadas, que son clasificados en cerca de 35 géneros. La mayoría de los virus que infectan plantas tienen como material genético RNA monocatenario de sentido positivo, pero se ha demostrado que un gran número de virus contienen DNA (Agrios, 2005). Los virus de RNA monocatenario de sentido positivo son virus pequeños con un genoma de aproximadamente 4000 a 20000 nucleótidos (Llácer et al., 2000).

Los síntomas ocasionados por los virus se pueden localizar en la zona de la infección, o en un área, tejido u órgano de la planta hospedante o ser sistémicos. Los síntomas más frecuentes son cambios de coloración en el área foliar como: clorosis, amarillamientos, moteados, necrosis, y alteraciones en el desarrollo como enchinamientos, sobre desarrollo de algunas zonas de la lámina foliar, acortamiento de entrenudos, entre otros (Llácer, 2000).

A nivel mundial la principal enfermedad viral en el cultivo de maíz es el mosaico del enanismo (MDMV) (Jones et al., 2007), dentro de otras enfermedades que afectan el cultivo de maíz son el virus del enanismo clorótico del maíz (MCDV) (Louie, 1999), el virus del

rayado fino del maíz (MFSV) (Todd et al., 2010), y el Virus del enanismo rugoso del maíz (MRDV) (Donald, 2004).

## **2.6 Enfermedades ocasionadas por procariotes**

### **2.6.1 Generalidades**

En el mundo son conocidas alrededor de 1600 especies de bacterias, algunas benéficas o patógenas para el ser humano, y otras afectando sus cultivos de interés. Las bacterias fitopatógenas se conocen desde el año de 1884, y son el grupo más numeroso de procariotes que causan enfermedades a las plantas (Agrios, 2005). La mayoría de bacterias fitopatógenas son saprófitos facultativos, y pueden ser reproducidas artificialmente en medio de cultivo. Actualmente existen unas 60 especies reconocidas que incluyen 300 subespecies y patovares que ocasionan enfermedades en las plantas (Llácer, 2000).

La célula bacteriana contiene una pared celular constituida de mureina. Sin embargo, dentro del grupo de los procariotes existen algunos organismos que carecen de esta pared, son pleomórficos y no pueden ser cultivados *in vitro*, comúnmente son denominados Candidatus, a la fecha se ha reportado a Ca. *Phytoplasma*, Ca. *Liberibacter* y Ca. *Phlomobacter* (The IRPCM Phytoplasma, 2004 and Abalain-Colloc, 1993). El grupo de las Eubacterias presenta una pared celular constituida por lípidos unidos mediante enlaces éster (Woese, 2006).

La información genética de los organismos procariotes se encuentra concentrada en una región del citoplasma conocida como nucleoide bacterial. El nucleoide es de aspecto fibroso y constituye el generóforo o cromosoma. El nucleoide se encuentra en la zona central del citoplasma; en él es frecuente encontrar fragmentos de DNA extracromosómico denominados

plásmidos que pueden codificar para funciones esenciales en la interacción planta-patógeno (Llácer, 2000).

Dentro de los procariotes que ocasionan enfermedades en el maíz se pueden encontrar los siguientes: *Pseudomonas avenae* (= *Acidovorax citrulli* comb. Nov. Bull et al., 2012), *Erwinia chrysanthemi* (= *Dickeya chrysanthemi* nov. comb. Samson et al., 2005), *Pantoea stewartii* (Albarracín-Oreo, 2012; Herrera, 2008; APS Michener, 2002), *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Beattie and Marcell, 2002), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Donald, 2004), *Pantoea agglomerans* (Morales-Valenzuela et al., 2007) y *Pantoea ananatis* (Alippi, 2010; Coutinho and Venter, 2009). Los nombres de nuevas especies de procariotes son validadas de acuerdo a las normas List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN, <http://www.bacterio.net>).

### **2.6.2 Enfermedades causadas por procariotes en México**

Muchos cultivos en México con atacados por procariotes ocasionan pérdidas en la producción de productos alimentarios. Las enfermedades ocasionadas por estos microorganismos han tenido un gran auge en los últimos años. Por estas causas se han tomado medidas preventivas para poder evitar la presencia de procariotes y de este modo minimizar las pérdidas en los cultivos. Algunas enfermedades de este tipo que se han reportado últimamente en México son las siguientes: Marchitez del chile por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (García-Estrada, 2000), *Candidatus Liberibacter psyllaourous* (= *Ca. Liberibacter solanacearum*) en papa (Munyaneza and Sengoda, 2009), *Pantoea agglomerans* ocasionando estrías cloróticas en híbridos comerciales de maíz de la región de Valles Altos del Estado de México (Morales-Valenzuela et al., 2007), *Candidatus Liberibacter solanacearum* en

pimiento (Munyanza et al., 2009), *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en semillas de sandía (Elizalde-Jiménez et al., 2011), Tizón de fuego en manzano ocasionado por *Erwinia amylovora*.

### **2.6.3 Descripción taxonómica de *Pantoea agglomerans***

El nombre de *Bacillus agglomerans* fue publicado por primera vez por Beijerinck en 1888 (Beijerinck, 1888). En el índice Bergeyana, Buchanan (1966) sugirió que se publicara el nombre y transferencia recomendada por Krasil'nikov (1949) al nombre de *Pseudomonas agglomerans*. Posteriormente, Ewing y Fife (1972) solicitaron el cambio del nombre a *Enterobacter agglomerans* reconociendo a Beijerinck como el autor original.

El género *Pantoea* spp. fue propuesto por Gavini (Gavini et al., 1989) para un grupo de procariotes que pertenecen al Phylum Proteobacteria, a la clase Gammaproteobacteria, al orden Enterobacteriales y a la familia Enterobacteriaceae (Garrity, 2001; Coutinho and Venter, 2009).

Dentro del phylum Proteobacteria se agrupan procariotes Gram-negativos que incluyen las clases Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, y Epsilonproteobacteria (Garrity, 2001).

#### **2.6.3.1 Descripción del género *Pantoea* spp.**

El género *Pantoea* spp. corresponde al anterior grupo formado por *Erwinia herbicola*/*Enterobacter agglomerans*, fue definido inicialmente por Dye y posteriormente por Ewing y Fife en 1972. En este grupo se encuentran los fitopatógenos *P. stewartii* subsp.

*stewartii* y *P. stewartii* subsp. *indologenes*, *P. ananatis*, *P. citrea* y *P. agglomerans* pvs. *milletiae*, *gypsophilae* y *betae* (Schaad, 2001).

El género *Pantoea* desarrolla colonias de color amarillo o naranja en medio yeast extract-dextrosa-CaCO<sub>3</sub> (YDC) o Nutrient-broth yeast extract agar (NBY); sin embargo, algunas cepas de *P. citrea* y *P. agglomerans* son de color blanquecino o amarillo pálido. En medio de cultivo YDC desarrolla colonias ligeramente mucoides. No presentan fluorescencia a la luz ultravioleta en King's B agar (KB). Es negativo a la ureasa y oxidasa. No crece en medio D1M agar (Schaad, 2001).

#### **2.6.4 Antecedentes de las enfermedades ocasionadas por *Pantoea* spp. en maíz**

Dentro del género *Pantoea* podemos distinguir tres especies que afectan el follaje *P. stewartii* (Stewart, 1897; Albarracín-Orio et al., 2012), *P. ananatis* (Coutinho and Venter, 2009), y *P. agglomerans* (Morales-Valenzuela et al., 2007). Las cuales son bacterias móviles a excepción de *P. stewartii* (Janda, 2006) y cuentan con el sistema de secreción tipo tres en el cual se inyectan proteínas al interior de la célula del hospedante (Type Three Secretion System, TTSS) (Tang, 2006).

##### **2.6.4.1 *Pantoea stewartii***

La enfermedad de Stewart se reportó por primera vez en el año de 1987, en Queens, New York en la variedad de maíz dulce Manhattan. Se encontró que esta enfermedad ocasionaba pérdidas del 20 al 40%. Los síntomas observados fueron marchitez gradual de las hojas y muerte total de la planta en un lapso que varió de 4 días hasta un mes después de la aparición de los primeros síntomas. Al realizar cortes longitudinales de los tallos infectados se pudo

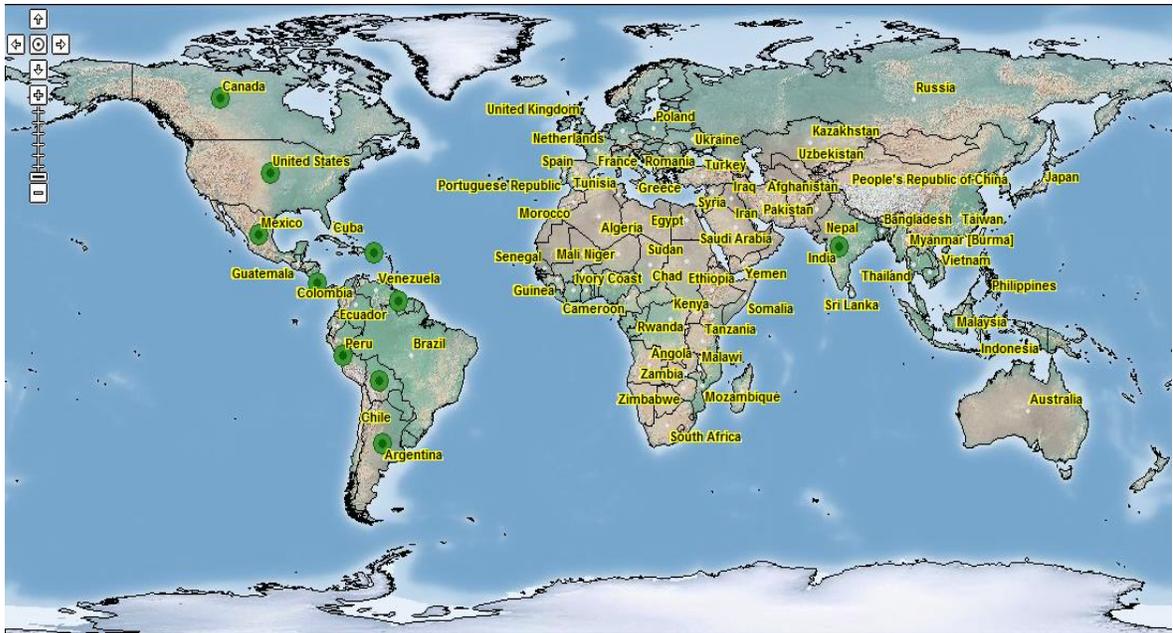
observar que los haces vasculares se tornaban de color amarillo y en cortes de tallos de plantas muertas se observó una coloración oscura (Stewart, 1987).

Esta enfermedad puede ocasionar dos tipos de infección. i) El primer tipo de infección afecta la etapa de plántula, es una infección sistémica y el patógeno se mueve dentro de los haces vasculares; los síntomas típicos son la reducción del tamaño y peso de la mazorca, o en ocasiones no se presenta producción de esta; la infección ocurre antes de la etapa de dos o tres hojas y puede ocasionar la muerte del tallo principal si se afecta el punto de crecimiento. ii) El segundo tipo de infección se presenta cerca o después de la antesis, ocasiona síntomas de estrías necróticas en las hojas (Michener et al., 2002).

Con el paso de los años se investigó el desarrollo de la enfermedad, en 1998 se reportó la transmisión de *P. stewartii* por medio de semilla obtenida de una generación anterior que fue sembrada en condiciones de invernadero y de campo. Se evaluaron dos tratamientos, el primero con semillas provenientes de plantas inoculadas con el patógeno y el segundo de plantas infectadas naturalmente. El promedio de transmisión de semillas provenientes de semillas inoculadas fue de 0.00142, que fue 6.5 mayor que el promedio de transmisión en semillas provenientes de plantas infectadas naturalmente que fue de 0.00022 (Block et al., 1998).

Debido a la importancia de esta enfermedad en algunos países prohibieron la importación de maíz producido en Estados Unidos de América para evitar la entrada de *P. stewartii*. Por lo que la semilla producida en USA tiene que ser certificada libre de *P. stewartii*. Esta certificación está basada en inspecciones de campo o de invernadero (Michener et al., 2002).

Durante los últimos años esta enfermedad se ha dispersado en algunos países de América y Asia, como Argentina (Albarracin-Orio et al., 2012) y Korea (Choi and Kim, 2013). Figura 1.



**Fig. 1.** Distribución mundial de *Pantoea stewartii*, agente causal de la enfermedad de Stewart en maíz.

#### 2.6.4.2 *Pantoea ananatis*

*P. ananatis* es un procarionte que puede infectar a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, se reportó por primera vez en el año 1928 ocasionando pudrición en frutos de piña en Filipinas (Serrano, 1928). En Sudáfrica se encontró que la infección de este patógeno ocasiona la pudrición de los tallos de maíz (Goszczyńska et al., 2007).

Este patógeno se encuentra distribuido en casi todo el continente americano, en el sur de África, en algunos países de Europa y Asia (Plantwise, 2013). Figura 2.

En Argentina en la región de Laguna Blanca, Formosa, se reportó una enfermedad que ocasionaba la formación de estrías de color claro sobre las hojas o manchas irregulares de color blanco, en ocasiones con los márgenes de color púrpura o rojizo. El agente causal fue identificado como *P. ananatis*. Del mismo modo en Brasil se reportaron síntomas de

manchas necróticas o blanquecinas y estriados a lo largo de la lámina foliar en el cultivo de maíz ocasionadas por *P. ananatis* (Bomfeti et al., 2008).



**Fig. 2.** Distribución mundial de *Pantoea ananatis*.

En el año 2007 y 2010 se reportó en los estados de Puebla y Tlaxcala una enfermedad ocasionada por *P. ananatis*, que se caracterizaba por la formación de manchas de color blanquecino que posteriormente se tornaban necróticas (Pérez-y-Terrón, 2009; Silva-Rojas et al., 2012).

En el año 2010 se hizo el primer reporte de *P. ananatis* atacando maíz en Polonia y en Europa. Los síntomas que presenta la enfermedad son manchas necróticas en las hojas (Krawczyk, 2010).

Dentro del rango de hospedantes podemos encontrar a plantas de los géneros *Cattleya* sp., *Musa* sp., *Cassia* sp., *Saccharum* spp. y *Zea mays*. Los síntomas ocasionados varían dependiendo del hospedante, pueden ser manchas, muerte descendente, pudrición de raíces, tallos y frutos (Coutinho and Venter, 2009).

#### 2.6.4.3 *Pantoea agglomerans*

En el valle de México durante los años 2004 a 2006 se observaron síntomas de una nueva enfermedad en maíz, que se expresaba como estrías cloróticas en las hojas y marchitez vascular. En 2007 se reportó por primera vez en los valles altos del Estado de México a *Pantoea agglomerans* ocasionando los síntomas descritos. Para poder determinar al agente causal realizaron aislamientos de porciones de tejido enfermo y tejido sano de la hoja, en medio de cultivo Casamino-Peptona-Glucosa (CPG), en el que se desarrollaron colonias de color amarillo. Estas colonias fueron aisladas e identificadas mediante pruebas bioquímicas como pertenecientes al género *Pantoea*.

Para determinar la especie se realizó una identificación filogenética amplificando el gen 16S rRNA, mediante una PCR convencional utilizando los primer 8F/1492R, y se secuenciaron con los primer universales U514F/800R, El árbol filogenético agrupó las secuencias en estudio dentro del clado de *Pantoea agglomerans* junto con las especie tipo. Sumado a esto se realizaron pruebas de patogenicidad en plántulas susceptibles de maíz de tres semanas de edad, las que mostraron lesiones acuosas en hojas jóvenes a los ocho días después de la inoculación, seguidas de estrías cloróticas, posteriormente mostraron síntomas de marchitez vascular. Al infiltrar los aislamientos en hojas de tabaco se indujo una reacción de hipersensibilidad a los cuatro días después de la inoculación, lo que indicó la presencia del sistema de secreción tipo III (TTSS). Se realizó el reaislamiento de la bacteria, la que mostró una máxima identidad de 100% con las secuencias correspondientes a las bacterias previamente identificadas (Morales-Valenzuela et al., 2007).

Para poder determinar si este patógeno se trasmite a la semilla en la próxima generación se realizó un estudio en el año 2010 en condiciones de invernadero. Para este experimento se

utilizaron las variedades de maíz HS2 y triunfo, que son dos híbridos trilineales y Cacahuacintle, un material nativo de México. Se sembraron 1200 semillas, provenientes de plantas que fueron inoculadas con *P. agglomerans* en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Los primeros síntomas se observaron a los 15 días después de la emergencia de la planta, se seleccionaron pequeñas porciones de tejido enfermo y se realizaron los reaislamientos del agente causal en medio de cultivo CPG. Para verificar la identidad de la bacteria responsable de las estrías cloróticas; se secuenció el gen 16S rRNA y mediante la opción Blast-Nucleotide del GenBank se identificó como *P. agglomerans*. Finalmente se determinó un rango de transmisión del 6 al 26% en los híbridos Triunfo, HS2 y en la variedad Cacahuacintle (Silva-Rojas et al., 2010).

La transmisión de patógenos a la semilla es un problema importante, debido a que el desarrollo de un cultivo depende directamente de la calidad física, fisiológica y sanitaria de la semilla.

## **2.7 Identificación molecular de procariotes**

El manejo de enfermedades ocasionadas por procariotes requiere de una detección oportuna y de una identificación correcta del agente causal. El diagnóstico de las enfermedades bacterianas puede ser relativamente sencillo, cuando la sintomatología típica es evidente, sin embargo, en muchas ocasiones los síntomas en las plantas pueden ser confundidos con aquellos ocasionados por otros factores bióticos y abióticos. Por otro lado, la detección de procariotes en especies vegetales donde los síntomas no son visibles puede ser un tanto más difícil (Palacio-Bielsa et al., 2009).

Actualmente existen pruebas que ofrecen mayor sensibilidad y especificidad, además, pueden ser más rápidas que los métodos convencionales para la detección de bacterias fitopatógenas en distintos hospedantes y ambientes (Vincelli and Tisserat, 2008).

Los tratados de libre comercio han permitido la apertura de las fronteras en varios países, sin embargo, estas acciones pueden derivar en la introducción de nuevas enfermedades. El principio que rige la prevención de enfermedades indica que cuando los recursos de inóculo han sido identificados se deben tomar medidas para prevenir futuros brotes de estas enfermedades. Por consiguiente la detección de organismos causales de enfermedades es esencial, principalmente de aquellos transmitidos por semillas contaminadas o material propagativo.

Algunos países han implementado sistemas de cuarentena y regulación para evitar la difusión y/o prevención de la introducción de patógenos exóticos. Para alcanzar este objetivo han sido diseñados sistemas de control para una rápida, sensible y específica detección y entre ellos se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Palacio-Bielsa et al., 2009).

La PCR es mundialmente reconocida como una técnica para realizar un número indeterminado de copias *in vitro* de DNA. Para eficientizar la sensibilidad de la reacción se pueden realizar algunas acciones como el incremento de la cantidad de inóculo en medios de cultivo previo a las pruebas moleculares (Vincelli and Tisserat, 2008).

La identificación filogenética de procariotes se realiza mediante la amplificación del fragmento 16S del rDNA que tiene una longitud aproximada de 1500 pares de bases (bp), es codificado por el gen 16S ribosomal RNA (*rrs*), a partir de la secuencia de este fragmento se puede obtener información filogenética y taxonómica de organismos procariotes. Este es un fragmento altamente conservado, presenta regiones comunes en varios organismos, pero

contiene variaciones acumuladas en zonas específicas de la secuencia (Rodicio and Mendoza, 2004). El análisis de la secuencia del 16S rDNA ha sido un componente esencial en los estudios de diversidad microbiana en varios hábitats. La alta conservación de la secuencia permite el análisis filogenético de la diversidad de organismos y la identificación de nuevos taxa (Haas et al., 2011).

## 2.9 LITERATURA CITADA

- Abalain-Colloc, M. L., Williamson, D. L., Carle, P., Abalain, J. H., Bonnet, F., Tully, J. G., Konai, M., Withcomb, R. F., Bové, J. M., and Chastel, C.** 1993. Division of group XVI Spiroplasmas into subgroups. *Int J Syst Bacteriol.* 43:342-346
- Agrios, G. N.** 2005. *Plant Pathology*. Fifth edition. Department of Plant Pathology University of Florida. Elsevier. USA. 922 pp.
- Albarracín-Orio, A. G., Brücher, E., Plazas, M. C., Sayago, P., Guerra, F., De Rossi, R., Ducasse, A., and Guerra, G. D.** 2012. First report of Stewart's wilt of maize in Argentina caused by *Pantoea stewartii*. *Plant Dis.* 96:1819.
- Alippi, A. M., and López, A. C.** 2010. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. *Plant Dis.* 94:487.
- Betanzos, M. E.** 2001. Variedades resistentes, una opción para reducir la pudrición de mazorca en Chiapas, México. *Agric. Téc. Méx.* 27:57-67.
- Beattie, G. A., and Marcell, L. M.** 2002. Comparative dynamics of adherent and nonadherent bacterial populations on maize leaves. *Phytopathology* 92:1015-1023.
- Block, C. C., Hill, J. H., and McGee, D. C.** 1998. Seed transmission of *Pantoea stewartii* in field and sweet corn. *Plant Dis.* 82:775-780.
- Bomfeti, C. A., Souza-Paccola, A., Massola Júnior, N. S., Marriel, I. E., Meirelles, W. F., Casela, C. R., and Paccola-Meirelles, L. D.** 2008. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. *Trop. Plant Pathol.* 33:1-6.

- Buchanan, R. E., Holt, J. G., and Lessel, E. F. Jr.** 1966. Index Bergeyana: an Annotated Alphabetic Listing of Names of the Taxa of the Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins. 888 pp.
- Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., and Takiyawa, Y.** 2012. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). J. Plant Pathol. 94:21-27.
- Card, S. D., Pearson, M. N., and Clover, G. R. G.** 2007. Plant pathogen transmitted by pollen. Australas. Plant Pathol. 36:455-461.
- Chávez-Medina, J. A., Leyva-López, N. E., and Pataky, J. K.** 2007. Resistance to *Puccinia polysora* in maize accessions. Plant Dis. 91:1489-1495.
- Choi, O., and Kim, J.** 2013. *Pantoea stewartii* causing Stewart's wilt on *Dracaena sandariana* in Korea. J. Phytopathol. 161:578-581.
- Coplin, D. L., Majerczak, R., Zhang, Y., Kim, W.-S., Jock, S., and Geider, K.** 2002. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. Plant Dis. 86:304-311.
- Córdova, H.** 1992. Respuestas diferenciales para rendimientos de híbridos de maíz evaluados en ambientes contrastantes de Latinoamérica PCCMCA. Agr. Mesoam. 3:1-8.
- Coutinho, T. A., and Venter, S. N.** 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. Mol. Plant. Pathol. 10:325-335.
- Deadman, M. L., Al Sa'di, A., and Al Maqbali, Y.** 2006. First report of *Puccinia sorghi* on maize in Oman. Plant Dis. 90:826.
- Donald, G. W.** 2004. Plagas y Enfermedades del Maíz. Tercera edición. México: The Department of Crop Sciences, Mundi-Prensa. Madrid, España. 78 pp.

- Elizalde-Jiménez, N. A., Hernandez-Morales, J., Leyva-Mir, S. G., Nava-Diaz, C., Sequeira, R. A., Fowler, G. and Magarey, R.** 2011. Evaluación del riesgo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* asociada a semilla de sandía de importación a México. Rev. Mex. Fitopatol. 29:133-145.
- Ewing, W. H., and Fife, M. A.** 1972. *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. nov. (the herbicola-lathyri bacteria). Int. J. Syst. Bacteriol. 22:4–11.
- The Statistics Division of the FAO (FAOSTAT).** 2012 (<http://faostat.fao.org/default.aspx>, consultada en Enero, 2013).
- Gadsby, N. J., Onen, A., Sally-Anne, P., Tysall, L., and Breusch, S. J.** 2011. Evaluation of real-time 16S rDNA PCR and pyrosequencing for routine identification of bacteria in joint fluid and tissue specimens. Op. J. Med. Microbiol. 1:1-6.
- García-Estrada, R. S., Juárez-Reyes, C., Carrillo-Fasio, J. A., Allende-Molar, R., Márquez-Zequera, I., and Muy-Rangel, S. P.** 2000. Marchitez bacteriana en Chile causada por *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. Rev. Mex. Fitopatol. 18:120-124.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., and De Ley, J.** 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglornerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:337-345.
- Garrity, G. M., and Holt, J. G.** 2001. Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria. pp. 155-166. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 1 (The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria) (D.R. Boone and R.W. Castenholz, eds.), Springer-Verlag, New York.

- González-Vera, A. D., Bernardes-de-Assis, J., Zala, M., McDonald, B. A., Correa-Victoria, F., Graterol-Matute, E. J., and Ceresini, P. C.** 2010. Divergence between sympatric rice- and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from Latin America. *Phytopathology* 100:172-182.
- Goszczyńska, T., Venter, S. N., and Coutinho, T. A.** 2007 Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of corn in South Africa. *Plant Dis.* 91:711–718.
- Harman, G. A., Petzoldt, R., Comis, A., and Chen, J.** 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94:147-153.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z.** 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* 21:494-504.
- Herrera, C. M., Koutsoudis M. D., W, Xiaolei and von Bodman S. V.** 2008. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* exhibits surface motility, which is a critical aspect of *stewart's* wilt disease development on maize. *Mol Plant Microbe Interact.* 21: 1359–1370
- Horst, R. J., Doehlemann, G., Wahl, R., Hoffmann, J., Schmiedl, A., Kahmann, R., Kämper, J., Sonnewald, U., and Yoll, L. M.** 2010. *Ustilago maydis* Infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. *Plant Physiol.* 152:293-308.

**The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group.**

2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 54:1243-1255.

**International Seed Testing Association (ISTA).** 2012. *International Rules for Seed Testing.*

Published by The International Seed Testing Association. Bassersdorf, CH-Switzerland.

**Louie, R.** 1999. Diseases caused by virus. pp. 39-45 In: White, D. G. (ed.) *Compendium of Corn Diseases.* APS Press, St. Paul. Mn. USA.

**Janda, J. M.** 2006. New members of the family Enterobacteriaceae. pp. 22-24. In: *The Prokariotes.* Third edition. Vol. 6. (Proteobacteria: Gamma Subclass). Springer. USA.

**Jee, H. J., Ho, H. H., and Cho, W. D.** 2000. *Pythiogeton zae* sp. nov. causing root and basal stalk rot of corn in Korea. *Mycologia* 92:522-527.

**Jones, M. W., Redinbaugh, M. G., and Louie, R.** 2007. The *Mdm1* locus and maize resistance to *Maize dwarf mosaic virus.* *Plant Dis.* 91:185-190.

**Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A., and Bye, R. A.** 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 116 pp.

**Krasil'nikov, N. A.** 1949. *Guide to the Bacteria and Actinomycetes.* Moscow: Akademiia Nauk. 830 pp.

**Krawczyk, K., Kamasa, J., Zwolinska A., and Pospieszny, H.** 2010. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *J. Plant. Pathol.* 92:807-811.

- León de, H., Jaramillo, A. Martínez, G., y Rodríguez, S.** 1998. Híbridos dobles de maíz de baja presión endogámica en F2. *Agr. Mesoam.* 9:38-41.
- Llácer, G.** 2000. *Patología Vegetal*. México: Mundi-Prensa 1165 pp.
- Maude, R. B.** 1996. *Seedborne Diseases and Their Control Principles and Practice*. CAB International. Warwick, United Kingdom. 280 pp.
- Michener, P. M., Pataky, J. K., and White, D. G.** 2002. Transmission of *Erwinia stewartii* from plants to kernels and reactions of corn hybrids to Stewart's wilt. *Plant Dis.* 86:167-172.
- 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., and Ávila-Quezada, G.** 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant. Dis.* 91:1365-1365.
- Munvold, G. P.** 2009. Seed pathology progress in academia and industry. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:285-311.
- Munyaneza J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Grazón-Tiznado, J. A. and Cardenas-Valenzuela, O. G.** 2009. First Report of 'Candidatus Liberibacter psyllaourous' in Potato Tubers with Zebra Chip Disease in Mexico. *Plant. Dis.* 93:252.
- Murillo-Williams, A., and Munkvold, G. P.** 2008. Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes. *Plant Dis.* 92:1695-1700.

- Palafox-Caballero, A., Tosquy-Valle, O. H., Sierra-Macías, M., Zambada-Martínez, A., y Córdova-Arellano, H.** 2006. Híbridos trilineales de maíz comunes y de alta calidad de proteína para Veracruz, México. *Agr. Mesoam.* 17:201-206.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., and López, M. M.** 2009. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: update review protocols (1989-2007). *J. Plant. Pathol.* 91:249-297.
- Paul, P. A., and Munkvold, G. P.** 2005. Influence of temperature and relative humidity on sporulation of *Cercospora zae-maydis* and expansion of gray leaf spot lesions on maize leaves. *Plant Dis.* 89:624-630.
- 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., and Fuentes-Ramírez, L. E.** 2009. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. *Australas. Plant Dis. Notes.* 4:96-99.
- Serrano, F. B.** 1928. Bacterial fruitlet brown-rot of pineapple in the Philippines. *Philippine J. Sci.* 36:271-324.
- Rivas-Valencia, P., Virgen-Vargas, J., Rojas-Martínez, I., Cano-Salgado, A., and Ayala-Escobar, V.** 2011. Evaluación de pudrición de mazorca de híbridos de maíz en valles altos. *Rev. Mex. Cienc. Agr.* 2:845-854.
- Rodicio, M. R., and Mendoza, M. C.** 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microb. Clin.* 22:238-245.

- Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., and Gardan, L.** 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 55:1415-1427.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W.** 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. St. Paul. Minn. USA. 373 pp.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).** 2010 (<http://www.siap.gob.mx/>, consultada en Mayo, 2012).
- Silva-Rojas, H. V., Esker, P. D., Mahuku, G., Peralta-Nava, J. A., Cortes-Cueto, A.L., and Rodríguez-Herrera, J. A.** 2012. *Pantoea ananatis*, a maize plant pathogenic bacterium associated with chlorotic streaks and rolling upper leaves. Phytopathol. 102:S6.6.
- Silva-Rojas, H. V., Mahuku, G., and Esker, P. D.** 2010. *Pantoea agglomerans*, a maize seed transmitted bacterium in Mexico. Phytopathology 100:S119.
- Stewart, F. C.** 1897. A bacterial disease of sweet corn. New York Agric. Exp. Stn. Bull. 130:422-439.
- Tang, X., Xiao, Y., and Zhou, J-M.** 2006. Regulation of type III secretion system in phytopathogenic bacteria. Mol Plant Microbe Interact. 19:1159-1166.

- Todd, J. C., Ammar, E.-D., Redinbaugh, M. G., Hoy, C., and Hogenhout, S. A.** 2010. Plant host range and leafhopper transmission of *Maize fine streak virus*. *Phytopathology* 100:1138-1145.
- Venard, C., and Vaillancourt, L.** 2007. Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. *Phytopathology* 97:438-447.
- Vincelli, P., and Tisserat, N.** 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Dis.* 92:660-669.
- White, P. J., and Lawrence, A. J.** 2003. *Corn Chemistry and Technology*. Segunda edición. American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, Minnesota, USA. 892 pp.
- Woese, C. R.** 2006. "How We Do, Don't and Should Look at Bacteria and Bacteriology" pp. 11-12. In "The Prokariotes" Third ed. Vol 1. Springer Science+Business Media, Inc. U.S.A.
- Xu, M. L., Melchinger, A. E., and Lübberstedt, T.** 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. *Plant Dis.* 83:390-395.
- Yuanzeng, Z., Xiaomin, L., Chaoxian, L., Haiying, G., Mei, Z., Zhongfeng, L., Hongwei, C., and Jinsheng, L.** 2012. Identification and fine mapping of *rhm1* locus for resistance to southern corn leaf blight in maize. *J. Integr. Plant Biol.* 54:321-329.
- Zidian, H., Jinyong, Y., and Quanlin, Y.** 2011. Epidemic regularity of maize brown spot and resistance identification to germ breeding materials. *J. Maize Sci.* 19:131-134.

### III. MONITOREO DE SÍNTOMAS DE ESTRÍAS CLORÓTICAS EN EL HÍBRIDO TRILINEAL H-70 Y EN SUS PROGENITORES

#### 3.1 Introducción

El maíz es el alimento principal de más de la mitad de la población en México y mesomérica. En la región de valles altos del Estado de México se siembra aproximadamente el 16% de la producción total del país (SIAP, 2013).

Sin embargo, existen condiciones de carácter abiótico y biótico que limitan la producción del cultivo. Una de estas es la presencia de enfermedades dentro de los cultivos, debido a que todas las partes de la planta de maíz son susceptibles al ataque de patógenos (Donald, 2004).

En el Valle de México durante los años 2004 a 2006 se observaron en cultivos de maíz los síntomas de una enfermedad desconocida, que ocasionaba la aparición de estrías cloróticas a lo largo de la lámina foliar y marchitez vascular de la planta. En el 2007 se identificó al agente causal de esta enfermedad como *Pantoea agglomerans* mediante la secuenciación del fragmento del 16S de rDNA (Morales Valenzuela et al., 2007).

Es de suma importancia monitorear el inicio y desarrollo de una enfermedad para de este modo poder implementar acciones preventivas, correctivas y de manejo del cultivo para obtener una buena producción.

El objetivo del presente capítulo fue monitorear la aparición de síntomas de estrías cloróticas a lo largo de la lámina foliar en el híbrido H-70 y sus progenitores, para evaluar la incidencia y severidad de la enfermedad. Así como las condiciones ambientales en las que esta enfermedad puede desarrollarse con mayor intensidad.

Los síntomas de una enfermedad pueden ser medidos de diferentes formas, algunas de las variables más importantes que se pueden medir son la incidencia y la severidad; se conoce que entre ellas existen diferencias significativas, pero cuando se obtienen datos de la epidemia de la enfermedad uno puede cuantificar los cambios, e identificar relaciones entre ellas (Madden, et al., 2007)

### **3.2 Materiales y métodos**

#### **3.2.1 Material genético**

Se utilizó el híbrido trilineal H-70 el cual en ciclos anteriores presentó síntomas típicos ocasionados por *P. agglomerans*; y sus respectivos progenitores, que son la línea M-54 y M-55. El producto de esta cruce da origen al progenitor hembra, que posteriormente se cruza con la línea CML-242 para dar origen al híbrido H-70. Los materiales son provenientes del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de México.

#### **3.2.2 Fase de campo**

La siembra de las variedades se llevó a cabo en el campo de Santa Lucía perteneciente al INIFAP. Se sembraron dos ensayos en un diseño de bloques completos al azar que constaron de tres repeticiones cada uno, variando la fecha de siembra. Cada repetición sembrada con el híbrido H-70 constó de cuatro surcos, las repeticiones de la cruce simple y del progenitor hembra constaron de dos surcos.

### 3.2.3 Escala de evaluación

Los síntomas que se identificaron fueron estrías cloróticas presentes en la lámina foliar durante todo el ciclo del cultivo. Para determinar la severidad de los síntomas se realizó una escala de acuerdo a la longitud de la estría con datos obtenidos en ciclos anteriores. Teniendo cuatro niveles de síntomas que van desde nulo hasta muy severo o nivel 4.



**Fig. 3.** Escala de daño en la lámina foliar con estrías cloróticas. La escala muestra los daños cuatro niveles de severidad de la enfermedad:

0 = Ausencia de síntomas.

+ = Tejido infectado no mayor a 20%.

++ = Tejido infectado entre el 21% y 50%.

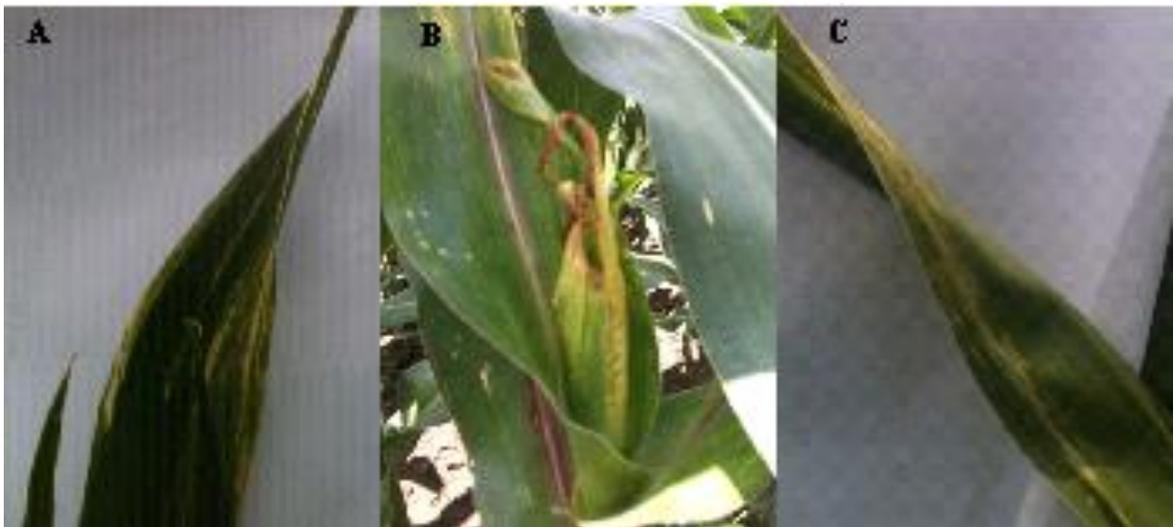
+++ = Tejido infectado igual o mayor al 51%.

### 3.3 Resultados

En las variedades M-54 y M-55 se observaron síntomas leves (+). Sin embargo, en el híbrido H-70 se pudieron observar síntomas de moderados a severos (++ a +++). Por lo que de esos síntomas, tanto en el híbrido como en sus respectivos progenitores se realizaron

aislamientos para identificar al agente causal de estos síntomas que se observaron a temperaturas que oscilaron entre los 23 y los 26°C.

El porcentaje de plantas afectadas fue aproximadamente del 10% en los casos de los progenitores y el híbrido, por lo que se puede apreciar que la incidencia de la enfermedad no varía en progenitores e híbrido, sin embargo la severidad es más intensa en el caso del híbrido.



**Fig. 4.** Síntomas de estrías cloróticas observadas en el híbrido de maíz H-70.

- A) Estrías cloróticas (+++) en la hoja superior de la planta.
- B) Enrollamiento del meristemo apical (+++).
- C) Estrías cloróticas en hojas basales.

### **3.4 Literatura citada**

- Donald, G. W.** 2004. Plagas y Enfermedades del Maíz. Tercera edición. México: The Department of Crop Sciences, Mundi-Prensa. Madrid, España. 78 pp.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F.** 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. APS Press. St. Paul. Minn. 421pp.
- 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., and Ávila-Quezada, G.** 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. Plant. Dis. 91:1365-1365.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).** 2010 (<http://www.siap.gob.mx/>, consultada en Mayo, 2012).

## IV. IDENTIFICACIÓN DE *Pantoea agglomerans* MEDIANTE MÉTODOS FILOGENÉTICOS Y FORMACIÓN DE BIOFILM

### 4.1 Introducción

El maíz es el alimento principal de más de la mitad de la población en México y mesomérica. En la región de valles altos del Estado de México se siembra aproximadamente el 16% de la producción total del país (SIAP, 2013).

Sin embargo, existen condiciones de carácter abiótico y biótico que limitan la producción del cultivo. Una de estas es la presencia de enfermedades dentro de los cultivos, debido a que todas las partes de la planta de maíz son susceptibles al ataque de patógenos (Donald, 2004).

En el Valle de México durante los años 2004 a 2006 se observaron en cultivos de maíz los síntomas de una enfermedad desconocida, que ocasionaba la aparición de estrías cloróticas a lo largo de la lámina foliar y marchitez vascular de la planta. En el 2007 se identificó como *Pantoea agglomerans* al agente causal de esta enfermedad, mediante la secuenciación del fragmento del 16S de rDNA (Morales Valenzuela et al., 2007).

Actualmente existen pruebas basadas en métodos moleculares que ofrecen una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de organismos, además, pueden ser más rápidas que los métodos convencionales para la detección de bacterias fitopatógenas en distintos hospedantes y ambientes (Vincelli and Tisserat, 2008).

El fragmento del 16S del rDNA consta de aproximadamente 1500 pares de bases (pb), es codificado por el gen 16S rRNA (*rrs*), a partir de la secuencia de este fragmento se puede obtener información filogenética y taxonómica de organismos procariotes. Este es un fragmento altamente conservado, presenta regiones comunes en varios organismos, pero

contiene variaciones concentradas en zonas específicas de la secuencia (Rodicio and Mendoza, 2004). El análisis de la secuencia del 16S rDNA ha sido un componente esencial en los estudios de diversidad microbiana en varios hábitats. La alta conservación de la secuencia permite el análisis filogenético de la diversidad de organismos y la identificación de nuevos taxa (Haas et al., 2011).

La PCR es mundialmente reconocida como una técnica para realizar un número indeterminado de copias *in vitro* de DNA a partir de una poca cantidad de inóculo. Para eficientizar la sensibilidad de la reacción se pueden realizar algunas acciones como el incremento de la cantidad de inóculo en medios de cultivo previo a las pruebas moleculares. (Vincelli and Tisserat, 2008).

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Aislamientos de los síntomas observados**

De los síntomas de estrías cloróticas observados en campo se realizaron aislamientos del tejido foliar del híbrido H-70 y de los progenitores M-54, M-55, M54\*M55 y CML-242. Se cortaron porciones de 0.5 cm por lado, los cuales se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio durante un minuto, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril, y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5mL que contenían 1mL de agua destilada estéril. Los tubos se refrigeraron durante 48 horas a 4°C. Después de transcurrido este tiempo se sembraron cada una de las muestras en forma de estría cruzada en cajas de Petri que contenían medio de cultivo B de King (Fosfato dipotásico, Sulfato de magnesio, Peptona, Glicerina, Agar). Después de 48 horas se revisaron las cajas y se purificaron para su identificación filogenética.

#### **4.2.2 Extracción de DNA**

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante el procedimiento de CTAB al 2% (Doyle and Doyle, 1990) con ligeras modificaciones. Se precalentó el CTAB a 65°C, se agregó 1mL en tubos eppendorf de 2mL previamente identificados. Se agregó una colonia de las crecidas en el medio BK. Los tubos se incubaron durante 90 min. a 65°C mezclando con vortex a intervalos de 10 min. Posteriormente se agregó 500µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión durante 10 min. se centrifugó a 3600 rpm durante 10 min y se separó la fase acuosa en la cual está contenida el DNA y se repitió nuevamente este paso con 500µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y la fase acuosa se depositó en un tubo eppendorf nuevo. Se agregó ½ volumen de alcohol de etanol al 100% y se almacenó a -20°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 3600 rpm durante 30 min. para obtener la pastilla de DNA. Se lavó la pastilla con 500µL isopropanol al 70%. Finalmente se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se hidrató con 50µL de agua HPLC estéril.

#### **4.2.3 Amplificación del fragmento 16S rDNA**

Se amplificó el 16S rDNA con los primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAC-3') y 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT-3') (Loy *et al.*, 2002), el master mix se preparó en un volumen final de 25 µL y constó de Buffer de reacción (Promega, USA), los iniciadores (Sigma, USA), DNTP's (Promega, USA), *Taq* DNA polimerasa (Promega, USA) y 100 ng de DNA. El programa que se utilizó fue el siguiente: 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 40s a 94°C, 40s a 52 °C, 1 min 30 s 72°C y una elongación final de 10 min a 72°C (Kjeldsen *et al.*, 2007). La amplificación del gen 16S rDNA se verificó

mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con red gel (Biotium, USA) corrido a 80 volts durante 90 min.

#### **4.2.4 Secuenciación de productos de PCR**

Los amplicones se limpiaron con EXOSA fueron secuenciados por el método de Sanger, se cuantificó el producto de PCR purificado por P (Affymetrix, USA), para eliminar los residuos de nucleótidos en la muestra. Los fragmentos espectrofotometría, para calcular la cantidad correcta del templado (producto de PCR) a usar en una reacción de secuenciación, la cual está en función del tamaño de fragmento amplificado para este caso se utilizaron 20 ng de DNA. La reacción de secuenciación se preparó usando el buffer 1X BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) y los primers U514F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT-3'). Se colocaron 18µL de la mezcla de las reacciones más 2 µL de cada una de las muestras en los pozos de la placa de secuenciación. y posteriormente se colocó la placa en el termociclador con el programa : 1) 96°C por 1 min, 2) 96°C por 10 s, 3) 50° por 50 s, 4) 60°C por 4 min (Eden *et al.*, 1991).

#### **4.2.5 Análisis bioinformático de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos**

Las secuencias forward y reverse se ensamblaron y editaron usando el software Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3.0 (Hall, 1999) con el cual se crearon secuencias consenso las que se compararon con las secuencias depositadas en el Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLAST-NUCLEOTIDE 2.2.1.9 (Zhang *et al.*, 2000). Para el análisis filogenético las secuencias consenso se compilaron en un archivo fasta y se alinearon el profile mode del Clustal W 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994)

incluido en el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) y analizadas con el método Máxima Parsimonia utilizando la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (nivel=1) (Saitou and Nei, 1987), con Initial Tree por adición al azar (10 reps.). Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol filogenético resultante se estimó un análisis bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Se utilizó como fuera de grupo a *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* no. de accesoión NR115041 para la construcción del árbol filogenético

#### **4.2.6 Formación de biofilm.**

Se siguió el procedimiento propuesto por Stepanovic para la formación de biofilm con ligeras modificaciones (Stepanovic *et al.*, 2000). Cuatro cepas se seleccionaron de acuerdo a su patogenicidad para la cuantificación de biofilm. Las bacterias se cultivaron en placas de Petri con medio B de King (BK). Las colonias con mayor desarrollo se sembraron en 3 mL de medio líquido Luria Bertain (LB) y BK en tubos de ensayo y se incubaron durante toda la noche a 28°C y 30°C. Las células bacterianas se diluyeron en una relación de 1:100 en 600µL de medio líquido LB y BK. Las diluciones fueron colocadas en los pozos de placas de poliestireno pozos con cuatro repeticiones cada una y fueron incubadas a 28°C y 30°C. El crecimiento total fue medido mediante la absorbancia a 650 nm (OD<sub>650</sub>) a las 24, 48, 72 y 96 horas. Se descartaron las células planctónicas y las placas se lavaron con 200µL PBS 1X tres veces. El biofilm fue fijado con 200µL de metanol al 100%. La tinción se realizó con cristal a violeta al 2%, se enjuagó tres veces con agua destilada y se dejó secar. Finalmente se agregaron 200µL de ácido acético para solubilizar la tinción. Se midió a absorbancia a 550 nm (OD<sub>550</sub>) en el lector de placas (Thermo, USA). La cantidad de biofilm

formado se reportó como el resultado de dividir  $OD_{650}/OD_{550}$ , el cual corresponde a una expresión simplificada (Niba *et al.*, 2007).

**Tabla 1.** Número de accesión de aislamiento, origen geográfico, año de publicación y hospedante de las cepas seleccionadas para este estudio.

Aislamiento (No. De accesión)	Origen geográfico	Año de publicación	Hospedante
EF050806.1	México	2007	<i>Zea mays</i>
EF050807.1	México	2007	<i>Sorghum bicolor</i>
EF050808.1	México	2007	<i>Zea mays</i>
EF050809.1	México	2007	<i>Zea mays</i>
EF050810.1	México	2007	<i>Zea mays</i>
EU130699.1	México	2007	<i>Zea mays</i>
EU130700.1	México	2007	<i>Zea mays</i>
EU598802.1	China	2008	<i>Gossypium herbaceum</i>
KF805975.1	USA	2006	<i>Allium cepa</i>
FJ611821.1	USA	1986	<i>Gypsophila paniculata</i>
CPO 1.00.9 <sup>a</sup>	México	2013	<i>Zea mays</i>
FJ611810.1	USA	2007	<i>Gossypium herbaceum</i>
DQ371232.1	Italia	2006	<i>Fraxinus</i> ssp.

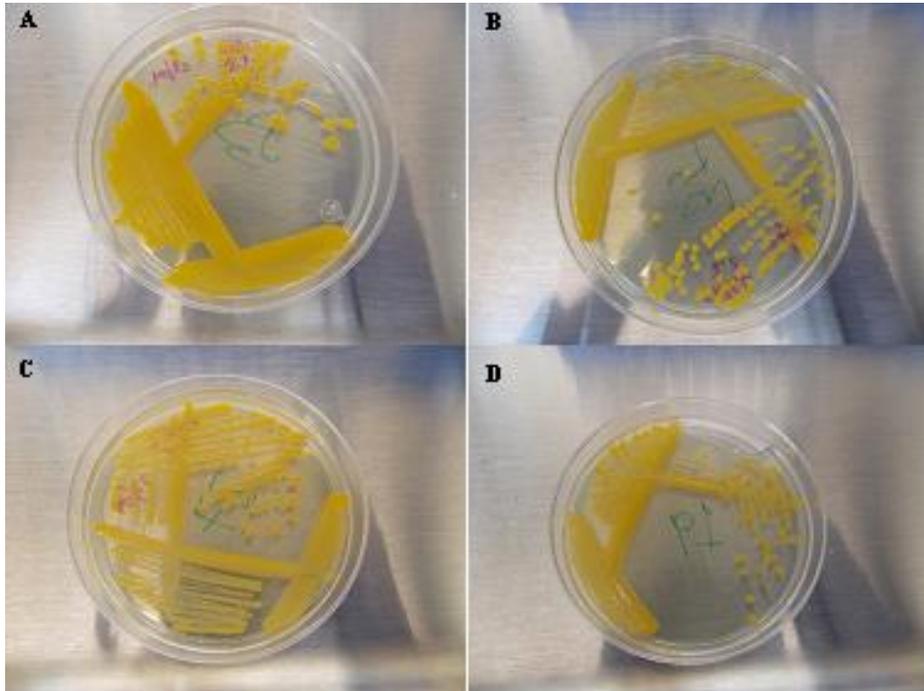
HM130693.1	China	2010	<i>Zea mays</i>
HM130692.1	China	2010	<i>Zea mays</i>
GQ374475.1	China	2010	<i>Zea mays</i>
HM130694.1	China	2010	<i>Zea mays</i>
HE716932.1	Korea	2012	<i>Poales sp.</i>
JX099348.1	China	2012	<i>Vigna angularis</i>
AY530797.1	Sudáfrica	2004	<i>Allium cepa</i>
1.002t	México	2013	<i>Zea mays</i>
1.018t	México	2013	<i>Zea mays</i>
NR_115041.1	USA	2006	<i>Zea mays</i>

---

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Aislamientos de los síntomas observados

En total se seleccionaron 46 colonias para realizar el análisis molecular. Las cuales mostraron las siguientes características: colonias de color amarillo pálido y forma ovalada a redonda. Las colonias que no presentaron estas características fueron desechadas.



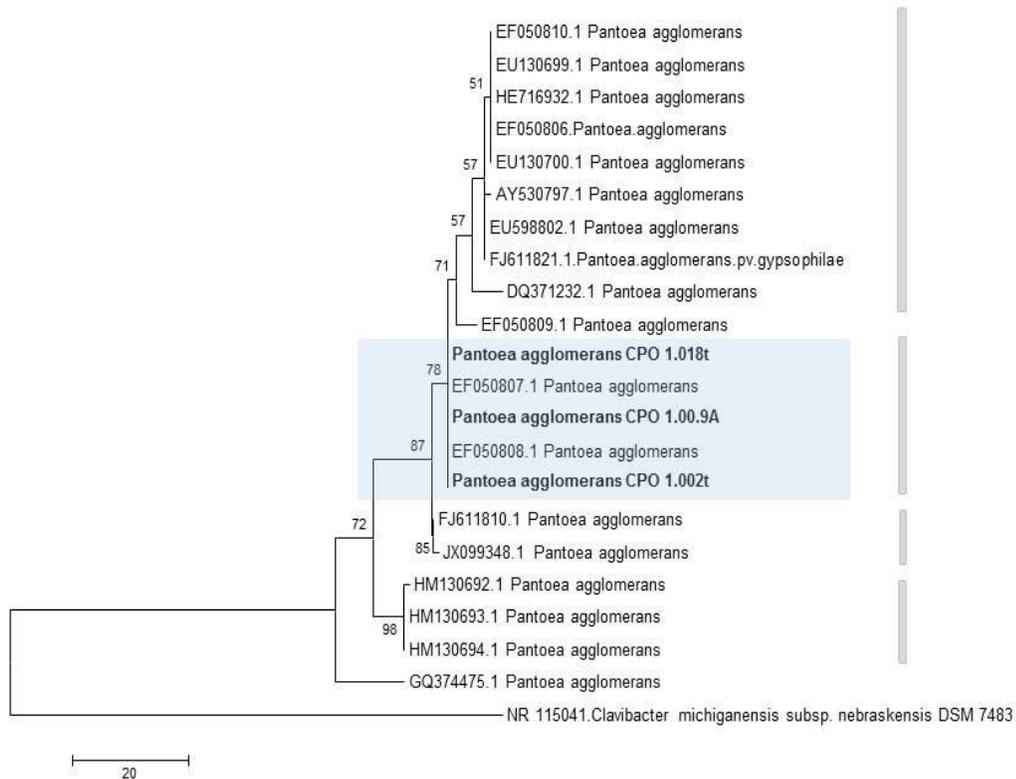
**Fig. 5:** Colonias de color amarillo pálido y forma redonda seleccionadas para el análisis molecular.

#### **4.3.2 Amplificación del fragmento 16S rDNA**

Los fragmentos amplificados con los primers 8F y 1492R fueron de 1500 pb aproximadamente, lo que indicó que el fragmento amplificado corresponde al 16S del rDNA.

#### **4.3.3 Secuenciación de los productos de PCR y análisis de secuencias**

De las 46 muestras secuenciadas, 3 se identificaron como *P. agglomerans*. Que fueron las muestras 2, 3 y 5. Con estas secuencias se realizó un árbol filogenético para ubicar a los organismos dentro de un clado filogenético.

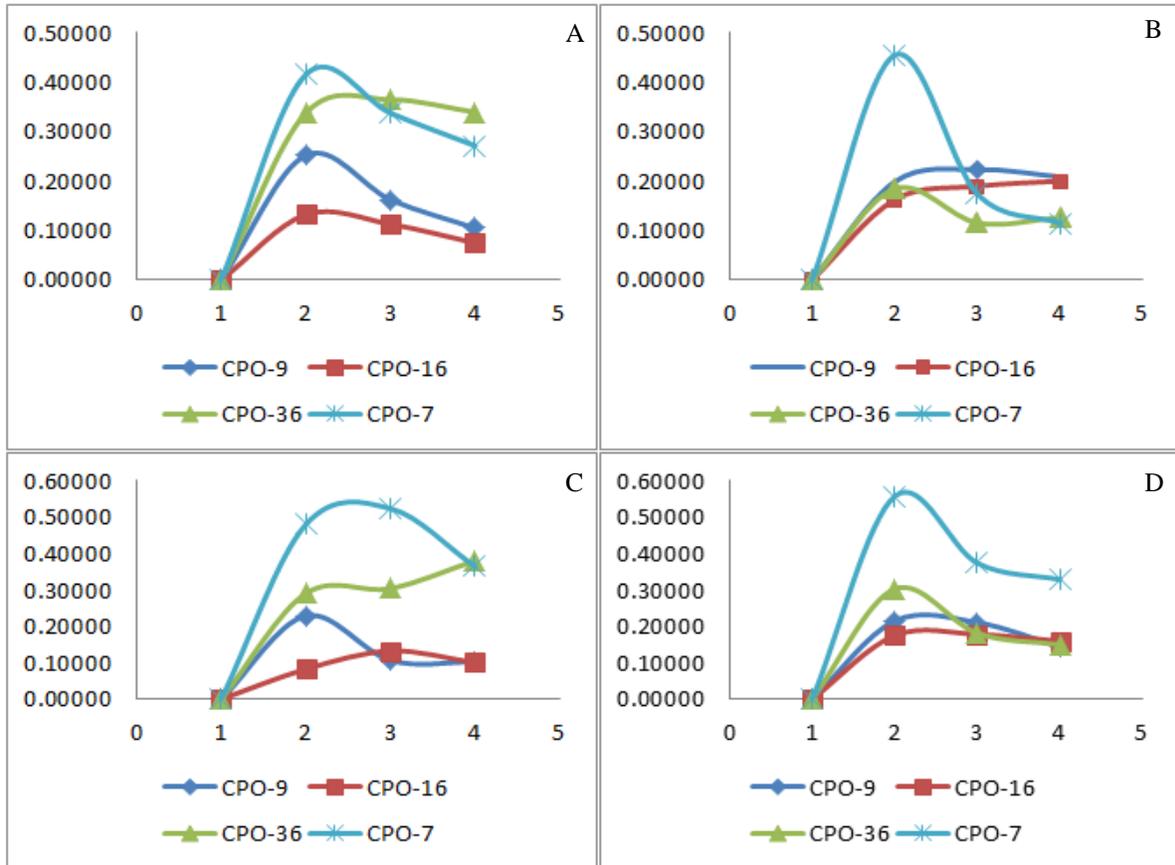


**Fig. 6.** Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de 16 S del rDNA, tres de las secuencias obtenidas se agrupan en un solo clado.

#### 4.3.4 Formación de biofilm

Para la prueba de producción de biofilm se encontró que las cinco cepas utilizadas tienen la capacidad de producir biofilm en medios enriquecidos (BK y LB), no se encontraron diferencias significativas para la producción de biofilm sin embargo se pudo apreciar que la cepa 7 tiene mayor capacidad para producir biofilm en ambos medios y creciendo a temperaturas entre 28°C y 30°C. Los resultados obtenidos nos indican que durante las primeras 48 h la formación del biofilm se ve favorecida ya que a las 48 horas se observa la mayor

cantidad producida de biofilm. Posterior a este lapso de tiempo la producción de biofilm se ve disminuida, y permanece hasta las 96 h. Fig. .



**Fig. 2.** Gráficos de producción de biofilm A) 30°C, medio BK; B) 30°C, medio LB; C) 28°C, medio BK; D) 28°C, medio LB.

#### 4.4 Literatura citada

- Donald, G. W.** 2004. Plagas y Enfermedades del Maíz. Tercera edición. México: The Department of Crop Sciences, Mundi-Prensa. Madrid, España. 78 pp.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander S. K., Sodergren, E., Methé, B., and DeSantis, T. Z.** 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* 21:494-504.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Ac. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, KH., and Wagner, M.** 2002. Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5064-5081.
- 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., and Ávila-Quezada, G.** 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant. Dis.* 91:1365-1365.
- Rodicio, M. R., and Mendoza, M. C.** 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación

del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microb. Clin.* 22:238-245.

**Saitou, N., and Nei, M. 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

**Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).** 2010 (<http://www.siap.gob.mx/>, consultada en Mayo, 2012).

**Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., and Svabic-Vlahovic, M.** 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40: 175-179.

**Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S.** 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis versión 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.

**Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.** 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Ac. Res.* 22: 4673-4680.

**Vincelli, P., and Tisserat, N.** 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Dis.* 92:660-669.

**Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller W.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences *J. Comp. Biol.* 7:203-214.

## V. ANÁLISIS DE LA CALIDAD FÍSICA Y FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA POBTENIDA DEL HÍBRIDO TRILINEAL H-70 CON SÍNTOMAS DE *Pantoea* *agglomerans*

### 5.1 Introducción

El maíz es el alimento principal de más de la mitad de la población en México y mesomérica. En la región de valles altos del Estado de México se siembra aproximadamente el 16% de la producción total del país (SIAP, 2011).

Sin embargo, existen condiciones de carácter abiótico y biótico que limitan la producción del cultivo. Una de estas es la presencia de enfermedades dentro de los cultivos, debido a que todas las partes de la planta de maíz son susceptibles al ataque de patógenos (Donald, 2004).

En el Valle de México durante los años 2004 a 2006 se observaron en cultivos de maíz del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados los síntomas de una enfermedad desconocida, que ocasionaba la aparición de estrías cloróticas a lo largo de la lámina foliar y marchitez vascular de la planta. En el 2007 se identificó como *Pantoea agglomerans* al agente causal de esta enfermedad, mediante la secuenciación del fragmento del 16S de rDNA (Morales Valenzuela et al., 2007).

Para lograr avances en el sector agrícola de un país se debe de contar con insumos que contribuyan a este propósito y uno de los más importantes es el disponer de semilla de buena calidad física y fisiológica, ya que de este modo producirán plantas fuertes y resistentes a enfermedades y/o condiciones ambientales adversas (Peretti, 1994).

La calidad física se refiere a las características físicas de las semillas que son consideradas como parámetros de calidad, tales como: contenido de humedad, peso por volumen, pureza,

tamaño y forma de la semilla, peso de mil semillas, color y presencia de daños por insectos o patógenos (Basra, 2006). La evaluación de la calidad fisiológica de las semillas consiste en su poder de dar origen a plántulas fuertes y vigorosas, para poder determinar estos parámetros existen diversas pruebas tales como: prueba de germinación estándar y prueba de viabilidad con tetrazolio (ISTA, 2012).

## **5.2 Materiales y métodos**

### **5.2.1 Prueba de germinación estándar**

De la semilla obtenida del híbrido H-70 se tomó una muestra de 400 semillas, para realizar la prueba de germinación estándar entre papel de acuerdo a las normas establecidas por la ISTA (ISTA, 2012).

Se realizaron cuatro repeticiones por cada material de 100 semillas cada una, y por cada repetición se analizaron 4 subrepeticiones de 25 semillas. Se colocaron 25 semillas sobre papel absorbente previamente humedecido con agua destilada estéril, posteriormente se cubrieron con otras dos hojas de papel absorbente humedecido y se enrolló; cada uno de los rollos se colocaron en una cámara de germinación a 25°C; y las evaluaciones se realizaron a los 7 y a los 10 días después de que se formaron los rollos para la prueba.

### **5.2.2 Prueba de viabilidad con tetrazolio**

Se tomó una muestra de 100 semillas del híbrido H-70, con la cual se establecieron cuatro repeticiones de 25 semillas. Las semillas se hidrataron durante 8 horas para incrementar su tasa respiratoria. En cada una de las semillas se realizó un corte longitudinal para dejar expuesto el embrión, y se agregó la solución de tetrazolio al 2%, se dejó reposar durante 8

horas, y se registraron los datos de aquellas semillas viables y semillas muertas o inviables; tomando como referencia que las semillas viables fueron aquellas que tuvieron una tinción de color rojo intenso y uniforme a lo largo de todo el embrión, mientras que las semillas no viables fueron aquellas que no tuvieron tinción en el embrión o que alguna de las partes de este no se tiñó.

### **5.3 Resultados**

#### **5.3.1 Prueba de germinación estándar**

Durante la prueba de germinación estándar realizada al híbrido H-70 y a sus progenitores se pudo observar que algunos síntomas típicos ocasionados por *Pantoea agglomerans* se pueden presentar antes de los 15 días después de la emergencia de las plántulas. Lo que indica que el agente patógeno se encuentra dentro de la semilla. Sin embargo, el porcentaje de germinación no se ve afectado por la presencia del patógeno, ya que al comparar el porcentaje de germinación de semillas provenientes de plantas sanas con las semillas provenientes de plantas enfermas se pudo observar que eran muy similares. Ya que se encontraban por encima de la norma de la ISTA que indica que un porcentaje de germinación superior al 85% se puede considerar como bueno y la semilla puede ser certificada para su venta.

#### **5.3.2 Prueba de viabilidad con tetrazolio**

Tras realizar la prueba de viabilidad con tetrazolio a la semilla del híbrido H-70 y a sus progenitores se pudo observar que la viabilidad se ve reducida en un 7.5% en semillas provenientes de plantas que mostraron síntomas ocasionados por *P. agglomerans*. Ya que en este tipo de semillas el porcentaje de viabilidad fue del 89% y en semillas provenientes de

plantas asintomáticas el porcentaje de viabilidad fue del 96.5%. Sin embargo los porcentajes de viabilidad en ambos casos se encuentran dentro del estándar establecido por la ISTA para que la semilla pueda ser certificada para su venta.

**Tabla 2.** Cuadrados medios obtenidos del análisis de varianza de la prueba de germinación estándar. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

	C.M.	F-VALOR	Pr>F
Tratamiento	18.00000000	1.51	0.2651
Error	11.91666667		
Total			

Si  $(Pr>F)<\alpha$  existen diferencias significativas,  $\alpha=0.05$

**Tabla 3.** Cuadrados medios obtenidos del análisis de varianza de la prueba de viabilidad con tetrazolio. Se observan diferencias estadísticamente significativas.

	C.M.	F-VALOR	Pr>F
Tratamiento	112.50000000	61.36	0.0002
Error	1.83333330		
Total			

Si  $(Pr>F)<\alpha$  existen diferencias significativas,  $\alpha=0.05$

#### **5.4 LITERATURA CITADA**

- Basra, A. S.** 2006. Handbook of Seed Science and Technology. Food Products Press. New York, USA. 389 p.
- Donald, G. W.** 2004. Plagas y Enfermedades del Maíz. Tercera edición. México: The Department of crop Sciences, Mundi-Prensa. 78 pp.
- International Seed Testing Association (ISTA).** 2012. International Rules for Seed Testing. Published by The International Seed Testing Association. Bassersdorf, CH-Switzerland.
- 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., and Ávila-Quezada, G.** 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. Plant. Dis. 91:1365-1365.
- Peretti, A.** 1994. Manual para Análisis de Semillas. Ed. Hemisferio Sur, S. A. Buenos Aires, Argentina.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).** 2010 (<http://www.siap.gob.mx/>, consultada en Mayo, 2012).

## VI. CONCLUSIONES GENERALES

En este estudio se ocuparon distintas metodologías para la presencia de *P. agglomerans* ocasionando síntomas de estrías cloróticas a lo largo del follaje en el híbrido comercial H-70 en la región de Valles altos de México. La secuenciación del 16s rDNA dio como resultado *P. agglomerans*, por lo que se deduce que este es el agente causal de los síntomas de estrías cloróticas. El árbol filogenético basado en las secuencia del 16S rDNA agrupó los aislamientos obtenidos en el mismo clado lo que sugiere que hay una región conservada en cepas patógenas de maíz.

El género *Pantoea* spp. fue propuesto por Gavini (Gavini *et al.*, 1989) para un grupo de procariones que pertenecen al Phylum Proteobacteria, a la clase Gammaproteobacteria, al orden Enterobacteriales y a la familia Enterobacteriaceae (Garrity and Holt, 2001; Coutinho and Venter., 2009). El género *Pantoea* corresponde al anterior grupo formado por *Erwinia herbicola/Enterobacter agglomerans*, fue definido inicialmente por Dye y posteriormente por Ewing y Fife en 1972 (Ewing and Fife 1972). Dentro del género *Pantoea* podemos distinguir tres especies que afectan el follaje *P. stewartii* (Albarracín-Orio *et al.*, 2012), *P. ananatis* (Coutinho and Venter, 2009), y *P. agglomerans* (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007). Las

Se observó que la presencia de este procarionte en la planta madre del híbrido H-70 puede disminuir la viabilidad de la semilla, por lo que se debe poner énfasis en el mejoramiento para la obtención de variedades que no muestren susceptibilidad a la presencia de *P. agglomerans* y poder obtener semillas con una buena calidad fisiológica y garantizar su establecimiento en campo. Las semillas de los progenitores del híbrido H-70 no mostraron disminución significativa en la calidad fisiológica.

*P. agglomerans* puede estar presente en otras variedades de maíz que son utilizadas para el mejoramiento del cultivo, o en algunas otras regiones del país, por lo que es recomendable realizar estudios en progenitores o híbridos de maíz obtenidos y en otras zonas del país para poder verificar la aparición de este patógeno. De igual manera se recomienda llevar a cabo investigaciones sobre la transmisión para poder evitar la dispersión a otras regiones del país debido a que los procariotes pueden ser transmitidos por diferentes vías.

La producción de biofilm durante las primeras 48 horas de incubación se puede asociar al inicio de la infección en una planta de maíz, ya que la presencia de exopolisacáridos (EPS) está relacionada con la patogenicidad de las bacterias fitopatógenas. La disminución en la cantidad de biofilm después de las 48 horas puede deberse a varios factores. Sin embargo, se puede deber en parte a la disminución y carencia de EPS (O'toole *et al.*, 2000). De igual modo esta disminución se puede deber a un estado de las células de hambruna o disminución de los nutrientes en el medio de cultivo (Costerton *et al.*, 1999).

Las estructuras formadas dentro un biofilm contienen canales a través de los cuales pueden circular nutrientes, además células en distintas regiones del biofilm muestran diferentes patrones en la expresión de genes. Los biofilm en ambientes naturales son resistentes al ataque de bacteriófagos, amibas, bactericidas y biocidas utilizados para combatir la contaminación biológica (Costerton *et al.*, 1999).

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio indican que *P. agglomerans* está presente en el híbrido H-70 de la región de los valles altos de México y puede ocasionar síntomas de estrías cloróticas en hojas de plantas de maíz. La presencia de este patógeno que puede tener importancia en el área del mejoramiento genético y producción de semillas ya que puede llegar a afectar la viabilidad de las semillas.