

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

ETIOLOGÍA DEL COLAPSO DEL TETECHEO (*Neubuxbaumia tetetzo* Coultier [Backeberg]) EN ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA.

DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor SERGIO ARANDA OCAMPO, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis ETIOLOGÍA DEL COLAPSO DEL TETECHO (Neubuxbaumia tetetzo Coultier [Backeberg]) EN ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA.

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 02 de OCTUBRE de 2018



Firma del
Alumno (a)



DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Etiología del colapso del tetecho (*Neubuxbaumia tetetzo* (Coulter [Backeberg]) en Zapotitlán Salinas, Puebla** realizada por el alumno: **Dimas Mejía Sánchez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

ASESOR


DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARÁZ

ASESOR


DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

ASESOR


DR. DANIEL TÉLIZ ORTÍZ

ASESOR


DR. SAMUEL RAMÍRAZ ALARCON

ASESOR


DR. MANUEL LIVERA MUÑOZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre 2018

ETIOLOGÍA DEL COLAPSO DEL TETECHO (*Neobuxbaumia tetetzo* Coultier [Backeberg])
EN ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA.

Dimas Mejía Sánchez. D. en C.
Colegios de Postgraduados, 2018

RESUMEN

El tetecho (*Neobuxbaumia tetetzo* (Coultier [Backeberg])) es una cactácea columnar endémica de México. En Zapotitlán Salinas, se han observado individuos con áreas amarillas en tallo y necrosis de tejido interno, así como pudrición blanda que invade el tallo y provoca colapso de la planta. En el tejido con pudrición y galerías del tallo se asocian diferentes insectos. El objetivo de la investigación fue: i) identificar las bacterias que causan estos síntomas; ii) identificar los insectos asociados y detectar la presencia de las bacterias causales en el intestino de estos insectos. A partir del tejido con pudrición blanda se aislaron bacterias y se inocularon en plantas sanas de tetecho reproduciendo los síntomas de pudrición. La caracterización fenotípica y genética de las bacterias las identificaron como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb). Este es el primer reporte de Pcb causando pudrición blanda en cactáceas en el mundo y en México. Del síntoma de necrosis interna de tallo, se aislaron cuatro morfotipos bacterianos, la inoculación en plantas sanas de tetecho reprodujo los síntomas de necrosis y se identificó a *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* como los agentes causales. Los insectos asociados a los síntomas se identificaron como *Lagocheirus lugubris* (Coleoptera: Cerambycidae), *Chalcolepidius* sp. (Coleoptera: elateridae) y *Glyphidops flavifrons* (Diptera: Neriidae). Del intestino de los insectos se detectó *Carnobacterium* y *Curtobacterium*, en larvas de *Lagocheirus*; *Pseudomonas* se detectó en todos los insectos excepto en el adulto de *Chalcolepidius*., *Pcb* se detectó en larvas y adultos de *Lagocheirus* y en el adulto de *Glyphidops*.

Palabras clave: Cactácea, pudrición blanda, Bacterias, brasiliense, PCR. Insectos.

ETIOLOGY OF THE COLLAPSE OF THE TETECHO (*Neobuxbaumia tetetzo* Coultier [Backeberg]) IN ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA.

Dimas Mejía Sánchez. D. in C.

Postgraduate Schools, 2018

ABSTRACT

Tetecho (*Neobuxbaumia tetetzo* (Coultier [Backeberg])) is a columnar cactus endemic to Mexico. In Zapotitlán Salinas, individuals have been observed with yellow areas on stem and necrosis of internal tissue, as well as soft rot that invades the stem and causes collapse of The plant In the rotten tissue and stem galleries different insects are associated The objective of the research was: i) to identify the bacteria that cause these symptoms; ii) identify the associated insects and detect the presence of the causative bacteria in the intestine of these insects. Bacteria were isolated from the tissue with soft rot and inoculated in healthy tetecho plants reproducing the symptoms of rotting. The phenotypic and genetic characterization of the bacteria identified them as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb) This is the first report of Pcb causing soft rot in cacti in the world and in Mexico. From the symptom of internal stem necrosis, four bacterial morphotypes were isolated, inoculation in healthy tetecho plants reproduced the symptoms of necrosis and *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Leuconostoc* and *Carnobacterium* were identified as the causative agents. The insects associated with the symptoms were identified as *Lagocheirus lugubris* (Coleoptera: Cerambycidae), *Chalcolepidius* sp. (Coleoptera: elateridae) and *Glyphidops flavifrons* (Diptera: Neriidae). *Carnobacterium* and *Curtobacterium* were detected in the intestine of the insects in *Lagocheirus* larvae; *Pseudomonas* was detected in all insects except the adult *Chalcolepidius*. Pcb was detected in larvae and adults of *Lagocheirus* and in adult *Glyphidops*.

Key words: Cactacea, soft rot, Bacteria, *brasiliense*, PCR. Insects.

DEDICATORIA

Con admiración y respeto al ser supremo, que aún en la ciencia nos deja pistas para conocerlo.

A mi padre, Francisco Mejía Castillo por su gran enseñanza en la lucha por la vida.

A mi familia. Rosa María Maldonado Martínez, que ama las flores, Josué Mejía Maldonado y Axel Mejía Maldonado por ser parte fundamental de mi vida, y compartir tantos momentos.

A mi mentora de siempre; M.C. Ma. de Lourdes Rodríguez Mejía. Por compartir su conocimiento, amistad y entusiasmo.

AGRADECIMIENTOS

A todos los mexicanos que con su esfuerzo hacen posible el apoyo económico a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al Colegio de Postgraduados por ser una gran institución formadora de recursos humanos en Ciencias Agrícolas.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo, por su acertada dirección, amistad y por compartir esas grandes ideas.

Con admiración y respeto a los Doctores: Rodolfo de la Torre Almaráz, Cristian Nava Díaz, Daniel Teliz Ortíz, Manuel Livera Muñoz y Samuel Ramírez Alarcon, por su acompañamiento, amistad, consejos y su habilidad de transmitir su entusiasmo.

A los pobladores de la región de Zapotitlán Salinas Puebla por su apoyo en la presente investigación, y compartir su cosmovisión de respeto a la naturaleza.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola por su apoyo para realizar estudios de Doctorado.

A todos mis amigos de la Dirección General de Sanidad Vegetal SENASICA-SAGARPA por tantos años y experiencias laborales y de amistad.

A mis profesores y compañeros del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo por su ejemplo, amistad y compromiso con el campo mexicano.

CONTENIDO

PÁGINA

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO I. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i> CAUSA LA PUDRICIÓN BLANDA Y MUERTE DE <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> (Coulter [Backeberg]) EN EL VALLE DE ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA, MÉXICO.	6
1.1. RESUMEN.....	6
1.2. ABSTRACT.....	7
1.3. INTRODUCCIÓN.....	8
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1.4.1. Aislamiento del patógeno.....	9
1.4.2. Patogenicidad.....	10
1.4.3. Identificación y caracterización fenotípica.....	11
1.4.4. Identificación y caracterización molecular.....	11
1.4.4.1. Extracción de ADN.....	11
1.4.4.2. Secuenciación del gen 16S rDNA.....	11
1.4.4.3. Secuenciación del IGS 16S-23S rDNA.....	12
1.4.4.4. Secuenciación del gen <i>rpoS</i>	13
1.5. RESULTADOS.....	14
1.5.1. Aislamiento del patógeno.....	14
1.5.2. Patogenicidad.....	14
1.5.3. Caracterización e identificación fenotípica.....	17
1.5.4. Caracterización e identificación molecular.....	18
1.6. DISCUSIÓN.....	20
1.7. LITERATURA CITADA.....	25
CAPÍTULO II. <i>Carnobacterium</i>, <i>Leuconostoc</i>, <i>Curtobacterium</i> y <i>Pseudomonas</i> AGENTES CAUSALES DE LA NECROSIS INTERNA DEL TALLO DE <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> (Coulter [Backeberg]) EN EL VALLE DE ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA, MÉXICO.	28
2.1. RESUMEN.....	28
2.2. ABSTRACT.....	29
2.3. INTRODUCCIÓN.....	30
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.4.1. Aislamiento del patógeno.....	31

2.4.2. Patogenicidad	31
2.4.3. Identificación y caracterización fenotípica	32
2.4.4. Identificación y caracterización molecular	32
2.4.4.1. Extracción de ADN	32
2.4.4.2. Secuenciación del gen 16S rDNA	32
2.4.4.3. Secuenciación de ISR 16S-23S rDNA, <i>gyrB</i> y <i>rpoB</i>	33
2.5. RESULTADOS	35
2.5.1. Aislamiento del patógeno	35
2.5.2. Patogenicidad	36
2.5.3. Identificación y caracterización fenotípica	37
2.5.4. Identificación y caracterización molecular	38
2.6. DISCUSIÓN	39
2.7. LITERATURA CITADA	44
CAPITULO III. DETECCIÓN DE BACTERIAS EN EL INTESTINO DE INSECTOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN BLANDA DE <i>Neurospora tetetzo</i> (Coulter) Backeberg EN EL VALLE DE ZAPOTITLÁN SALINAS PUEBLA, MÉXICO.....	47
3.1. RESUMEN	47
3.2. ABSTRACT.....	48
3.3. INTRODUCCIÓN	50
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.4.1. Colecta e identificación de insectos	52
3.4.2. Detección molecular específica de bacterias en el intestino de insectos.....	53
3.4.2.1. Desinfestación de insectos.....	53
3.4.2.2. Extracción de ADN	53
3.4.2.3. Amplificación de IGS 16S-23S rDNA de <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i> y el género <i>Carnobacterium</i>	53
3.4.2.4. Amplificación específica del Género <i>Carnobacterium</i>	54
3.4.2.5. Amplificación del gen <i>gyrB</i> de <i>Curtobacterium</i>	54
3.4.2.6. Amplificación del gen <i>rpoB</i> de <i>Pseudomonas</i>	55
3.4.2.7. Amplificación específica con 16S rDNA de <i>Leuconostoc</i>	55
3.5. RESULTADOS	56
3.5.1. Colecta e identificación de insectos	56
3.5.2. Amplificación molecular de bacterias del intestino de insectos	57
3.6. DISCUSIÓN	60
3.7. LITERATURA CITADA	65
CONCLUSIONES GENERALES	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Bosque de tetecho en el valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. En la parte apical se observan los botones florales. 3
- Figura 2. Síntomas de pudrición blanda y exudado de tetecho en campo: (a) Tetecho con pudrición blanda, (b) exudados, (c) Colapso y desintegración de tejido. Síntomas en plantas de tetecho inoculadas bajo condiciones de invernadero: (d) Pudrición blanda y exudados a los 7 ddi, (e) Colapso del tetecho a los 9 ddi, (f) Testigo. 15
- Figura 3. Síntomas de pudrición blanda a los 2 ddi. (a) *Myrtillocactus geometrizans*, (b) *Pachicereus marginatus*, (c) *Gymnocalycium horstii*, (d) *Capsicum annuum* var. *annuum* (e) *Lactuca sativa* y (f) *Solanum lycopersicum*. 17
- Figura 4. Amplificación del producto de 381 pb de la región IGS 16S-23S de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. Carril 1, Marcador molecular de 100 pb (Invitrogen, USA). Carril 1-11, diez cepas seleccionadas. Carril 12, Tejido con pudrición blanda de tetecho. Carril 13, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Carril 14, *Pectobacterium atrosepticum*. Carril 15, *Dickeya chrysanthemi*..... 19
- Figura 5. Dendograma de las secuencias de *rpoS* de los diez aislados de tetecho con otras secuencias de *Pectobacterium* spp., disponibles en el Genbank, usando el método de máxima-verosimilitud con 1000 repeticiones de bootstrap. Los aislados que causan pudrición en tetecho se agrupan con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. 20
- Figura 6. Síntomas externos e internos de tetecho en campo: (a) zonas de tejido amarillas, (b) necrosis interna. Síntomas en plantas inoculadas bajo condiciones de invernadero: (c) zona amarilla de tallo, (d) tejido interno con necrosis, (e) tejido externo de tetecho control y (f) tejido interno de tetecho control. 37
- Figura 7. Amplificación molecular de diferentes géneros bacterianos: A). Marcador molecular 100 pb, B) gen *rpoB* de *Pseudomonas* sp. (1247 pb), C) gen 16s-23s

rDNA L-ISR de *Carnobacterium* sp. (550 pb), D) gen *gyrB* (pb) de *Curtobacterium* sp. (680 pb)..... 39

Figura 8. Insectos frecuentes en la pudrición blanda del tetecho. a) Larva de *Lagocheirus lugubris*. b) Adulto de *Lagocheirus lugubris*. c) Adulto de *Glyphidops flavifrons* y d) Adulto de *Chalcolepidius* sp..... 57

Figura 9. a) amplicónes de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (381 pb). b) *Carnobacterium* sp. (550 pb). c) *Pseudomonas* sp. (1247 pb) y d) *Curtobacterium* sp. (680 pb). Carril 1 y 8. Marcador molecular de 100 pb (Promega). Carril 2. Positivo. Carril 3 y 4. Larva y adulto de *Lagocheirus*. Carril 5 y 6 larva y adulto de *Chalcolepidius* sp. Carril 7. Adulto de *Glyphidops*..... 59

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias detectadas en el intestino de los diferentes estados de los insectos. 60

INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Cactaceae está conformada por 124 géneros con 1438 especies (Hunt, 2006), y en México se distribuyen 60 géneros y 670 especies, de las cuales 77% son endémicas (Guzmán *et al.* 2003). En la Reserva de la Biosfera del Valle de Tehuacán-Cuicatlán se distribuyen 28 géneros con 86 especies de las cuales 21 son endémicas de esta región (Arias *et al.*, 2012). Las cactáceas por su resistencia a sequía constituyen una alternativa para el uso de los suelos de las regiones áridas y semiáridas del país, que conforman aproximadamente el 60% del territorio nacional (De la Rosa y Santana, 1998).

La gran diversidad de cactáceas en México impacta desde el punto de vista ecológico y agrícola, además de ser útiles como alimento, medicina, construcción, forraje y combustible, sobre todo para las poblaciones marginadas de aquellas regiones donde las condiciones climáticas y edáficas son adversas (Ortiz, 1999).

La Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán está ubicada al sureste de Puebla y porciones adyacentes de Oaxaca que ocupa una superficie aproximada de 490,187 ha y en donde se registran alrededor de 2,750 especies de plantas vasculares y representa alrededor del 10% de la flora de México y se estima casi el 1% de la flora del mundo. Además de la gran diversidad florística se registra un alto grado de endemismo, destacando las tetecheras o tetecho (*Neobuxbaumia tetetzo*); los cardonales como el "cardón viejo" (*Pachycereus weberi*), entre otras. La mayor parte de la superficie de la reserva corresponde a tierras Ejidales y Comunales (95%) distribuida en 132 núcleos agrarios. (Villaseñor *et al.*, 1990; Dávila *et al.*, 1991., CONABIO 2011).

En la reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán destaca la región de Zapotitlán Salinas, que se localiza en un municipio en la porción suroccidental del Valle de Tehuacán y cuenta con una superficie aproximada de 86.76 km²; ubicado en los 18° 20' de latitud norte y 97° 28' de latitud oeste. Está delimitado al oriente por las sierras de Atzingo y Miahuatepec, al norte por los cerros Chacateca y Pajarito, al poniente por el cerro La Mesa y al sur por el cerro Corral de Piedra. Desde tiempos prehispánicos, esta región de las salinas se ha utilizado para la obtención de sal, que hasta la fecha aún se observan. El Valle de Zapotitlán Salinas tiene un clima seco o árido y semicálido, con una marcada época de lluvias en verano. La precipitación anual es de 380 mm y su promedio de temperatura es de 21.2 °C (Arias *et al.*, 2010). Las comunidades vegetales se asocian en mezquital o selva baja perennifolia, matorral espinoso, chaparral, selva baja caducifolia, cardonal, izotal y tetechera (Paredes *et al.*, 2007).

El valle de Zapotitlán es una región donde abunda el tetetzo, el cual es un cactus columnar que puede llegar a alcanzar hasta 12 m. de altura. De joven es de color verde vivo que se va oscureciendo con la edad. Tiene entre 30 y 50 costillas. Las espinas no son muy abundantes, no sobrepasan los 1.5 cm de largo, excepto en la parte alta del tallo que produce las flores y pueden llegar a medir hasta 7 cm. y estar acompañadas de pelos amarillentos (Figura 1). La floración aparece en la parte apical del tronco desde junio hasta el verano. Las flores son de color rojo en forma de embudo y con los estambres amarillos, aunque también las hay blancas o rosas. Requiere pleno sol, pero también prospera bien en semi-sombra, es endémica de México y se distribuye en Puebla y Oaxaca (Arias *et al.*, 2010).

El nombre común es Cardón, Higos de Teteche, Teteche, o Tetetzo y sus sinónimos son *Pilocereus tetezo*, *Cereus tetezo*, *Pachycereus tetezo*, *Cephalocereus tetetzo*, *Carnegiea tetetzo* (cactiguide.com, 2012).



Figura 1. Bosque de tetecho en el valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. En la parte apical se observan los botones florales.

Uno de los factores que amenazan al tetecho es una enfermedad que ocasiona pudrición blanda de la planta. Cibrián (CONABIO, 2011) asoció estos daños a la infestación de insectos barrenadores y en cuyas lesiones se encuentran bacterias que aceleran la muerte del tetecho; sin embargo, no existen reportes documentados y descriptivos de los insectos y las posibles bacterias patógenas que causan la muerte de esta cactácea. Las plantas de tetecho enfermas muestran áreas de tejido de color amarillento en el tallo y pudrición suave, ruptura de corteza y escurrimiento de exudado. La pudrición invade toda la planta y provoca la desintegración del tejido; Así mismo, las plantas jóvenes pueden mostrar también amarillamiento, pudrición blanda y muerte.

Ala fecha, no existen reportes publicados que describan esta enfermedad. Investigaciones previas a nivel mundial en otras cactáceas, han citado una pudrición en *Echiinocereus* spp. causado por *Helminthosporium* spp. el síntoma descrito es un obscurecimiento y con el tiempo ocurre el ablandamiento de tejido. Sin embargo, el síntoma difiere de la descrita para el tetezo y no es tan destructiva, ni presenta el abundante exudado observados en esta especie. En *Echinocactus grusonii*, se ha reportado al oomyceto *Pythium* spp. causando una pudrición interna, principalmente a nivel del cuello de este cactus; en el cactus *sahuaro*, se ha reportado a *Erwinia cacticida* (*Pectobacterium*), causando una enfermedad denominada “necrosis bacteriana del *sahuaro*”, la cual inicia con manchas pequeñas, acuosas, que con el tiempo el tejido puede exudar y tornarse café y finalmente se observa desprendimiento del tejido dejando expuesto el esqueleto del cactus (Jack y Olsen, 2011).

Por las características del síntoma de pudrición blanda del tetecho se le ha asociado a bacterias fitopatógenas, asociados a este síntoma se han observado insectos del orden coleóptera y lepidóptera. Por anterior en la presente investigación se planteó como objetivos: identificar el (los) patógenos responsables de la enfermedad, rango de hospedantes y su posible asociación con insectos.

LITERATURA CITADA

- Arias-Toledo A. A., Valverde Valdés M. T., Reyes Santiago J. 2000. Las Plantas de la Región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología/Red para el Desarrollo Sostenible, A.C./ Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.
- Cactiguide.com.<http://cactiguide.com/cactus/?genus=Neobuxbaumia&species=tetezo>. Consulta 20/05/2014.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2011. La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado. México.
- Dávila Aranda, P.D. 1983. Flora genérica del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- De la Rosa H., J. P. y D. Santana A. 1998. El nopal: usos, manejo agronómico y costo de producción en México. UACH. Chapingo, México. p. 23-97.
- Jack K y Mary W. Olsen. (2011). Problems and Pests of Agave, Aloe, Cactus and Yucca. The University of Arizona Cooperative Extension. pp. 9.
- Ortiz Hernández, Y. D. 1999. Pitahaya un nuevo cultivo para México. LIMUSA. México, D.F. pp. 19-43.
- Paredes Flores M., Lira Saade R, Dávila Aranda P.D. 2007: Estudio etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. Acta Bot. Mex. 79:13-61.
- Villaseñor, J. L., P. Dávila, F. Chiang. 1990. Fitogeografía del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México 50:135-149.

CAPÍTULO I. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* CAUSA LA PUDRICIÓN BLANDA Y MUERTE DE *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter [Backeberg]) EN EL VALLE DE ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA, MÉXICO.

1.1. RESUMEN

Neobuxbaumia tetetzo (Coulter [Backeberg]) (tetecho) es una cactácea columnar endémica de México. Las plantas, frutos, flores y semillas de tetecho cumplen un importante papel dentro del ecosistema semiárido, ya que sirven de refugio y alimento de insectos, murciélagos, aves y es de amplio uso por diferentes etnias desde tiempos prehispánicos. Esta cactácea es afectada por una pudrición blanda, que eventualmente puede dañar a toda la planta y provocar su caída y desintegración. 80 cepas bacterianas de morfología similar fueron aisladas de la pudrición y de los exudados y se inocularon en plantas sanas de tetecho, reproduciendo los síntomas típicos de pudrición blanda a los 9 días después de la inoculación. Se seleccionaron diez cepas para su caracterización e identificación fenotípica y genética con los genes 16s rDNA, IGS 16S-23S rDNA y *rpoS*, así como la patogenicidad en miembros de la familia cactácea y otras plantas. Basado en los resultados, estos aislados bacterianos fueron identificados como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcb). La inoculación de esta bacteria causó pudrición blanda en diferentes cactus, frutos, hojas y raíces de otras plantas. Este es el primer reporte de la subespecie *brasiliense* de *Pectobacterium carotovorum* causando pudrición blanda y muerte en cactáceas en el mundo y primer reporte de esta subespecie en México.

Palabras clave: Muerte de cactáceas, columnar, bacteria, PCR, IGS, *rpoS*.

1.2. ABSTRACT

Neobuxbaumia tetetzo (Coultier [Backeberg]) (tetecho) is a columnar cactus endemic to Mexico. Tetecho plants, flowers, fruits and seeds play an important role in the semi-arid ecosystem, as they serve as a refuge and food for insects, bats, birds, and are widely used by ethnic groups since pre-Hispanic times. Tetecho is affected by a soft rot that damages the whole plant and causes its fall and disintegration. Eighty bacterial colonies of similar morphology were isolated from plants showing soft rot and inoculated in healthy tetecho plants, reproducing typical symptoms of soft rot 9 days after inoculation. Ten representative isolates were selected for phenotypic and genetic identification using 16s rDNA, IGS 16S-23S rDNA and *rpoS* genes and for pathogenicity tests on several members of the cactus family and other plants. Based on the results, these bacterial isolates were identified as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. Inoculation of this bacteria caused soft rot in different cacti, fruits, leaves and roots of other plants. This is the first report of the subspecies *brasiliense* of *Pectobacterium carotovorum* causing soft rot and death in cacti in the world and the first report of this subspecies in Mexico.

Additional Keyword: Cactáceas dehat, columnar, bacteria, PCR, IGS, rpoS.

1.3. INTRODUCCIÓN

México es el país con la mayor riqueza de Cactáceas con 913 taxones descritos, de las cuales 80% son endémicas del país (Jiménez, 2011). La Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán es una región semiárida con la mayor diversidad de especies endémicas de animales, plantas y microorganismos. Dentro de estas, un grupo importante son las cactáceas columnares (Jiménez, 2011) donde destaca *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter [Backeberg]) (Arias *et al.*, 2013) y el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla (18°20'N, 97°28'W) es la región de mayor abundancia de esta cactácea, que se distribuye hasta la cañada de Cuicatlán, Oaxaca (Arias *et al.*, 2010).

El tetecho ocupa extensiones hasta de 400 Km² y se han reportado densidades de población de 1200-1800 plantas por hectárea (Ramírez y Valverde, 2005). La vida media del tetecho oscila de 110 a 120 años; además, esta cactácea desempeña un papel ecológico fundamental dentro del ecosistema ya que de abril a junio tiene su etapa reproductiva y de la parte apical emergen flores que producen una gran cantidad de néctar y polen del cual se alimentan aves, insectos y murciélagos que polinizan y dispersan la semilla en toda la zona (Godínez, 2001). Así mismo, es muy importante para la población humana de esta región, ya que aprovechan los botones florales, frutos y semillas como alimento, con el que se preparan aproximadamente 50 platillos que se presentan anualmente se realiza la feria de la tetecha. Al morir las plantas dejan una parte leñosa que se utiliza como combustible y madera para construir cabañas rústicas (Godínez, 2001).

Uno de los factores que amenazan al tetecho es una enfermedad que ocasiona pudrición blanda de la planta. Cibrián (CONABIO, 2011) asoció estos daños a la infestación de insectos barrenadores y en cuyas lesiones se encuentran bacterias que aceleran la muerte del tetecho; sin

embargo, no existen reportes documentados y descriptivos de los insectos y las posibles bacterias patógenas que causan la muerte de esta cactácea.

En recorridos por el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, se observó que las plantas de tetecho muestran áreas de tejido de color amarillento y pudrición suave, ruptura de corteza y escurrimiento de exudado. La pudrición invade toda la planta y provoca la desintegración de los tejidos; Así mismo, las plantas jóvenes pueden presentar también amarillamiento, pudrición blanda y muerte.

Estudios fitopatológicos preliminares concluyeron que las plantas con daños de pudrición blanda, eran causados probablemente por bacterias asociadas a insectos. Considerando que se desconoce la identidad del o los posibles agentes causales de la pudrición blanda, el objetivo de la presente investigación fue identificar el o los patógenos bacterianos causantes de la pudrición blanda del tetecho.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1. Aislamiento del patógeno

De 2015 a 2017 en la región de Zapotitlán Salinas, Puebla, México se colectaron muestras de 80 plantas de tetecho con síntomas de pudrición blanda. Porciones de tejido (0.5 cm^2) de la zona de transición entre tejido con pudrición y tejido sano se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1% (v/v) por un min y se lavaron con agua destilada estéril, el tejido desinfestado se sembró en los medios de cultivo caldo nutritivo (CN) y Casaaminoácidos, peptona y glucosa (CPG), así como en solución amortiguadora (Tris-EDTA). Se tomaron muestras de exudados de las plantas en tubos con 5 mL de agua estéril y se sembraron 20 μL en medio de cultivo CN; en ambos casos se incubaron a 18 $^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Posteriormente, se sembraron 20 μL de cada cultivo en los

medios B de King (BK), R2A y Agar Nutritivo (AN) que se distribuyó por extensión con una asa Digrafsky y se incubaron con las mismas condiciones experimentales descritos anteriormente. Se obtuvieron 80 aislados bacterianos con morfología similar a partir del tejido con pudrición y exudados. Las colonias bacterianas se preservaron en cultivo puro en CPG a -20°C (Schaad *et al.*, 2001).

1.4.2. Patogenicidad

Los 80 aislados bacterianos se inocularon de manera individual en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Fiana y plantas de tetecho. Los tubérculos de papa se desinfestaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min y se lavaron con agua destilada estéril; después, se cortaron asépticamente rodajas de 5 mm de grosor y se colocaron en una caja Petri con papel filtro y agua previamente esterilizados. Las rodajas fueron inoculadas con una suspensión bacteriana de 1.5×10^6 UFC/mL e incubadas a 28°C durante 72 horas. Como testigo se inocularon rodajas de papa con agua estéril. Ciento sesenta plantas de tetecho de cinco años de edad se inocularon por inyección en la mitad de cada planta con 20 μL de una suspensión bacteriana con 1.5×10^6 UFC/mL (Stommel *et al.*, 1996). La zona de inoculación se desinfestó con etanol al 70% (v/v) y se lavó con agua estéril previo a la inoculación. Las plantas se mantuvieron en invernadero ($25-30^{\circ}\text{C}$; HR 80% con luz natural, durante 10 días). Treinta plantas inoculadas con agua estéril se emplearon como testigo. Todos los aislamientos (n=80) causaron pudrición blanda en tubérculos de papa y plantas de tetecho. Se seleccionaron al azar diez aislados bacterianos (Tet5, Tet16, Tet24, Tet36, Tet52, Tet60, Tet61, Tet72, Tet75 y Tet77) y se inocularon en miembros de la familia cactáceae *Myrtillocactus geometrizans*, *Mammillaria magnimamma*, *Mammillaria discolor*, *Gymnocalycium horstii*, *Pachocereus marginatus* y *Opuntia Rufida* bajo las mismas condiciones experimentales de invernadero descritas

anteriormente. Adicionalmente, se inocularon frutos de *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum* var. *annuum*, *Physalis ixocarpa*, *Cucumis sativus*, *Ipomoea batatas*, *Cucurbita pepo*, *Brassica oleracea* var. *capitata* y *Daucus carota* subespecie *sativus*. Los frutos o raíces se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y se lavaron con agua estéril. Todos los órganos se inocularon con una suspensión con 1.5×10^6 UFC/mL y se mantuvieron en cámara húmeda a 28°C durante 4 días.

1.4.3. Identificación y caracterización fenotípica

Diez aislados bacterianos fueron seleccionados y se caracterizaron e identificaron de acuerdo a la guía para la identificación de bacterias fitopatógenas (Schaad *et al.*, 2001) y la comparación de bacterias pectinolíticas (Czajkowski *et al.*, 2014). Adicionalmente, se evaluó la sensibilidad a 12 antibióticos mediante discos comerciales (Bio-Rad, CA. EUA) y se caracterizó el perfil bioquímico mediante el sistema API20 E™ (Biomérieux, USA).

1.4.4. Identificación y caracterización molecular

1.4.4.1. Extracción de ADN

El ADN de los diez aislamientos bacterianos seleccionados se obtuvo a partir de colonias de un cultivo puro con 24 h de crecimiento en medio CPG con el producto comercial PureLink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.4.4.2. Secuenciación del gen 16S rDNA

Los iniciadores universales 8F (5`AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3`) y 1492R (5`GGTTACCTTGTTACGACTT-3`) fueron utilizados para amplificar la secuencia del gen 16S rDNA de los diez aislados. Los iniciadores empleados corresponden a las posiciones 8-27 y 1507-1492 respectivamente del 16S RNA ribosomal (Eden *et al.*, 1991). La reacción en cadena

de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L, con 1 x PCR Buffer, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, 0.6 μ M de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 50 seg, apareamiento a la temperatura de 57°C, durante 30 seg, con extensión a 72°C durante 90 seg. La extensión final se llevó a cabo a 72°C, durante 5 min (Eden *et al.*, 1991). Se analizó una alícuota de 5 μ L por electroforesis en gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5% (w/v) en Buffer TBE. El gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador (DNR minibis-pro). El producto amplificado se purificó a partir del gel utilizando el kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenció de forma directa en un Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp., CA, USA).

1.4.4.3. Secuenciación del IGS 16S-23S rDNA

La región espaciadora intergénica (IGS) 16S-23S rDNA de los diez aislados fue amplificada usando los iniciadores específicos para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* BR1f (5'-GCGTGCCGGGTTTATGACCT-3') y L1r (5'-CAAGGCATCCACCGT-3'). BR1f fue generado de la región IGS en base al corte de la enzima de restricción SEXA1 y L1r de la dirección 5' del gen 23s rRNA (Duarte *et al.*, 2004). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L con 1x PCR buffer, 2 mM de $MgCl_2$, 0.1 mM de cada dNTP, 0.3 μ M de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR consideró una desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 62°C por 45 seg, 72°C por 90 min y una extensión final de 72°C por 7 min (Choi y Kim, 2013). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 2%. El

producto amplificado se purificó a partir del gel con el kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) y se secuenció de forma directa en un Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp., CA, USA). Para ambos genes, las secuencias fueron analizadas y comparadas con secuencias similares disponibles en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (GenBank-EMBL) (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias fueron incorporadas al GenBank para obtener su número de acceso. Por otra parte, con los iniciadores Br1f y L1r, se realizó la amplificación directa a partir de tejido de tetecho con síntomas de pudrición blanda colectada en Zapotitlán Salinas, así como de las bacterias *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* y *Dickeya chrysanthemi* de la colección del laboratorio de Bacteriología del Colegio de Postgraduados para propósitos de comparación.

1.4.4.4. Secuenciación del gen *rpoS*

La identidad de los diez aislados se confirmó mediante la secuenciación directa de la subunidad σ de la RNA polimerasa factor 38 (*rpoS*), con los iniciadores *rpoS1* (ATGAGCCAAAGTACGCTGAA) y *rpoS2* (ACCTGAATCTGACGAACACG) (Waleron *et al.*, 2002). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L con 1x PCR buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 μ M de cada oligonucleótido, 2 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR consideró una desnaturalización inicial de 95⁰C por 3 min, seguido de 32 ciclos a 94⁰C por 1 min, 55⁰C por 50 seg, 72⁰C por 2 min y una extensión final de 72⁰C por 6 min (Waleron *et al.*, 2002). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 2%. El producto amplificado se purificó a partir del gel con el kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenció de forma directa en un Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp., CA, USA).

Las secuencias se analizaron y compararon con secuencias similares disponibles en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (GenBank-EMBL) (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias se incorporaron al GenBank para obtener su número de acceso

Con las secuencias del gen *rpoS* de diez aislados bacterianos (Tet5, Tet16, Tet24, Tet36, Tet52, Tet60, Tet61, Tet72, Tet75 y Tet77) se construyó un dendograma al compararlas con secuencias homólogas de la colección del Genbank. El análisis se realizó utilizando el método de máxima-verosimilitud mediante el modelo Neighbor-joining utilizando el programa MEGA v 6 (Koichiro *et al.*, 2013). El análisis se realizó con replicados con 1000 repeticiones en un muestreo aleatorio con remplazo (bootstrap=1000) (Tamura *et al.*, 2004).

1.5. RESULTADOS

1.5.1. Aislamiento del patógeno

A partir de muestras de tejido de tetechos con síntomas de pudrición blanda y exudados, se obtuvieron 80 aislados bacterianos con morfología similar (Tet1- Tet80). Las bacterias crecieron en todos los medios de cultivo utilizados (AN, CPG y BK). Todos los aislamientos mostraron actividad pectinolítica en rodajas de tubérculo de papa y causaron pudrición blanda en plantas de tetecho.

1.5.2. Patogenicidad

Los síntomas de pudrición blanda observados en campo en plantas de tetecho (Figura 2a, 2b y 2c) se reprodujeron en plantas de tetecho con la inoculación individual de los diez aislados bacterianos seleccionados bajo condiciones experimentales en invernadero (Figura 2d, 2e). Las plantas inoculadas mostraron la pudrición blanda típica con exudados a los 2 días después de la inoculación (ddi). A los 7 ddi ocurrió una pudrición total de la planta y a los 9 ddi la pudrición se

secó y el tejido se oscureció. No se observaron síntomas en las plantas control (Figura 2f) y las bacterias se re-aislaron a partir de las plantas con pudrición y se identificaron por PCR.

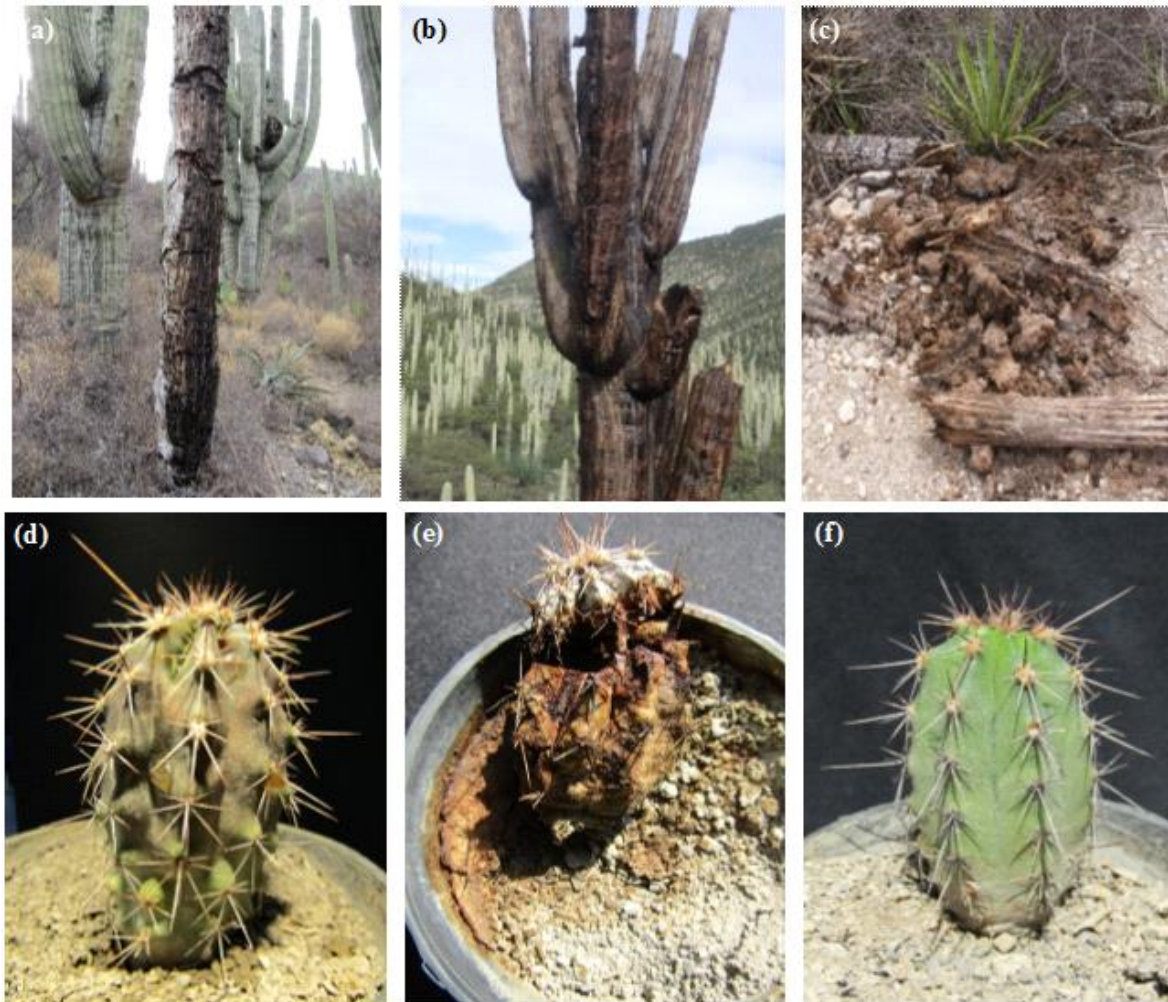


Figura 2. Síntomas de pudrición blanda y exudado de tetecho en campo: (a) Tetecho con pudrición blanda, (b) exudados, (c) Colapso y desintegración de tejido. Síntomas en plantas de tetecho inoculadas bajo condiciones de invernadero: (d) Pudrición blanda y exudados a los 7 ddi, (e) Colapso del tetecho a los 9 ddi, (f) Testigo.

La inoculación individual de las diez bacterias causaron pudrición blanda en las cactáceas *Myrtillocactus geometrizans* (Figura 3a), *Opuntia rufida*, *Pachocereus marginatus* (Figura 3b), *Mammillaria magnimamma*, *Mammillaria discolor* y *Gymnocalycium horstii* (Figura 3c); así como en *Capsicum annuum* var. *annuum* (Figura 3d), *Lactuca sativa* (Figura 3e), *Solanum*

lycopersicum (Figura 3f), *Cucumis sativus*, *Daucus carota* subespecie *sativus* e *Ipomoea batatas*.

La pudrición blanda en estas especies ocurrió a los 2 ddi y se observó la destrucción total de tejido en algunos de ellos a los 4 ddi. De todas las cactáceas y plantas se reaislaron el 100% de las bacterias inoculadas. En *Cucurbita pepo*, *Physalis ixocarpa* y *Brassica oleracea* var. *capitata* no se observaron síntomas de pudrición.

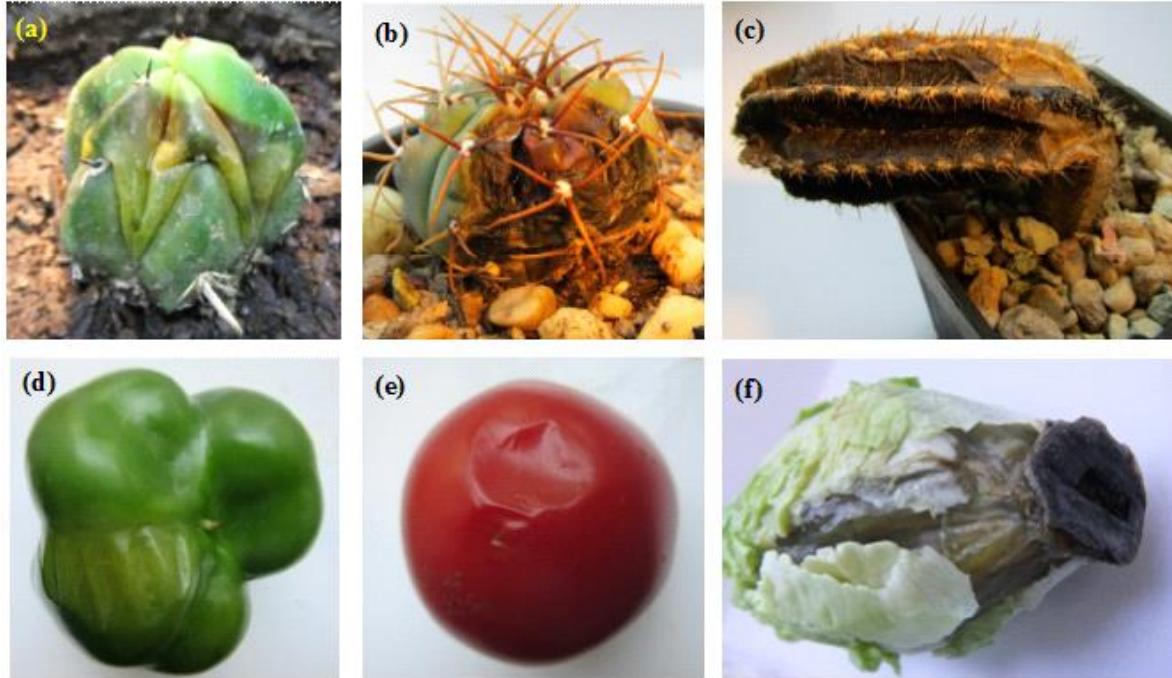


Figura 3. Síntomas de pudrición blanda a los 2 ddi. (a) *Myrtillocactus geometrizans*, (b) *Pachocereus marginatus*, (c) *Gymnocalycium horstii*, (d) *Capsicum annuum* var. *annuum* (e) *Lactuca sativa* y (f) *Solanum lycopersicum*.

1.5.3. Caracterización e identificación fenotípica

Las diez cepas bacterianas formaron colonias circulares de color gris, convexas y apariencia húmeda, las células mostraron forma bacilar, móviles, Gram negativas. Son anaeróbicas facultativas, no fluorescen en medio BK, crecen a 37⁰ C en los medios de cultivo CN y CPG, no producen sustancias reductoras de sacarosa, no producen indol, producen ácido a partir de lactosa, maltosa, α -metilglucósido, trehalosa, pero no de sorbitol. Estas características coinciden con lo reportado para la bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb) (Schaad *et al.*, 2001; Czajkowski *et al.*, 2014). Además, toleran 7% de NaCl en CN y CPG y fueron sensibles a los antibióticos amicasina, ampicilina, cefaletina, cefinaxona, cloranfenicol, enonaxina, gentamicina, notilmicina, y trimetoprim-sulfatometoxazol, pero no a penicilina, eritromicina y dicloxacilina.

1.5.4. Caracterización e identificación molecular

Las secuencias del gen 16S rDNA de las diez cepas (número de acceso MF403054) indicaron un 99% de similitud con secuencias reportadas en el Genbank para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. La amplificación por PCR de los diez aislados de tetecho, así como del ADN extraído de las plantas con síntomas de pudrición usando los iniciadores específicos BR1f y L1r (Duarte *et al.*, 2004), generaron el producto de 381 pb en gel de agarosa, reportado para la bacteria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Choi y Kim, 2013) y no generó ningún fragmento de amplificación para las bacterias *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* y *Dickeya chrysanthemi* utilizadas como fuente de comparación (Figura 4).



Figura 4. Amplificación del producto de 381 pb de la región IGS 16S-23S de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. Carril 1, Marcador molecular de 100 pb (Invitrogen, USA). Carril 1-11, diez cepas seleccionadas. Carril 12, Tejido con pudrición blanda de tetecho. Carril 13, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Carril 14, *Pectobacterium atrosepticum*. Carril 15, *Dickeya chrysanthemi*.

Las secuencias de la región IGS 16s-23S rDNA y de la subunidad σ de la RNA polimerasa factor 38 (*rpoS*) con las diez cepas bacterianas seleccionadas mostraron 99% y 100% de similitud respectivamente con secuencias reportadas en el Genbank para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. El dendograma de las secuencias del gen *rpoS* de los diez aislados mediante el método de máxima-verosimilitud mostró que se agrupan con secuencias *rpoS* reportadas en el Genbank para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Figura 5)

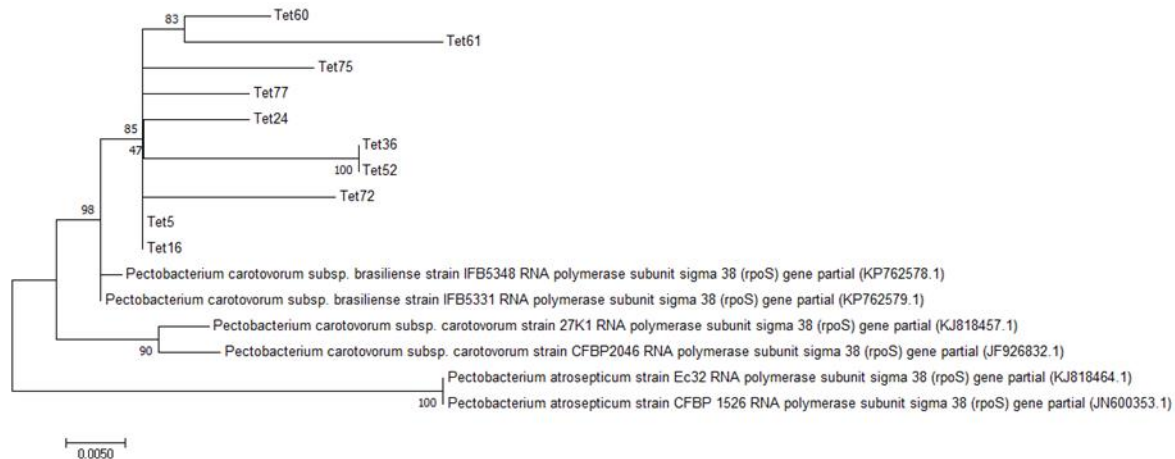


Figura 5. Dendrograma de las secuencias de *rpoS* de los diez aislados de tetecho con otras secuencias de *Pectobacterium* spp., disponibles en el Genbank, usando el método de máxima-verosimilitud con 1000 repeticiones de bootstrap. Los aislados que causan pudrición en tetecho se agrupan con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*.

Por lo anterior, con base en la caracterización fisiológica, bioquímica, genética y pruebas de patogenicidad, los aislados que ocasionan pudrición en tetecho se identificaron como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*.

1.6. DISCUSIÓN

En este estudio, se identificó a *Pectobacterium carotovorum* subsp *brasiliense* (Pcb) como el agente causal de la pudrición blanda del tetecho en Zapotitlán Salinas, Puebla, México. Pcb fue descrita por primera vez en Brasil causando la enfermedad “pierna negra” en papa (*Solanum tuberosum* L.) (Duarte *et al.*, 2004). En los últimos años Pcb también se ha reportado como una enfermedad emergente causando “pierna negra” en papa en Nueva Zelanda (Panda *et al.*, 2012), Canadá (De Boer *et al.*, 2012), en diversas zonas de Sudáfrica (Van der Merwe *et al.*, 2010) y Holanda (Nunes *et al.*, 2014). Sin embargo, el rango de hospedantes de este patógeno se ha extendido y cepas identificadas como Pcb se han citado causando pudrición blanda en otros cultivos como pepino (*Cucumis sativus* L.) (Onkendi *et al.*, 2016;), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Jaramillo *et al.*, 2017), remolacha (*Beta vulgaris* L.), col (*Brassica oleracea*

var. *capitata*), calabacín (*Cucurbita pepo* L.) (Waleron *et al.*, 2015) y pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*) (Gillis *et al.*, 2017).

Pcb se ha descrito como una subespecie diferente de *P. carotovorum* por sus características fenotípicas, genéticas y mayor virulencia y agresividad que *P. carotovorum* y otras bacterias pectinolíticas relacionadas como *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae* y *Dickeya spp.* (Duarte *et al.*, 2004; Van der Wolf *et al.*, 2017). La patogenicidad de Pcb se basa en su habilidad de producir en mayor rango las enzimas pectato liasa, poligalacturonasa, celulasas y proteasas como factores de virulencia que degradan los componentes estructurales de la pared celular de la planta hospedante (Toth y Birch, 2005; Dong *et al.*, 2014)

En esta investigación, los resultados de la caracterización fisiológica y bioquímica coinciden con las referidas para discriminar estos aislados de las *Enterobacteriaceae* pectinolíticas más comunes y las identifica como Pcb (Schaad *et al.*, 2001, Czajkowski *et al.*, 2014). Además, se documenta la sensibilidad *in vitro* de Pcb a otros antibióticos y su capacidad de tolerar 7% de NaCl en medio CN y CPG. Para validar aún más esta identificación, la caracterización genética con la amplificación y secuenciación de los genes 16s rDNA, IGS 16S-23S rDNA y la subunidad σ de la RNA polimerasa factor 38 (*rpoS*), identificó claramente la subespecie *brasiliense* de *Pectobacterium carotovorum* como el agente causal de la pudrición en tetecho. El análisis de la región intergénica 16S-23S y el gen conservado *rpoS* han permitido en otras investigaciones la identificación específica de Pcb entre otras bacterias pectinolíticas relacionadas (Duarte *et al.*, 2004; Waleron *et al.*, 2002). El dendograma de las secuencias del gen *rpoS* de las diez cepas (Tet5, Tet16, Tet24, Tet36, Tet52, Tet60, Tet61, Tet72, Tet75 y Tet77) mostró que se agrupan con secuencias *rpoS* reportadas en el Genbank para *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*.

En este estudio, se destaca que la inoculación experimental de Pcb aislados de tetecho en *Cucurbita pepo* y *Brassica oleracea* var. *capitata*, no produjeron pudrición blanda; este resultado es inconsistente con reportes previos de otros aislados de la subsp. *brasiliense* causando pudrición en estas especies de plantas en condiciones de cultivo (Waleron *et al.*, 2015). Resultados similares fueron obtenidos por Alcorn *et al.* (1991) quienes observaron que entre 108 bacterias pectinolíticas aisladas de cactus de diferente origen geográfico mostraron diferencias en la capacidad de producir pudrición blanda dentro de un mismo grupo genético al ser inoculadas en frutos de tomate, papa y zanahoria (*Daucus carota* L.).

Miembros del género *Pectobacterium* fitopatógenos agrupan cepas heterogéneas con diversidad genética. Esta diversidad también se ha documentado en otras investigaciones con Pcb mediante el análisis filogenético de ocho genes conservados que demuestran la existencia de variabilidad genética entre diversos aislados de la subespecie *brasiliense* que conforman dos importantes subgrupos por su origen geográfico (Nabhan *et al.*, 2012a; Dong *et al.*, 2014), como patógeno en otros cultivos y que han mostrado diferencias en el rango de hospedantes en ensayos de patogenicidad (Marquez *et al.*, 2011). Lo anterior podría explicar que los aislados causantes de la pudrición en tetecho muestren cierto grado de variabilidad patogénica con otras cepas de Pcb con la inoculación en otras plantas.

Son pocas las investigaciones que hayan abordado el estudio de pudriciones blandas causado por bacterias en cactáceas columnares en el mundo. Alcorn *et al.* (1991) estudiaron una colección de cepas pectinolíticas causantes de un síntoma similar de pudrición blanda del cactus columnar saguaro (*Carnegiea gigantea*), en Arizona y Texas, USA, y norte de México. Mediante un estudio taxonómico numérico y perfiles de ácidos grasos de estas cepas, identificaron a *Pectobacterium* (Erwinia) *cacticida* como un grupo diferente del resto de las bacterias

pectinolíticas más comunes como *P. atrosepticum* y *P. carotovorum*. Así mismo, Martínez *et al.* (2011) identificaron al género *Pectobacterium* mediante la secuenciación del ADN total extraído de la necrosis de tejido de la cactácea columnar *Isolatocereus dumortieri* y del intestino de las larvas del díptero *Copestylum* (Diptera, Syrphidae); en este estudio, sugirieron que las bacterias y levaduras colonizan los cactus dañados con estrés ambiental o senescencia y que estas bacterias causan lisis de las células vegetales, exponiendo el contenido celular y creando un microambiente que atrae otros insectos.

Muchas *Pectobacterium* spp. pueden establecer una íntima interacción con insectos (Basset *et al.*, 2000; Muniz *et al.*, 2007). Particularmente en cactáceas, se ha demostrado que el tejido necrótico del cactus *Stenocereus gummosus* sirve como fuente de alimento y substrato de reproducción de la mosca endémica en el desierto de Sonora *Drosophila mojavensis*. Estudios posteriores, demostraron que en este sistema cuatro especies endémicas de *Drosophila* se alimentaron y reprodujeron en tejido necrótico de cinco especies de cactus columnares, destacando la alta frecuencia de colonización microbiana de bacterias anaeróbicas facultativas dentro de la familia Enterobacteriaceae en el tejido necrótico (Fogleman y Foster, 1989; Fogleman y Danielson, 2001).

En el patosistema del tetecho en donde se involucra a Pcb, es evidente que existen al menos tres especies de insectos nativos asociados estrechamente con el tetecho en esta zona protegida. En estudios preliminares se ha sugerido que la presencia de estos insectos podrían formar parte de este patosistema al introducir y dispersar la bacteria (Cibrían, 2011); sin embargo, hasta ahora no existen investigaciones que aporten evidencia sobre el papel de estos insectos como potencialesportadores o diseminadores. Investigaciones futuras deberán profundizar en el estudio de este patosistema y la influencia de las interacciones de factores bióticos y abióticos en el

desarrollo de la pudrición blanda en esta cactácea, incluyendo la posible interacción de Pcb con los insectos nativos en la zona y la especificidad al tetecho. Estas investigaciones aportarían información relevante que contribuirían al diseño de futuras estrategias de manejo que permita conservar este recurso natural endémico en México.

Hasta el momento no se ha reportado a Pcb como patógeno de cactáceas en el mundo y no existen reportes de esta variante patogénica en México en ninguna otra especie de planta, por lo que se desconoce su virulencia, distribución geográfica y rango de hospedantes potenciales, lo cual puede representar un riesgo para otras especies de plantas cultivadas.

1.7. LITERATURA CITADA

- Alcorn S.M., T.V. Orum, A.G. Steigerwalt, J.L.M. Foster, J.C. Fogleman, D.J. Brenner. 1991. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. nov. *IJSB* 41: 197–212.
- Altschul S., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. LiPuma. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Bio.* 115: 403–410.
- Arias S., T. Valverde, A. Zavala-Hurtado, C. Hernández. 2013. *Neobuxbaumia tetetzo*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T152584A654087.
- Basset A., R.S. Khush, A. Braun, L. Gardan, F. Bocard, J.A. Hoffmann, B. Lemaitre. 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *PANAS. U.S.A.* 97: 3376-3381.
- Choi O. y J. Kim. 2013. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on paprika in Korea. *J. Phytopathol.* 161:125-127.
- Cibrián T.D. 2011. Insectos y patógenos que afectan las áreas arboladas de Puebla. P. 291. En. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2011. La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 440 p.
- Czajkowski R., M.C.M. Pérombelon, S. Jafra, E. Lojkowska, M. Potrykus, J.M. van der Wolf, W. Sledz. 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Ann Appl Biol.* 166: 18–38.
- De Boer SH., X. Li, L.J. Ward. 2012. *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. *Phytopathol.* 102: 937–47.
- Dong Hwan L., K. Jin-Beom, K., A.L. Jeong, H. Sang-Wook, H. Sunggi. 2014. Genetic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* isolated in Korea. *The Plant Pathol J.* 30: 114-124.
- Duarte V., S.H. De Boer, L.J. Ward, A.M.R. De Oliveira. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *J Appl Microbiol.* 96: 535–545.
- Eden P.A., T.M. Schmidt, R.P. Blakemore, N.R. Pace. 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *IJ SB.* 41: 324–325.

- Fogleman C.J. y B.P. Danielson. 2001. Chemical interaction in the cactus-microorganisms-*Drosophila* model system of the Sonoran desert. *Amer Zool.* 41: 877-889.
- Fogleman C.J. y M.L.J. Foster. 1989. Microbial colonization of injured cactus tissue (*Stenocereus gummosus*) and its relationship to the ecology of cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Appl Environ Microbiol* 55: 100-105.
- Godínez Álvarez H.O. 2001. El tetecho: historia natural de una cactácea columnar del centro de México. *Ciencia* 52: 52-57.
- Jaramillo C., A. Huertas, E.D. Gómez. 2017. First report of bacterial stem rot of tomatoes caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Colombia. *Plant Dis.* 101:830.
- Jiménez Sierra C.L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria* [en línea]. Vol. 12, No.1.
- Koichiro T., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. and Evo.* 30: 2725-2729.
- Márquez Villavicencio M.D.P., R.L. Groves, A.O. Charkowski. 2011. Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium* taxa. *Plant Dis.* 95: 232-241.
- Martínez Falcón A.P., A. Durbán, A. Latorre, J. Antón, M. Marcos-García. 2011. Bacteria associated with *Copestylum* (Diptera, Syrphidae) larvae and their cactus host *Isolatocereus dumortieri*. *PLoS ONE* 6(11): e27443.
- Muniz C.A., D. Jaillard, B. Lemaitre, F. Bocard. 2007. *Erwinia carotovora* Evf antagonizes the elimination of bacteria in the gut of *Drosophila* larvae. *Cell. Microbiol.* 9: 106-119.
- Nabhan S., K. Wydra, M. Linde, T. Debener. 2012b. The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant Pathol.* 61: 498-508.
- Nabhan S., S.H. De Boer, E. Maiss, K. Wydra. 2012a. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *J. Appl. Microbiol.* 113: 904-913.
- Nunes Leite L., E.G. de Haan, M. Krijger, M.P. Kastelein, P.S. van der Zouwen, G.W. van den Bovenkamp, N.D. Tebaldi, J.M. van der Wolf. 2014. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. *New Dis. Rep.* 29: 24.

- Onkendi EM., A.M. Ramesh, S. Kwenda, S. Naidoo, L. Moleleki. 2016. Draft genome sequence of a virulent *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* isolate causing soft rot of cucumber. *Genome Announc.* 4(1):e01530-15.
- Panda P., M.A.W.J. Fiers, K. Armstrong, A.R. Pitman. 2012. First report of blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in New Zealand. *New Dis. Rep.* 26:15.
- Schaad N.W., J.B. Jones, W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edn. St Paul, MN, APS Press, pp 373.
- Tamura K., M. Nei, S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PANAS. USA.* 101: 11030-11035.
- Toth I. K. and P.R.J. Birch. 2005. Rotting softly and stealthily. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 424-429.
- Toth I.K. and P.R. Birch. 2005. Rotting softly and stealthily. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 424–429.
- Van der Merwe J.J., T.A. Coutinho, L. Korsten, J.E. van der Waals. 2010. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 126:175-185.
- Van der Wolf J.M., E.G. de Haan, P. Kastelein, M. Krijger, B.H. de Haas, H. Velvis, O. Mendes, M. Kooman-Gersmann, P.S. van der Zouwen. 2017. Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. *Plant Pathol.* 66: 571–583.
- Waleron M., K. Waleron, E. Łojkowska. 2002. Genotypic characterization of the *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of *rpoS* gene. *Plant Prot Sci.* 38: 288-290.
- Waleron M., K. Waleron, E. Łojkowska. 2015. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on potato and other vegetables in Poland. *Plant Dis.* 9: 1271.

CAPÍTULO II. *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Curtobacterium* y *Pseudomonas* AGENTES CAUSALES DE LA NECROSIS INTERNA DEL TALLO DE *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter [Backeberg]) EN EL VALLE DE ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA, MÉXICO.

2.1. RESUMEN

Neobuxbaumia tetetzo (Coulter [Backeberg]) (tetecho) es una cactácea columnar endémica de México. Las plantas, frutos, flores y semillas sirven de refugio y alimento de insectos, murciélagos, aves y es de amplio uso por diferentes etnias desde tiempos prehispánicos. En Zapotitlán, Puebla individuos de tetecho muestran externamente áreas de tejido amarillo a lo largo del tallo y necrosis del tejido interno. A partir del tejido interno, se aislaron consistentemente cuatro morfotipos bacterianos, los cuales se inocularon individualmente y en conjunto en plantas sanas de tetecho reproduciendo los mismos síntomas de amarillamiento y necrosis interna a los 45 días después de la inoculación. Seis cepas de cada morfotipo se caracterizaron e identificaron fenotípicamente y mediante el análisis de los genes 16S rDNA, ISR 16S-23S rDNA, *gyrB* y *rpoB*. Los resultados identificaron a los géneros *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* como los agentes causales de estos síntomas. Este es la primera investigación en México sobre bacterias en tejido interno del tallo causando amarillamiento externo y necrosis interna de tejido.

Palabras clave: Cactácea, Amarillamiento, Necrosis, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*.

2.2. ABSTRACT

Neobuxbaumia tetetzo (Coultier [Backeberg]) (tetecho) is a columnar cactus endemic to Mexico. Plants, fruits, flowers and seeds serve as shelter and food for insects, bats, birds and is widely used by different ethnic groups since pre-Hispanic times. In Zapotitlán, Puebla tetecho individuals externally show areas of yellow tissue along the stem and the internal tissue presents necrosis. From the internal tissue, four bacterial morphotypes were isolated consistently, which were inoculated individually and together in healthy tetecho plants, reproducing the same symptoms of yellowness and necrosis at 45 days after inoculation. Six strains of each morphotype were characterized and identified phenotypically and by analysis of the 16S rDNA, ISR 16S-23S rDNA, *gyrB* and *rpoB* genes. The results identified the genera *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Leuconostoc* and *Carnobacterium* as causal agents of these symptoms. This is the first investigation on bacteria in internal tissue of the stem causing external yellowing and internal necrosis in Mexico.

Additional keyword: Cactacea, yellowing, necrosis, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*.

2.3. INTRODUCCIÓN

La Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán es una región semiárida con la mayor diversidad de especies endémicas y se ubica en el centro de México en los estados de Puebla y Oaxaca. La vegetación se clasifica como bosque xerofito con alta diversidad de cactáceas columnares (Leonor y Sierra, 2011); dentro de estas, destaca la cactácea columnar “tetecho” (*Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter [Backeberg]) (Arias *et al.*, 2015) y el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla es la región con la mayor abundancia que se distribuye hasta la cañada de Cuicatlán, Oaxaca (Ruedas *et al.*, 2006).

El tetecho es de gran importancia dentro del ecosistema semiárido; la etapa reproductiva de esta cactácea ocurre desde abril a junio y en la parte apical emergen flores que producen una gran cantidad de néctar y polen del cual se alimentan aves, insectos y murciélagos que polinizan y dispersan la semilla en toda la zona (Godínez, 2001). Asimismo, es muy importante para la población humana debido al aprovechamiento de los botones florales, frutos y semillas con los que se preparan aproximadamente 50 platillos culinarios como alimento en esta región (Godínez, 2001).

En recorridos realizados en Zapotitlán Salinas durante 2015-2017, se observaron plantas de tetecho con áreas de tejido amarillo a lo largo del tallo y el tejido interno del tallo de estos individuos mostró zonas con necrosis. En la actualidad, no existen estudios en México que aporten información de referencia sobre la etiología de enfermedades en esta cactácea. Nuestra hipótesis es que estos síntomas de amarillamiento externo y necrosis interna del tallo en tetecho son causados por bacterias.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar y caracterizar la o las bacterias que causan el amarillamiento externo y necrosis en el tejido interno del tallo del tetecho.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Aislamiento del patógeno

De 2015 a 2017 se colectaron muestras de tejido de 80 plantas de tetecho con síntomas de amarillamiento externo de tallo y necrosis del tejido interno en la región de Zapotitlán Salinas, Puebla, México (18°20'N, 97°28'W) . La parte externa del tallo se desinfectó con hipoclorito de sodio (NaOH) al 1% (v/v) por un min y se lavó con agua destilada estéril; porciones de tejido (0.5 cm²) interno con necrosis se sembraron en solución amortiguadora (Tris-EDTA), en los medios caldo nutritivo (CN) y Casaaminoácidos, peptona y glucosa (CPG) y se incubaron a 4, 18 y 26 °C por 3, 7 y 10 días. Posteriormente, 20 µL de cada cultivo se sembraron por extensión con una asa Digrafsky en los medios B de King (BK), R2A y Agar Nutritivo (AN) y se incubaron con las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente. De aquí, se aislaron consistentemente cuatro morfotipos bacterianos (TetA, TetB, TetN y TetG) a partir del tejido necrótico interno. Las colonias bacterianas se preservaron en cultivo puro en CPG a -20°C (Schaad *et al.*, 2001).

2.4.2. Patogenicidad

Treinta aislados de cada morfotipo bacteriano se inocularon en plantas de tetecho de 5 años de edad y 8 cm de altura (dos cactus por cada aislamiento) con 20 µL de una suspensión con 1.5x10⁶ UFC/ mL⁻¹ (Stommel *et al.*, 1996). Previo a la inoculación, el tejido del tetecho se desinfectó con etanol al 70% (v/v) y se lavó con agua estéril. Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero (25-30⁰ C; HR 80% con luz natural) durante 50 días. Como testigo, se inocularon 30 plantas con agua estéril .Todas las bacterias inoculadas (n=120) causaron necrosis en los tejidos internos de plantas de tetecho. De estas, seis aislados de cada morfotipo (TetA8, TetA19, TetA34, TetA46, TetA54, TetA63, TetB6, TetB22, TetB33, TetB41, TetB49,

TetB51, TetN2, TetN8, TetN11, TetN26, TetN28, TetN30, TetG4, TetG17, TetG22, TetG29, TetG31 y TetG33) se seleccionaron al azar para su identificación y caracterización. Además, estos aislados (n=6) se inocularon en plantas jóvenes de la cactácea columnar conocida localmente como garambullo (*Myrtilocactus geometrizans*) la cual convive con el tetecho en la misma zona de Zapotitlán Salinas, Puebla. La inoculación de *M. geometrizans* se realizó bajo las mismas condiciones experimentales descritas para la inoculación del tetecho.

2.4.3. Identificación y caracterización fenotípica

Los seis aislados se caracterizaron fenotípicamente por tinción de Gram, metabolismo facultativo, fluorescencia en BK, oxidasa, catalasa. Adicionalmente, se evaluó la sensibilidad a 12 antibióticos mediante el kit de discos comerciales (Bio-Rad, CA. EUA) y se caracterizó el perfil bioquímico mediante el sistema API20 Etm (Biomerieux, USA). (Palleroni, 1994; Kim *et al.*, 2008; Pikuta y Hoover, 2014; Chase *et al.*, 2016).

2.4.4. Identificación y caracterización molecular

2.4.4.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de los aislados bacterianos se obtuvo a partir de colonias de un cultivo puro con 24 h de crecimiento en medio CPG a 28⁰C, utilizando el producto comercial PureLinkTM Genomic DNA Kits (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.4.2. Secuenciación del gen 16S rDNA

Para amplificar la secuencia del gen 16S rDNA se utilizaron los iniciadores 8F (5`AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3`) y 1492R (5`GGTTACCTTGTTACGACTT-3`). que corresponden a las posiciones 8-27 y 1507-1492 respectivamente del 16S rRNA (Eden *et al.*, 1991). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen final de 50

μL, con 1 x PCR Buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.6 μM de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 50 s, apareamiento a la temperatura de 57°C, durante 30 seg, con extensión a 72°C durante 90 seg. La extensión final se llevó a cabo a 72°C, durante 5 min (Eden *et al.* 1991). Se analizó una alícuota de 5 μL por electroforesis en gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5% (w/v) en Buffer TBE. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador (DNR minibis-pro). El producto amplificado se purificó a partir del gel utilizando el kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenció de forma directa en un Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp., CA, USA).

2.4.4.3. Secuenciación de ISR 16S-23S rDNA, *gyrB* y *rpoB*

Se amplificó la región espaciadora intergénica (ISR) 16S-23S rDNA de los seis aislados del morfotipo TetB con los iniciadores específicos para el género *Carnobacterium* 16s-2 (5'-CTTGTACACACCGCCCGTC-3') y 23s-7 (5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3'), los cuales corresponden a la posición 1390 a 1407 y 188 a 208 respectivamente (Rachman *et al.*, 2004). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 1x PCR buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP, 0.3 μM de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min (Rachman *et al.*, 2004). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5%. El producto amplificado se purificó

a partir del gel con el kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) y se secuenció de forma directa en un Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp., CA, USA).

Para los seis aislados del morfotipo TetN se amplificó el gen que codifica la DNA girasa B (*gyrB*) con los iniciadores específicos para el género *Curtobacterium* 2F (5'-ACCGTCGAGTTCGACTACGA-3) y 4R (5'- CCTCGGTGTTGCCSARCTT-3'), los cuales corresponden a la posición 220-239 y 760-778 respectivamente (Richert, Brambilla, and Stackebrandt 2005). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 1x PCR buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.6 µM de cada oligonucleótido, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó una desnaturalización inicial de 94⁰C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94⁰C por 1 min, 56⁰C por 1 min, 72⁰C por 3 min y una extensión final de 72⁰C por 5 min (Richert *et al.*, 2005). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5%. El producto amplificado se purificó a partir del gel con el kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) y se secuenció de forma directa en un Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp., CA, USA).

Con los seis aislados del morfotipo TetA se amplificó el gen que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*) con los iniciadores específicos para el género *Pseudomonas* LAPS5 (5'-TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT-3) y LAPS27 (5'-CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG-3'), que cubren la secuencia *rpoB* de AE004842 en su posición 1531-2760 (Ait Tayeb *et al.*, 2005). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 1x PCR buffer, 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó una desnaturalización inicial de 94⁰C por 1.30 min, seguido de 40 ciclos a 94⁰C por 10 seg, 50⁰C por 20 seg, 72⁰C por 50 seg y una

extensión final de 72⁰C por 5 min (Ait Tayeb *et al.*, 2005). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5%. El producto amplificado se purificó a partir del gel con el kit Wizard[®] SV gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) y se secuenció de forma directa en un Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp., CA, USA).

Las secuencias de los tres genes (ISR 16S-23S rDNA, *gyrB* y *rpoB*) se analizaron y compararon mediante la herramienta BLAST con secuencias similares disponibles en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (GenBank-EMBL) (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias fueron incorporadas al GenBank para obtener su número de acceso.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Aislamiento del patógeno

Cuatro morfotipos bacterianos se aislaron de forma constante a partir de tejido con amarillamiento externo y necrosis interna de tallo: **TetA**, **TetB**, **TetG** y **TetN** con una frecuencia de aislamiento de 88, 83, 97 y 47% respectivamente. Las condiciones óptimas de aislamiento se observó con todos los medios de cultivo líquidos (CN, CPG y Tris-EDTA) y posterior re-siembra en los medios sólidos BK, R2A y AN. Los cuatro morfotipos bacterianos inoculados individualmente o combinados con la misma densidad celular en condiciones de invernadero, indujeron amarillamiento externo y necrosis en los tejidos internos de las plantas de tetecho; sin embargo, los cuatro morfotipos inoculados en mezcla indujeron una necrosis más severa. Los mismos morfotipos bacterianos inoculadas fueron re-aislados a partir del tejido necrótico de tetecho.

2.5.2. Patogenicidad

Los síntomas de amarillamiento externo (Figura 6a) en plantas de tetecho y necrosis interna del tallo (Figura 6b) observado en campo, se reprodujeron en plantas de tetecho bajo condiciones experimentales en invernadero con la inoculación individual de los seis aislados bacterianos de cada morfotipo. Las plantas de tetecho inoculadas mostraron la coloración amarilla del tejido externo del tallo (Figura 6c) y necrosis a los 45 días después de la inoculación (ddi). La necrosis fue más severa con la inoculación de la mezcla de los 4 morfotipos (Figura 6d). Las bacterias inoculadas se re-aislaron a partir del tejido necrótico. No se observaron síntomas de forma externa (Figura 6e) o interna (Figura 6f) en las plantas control.

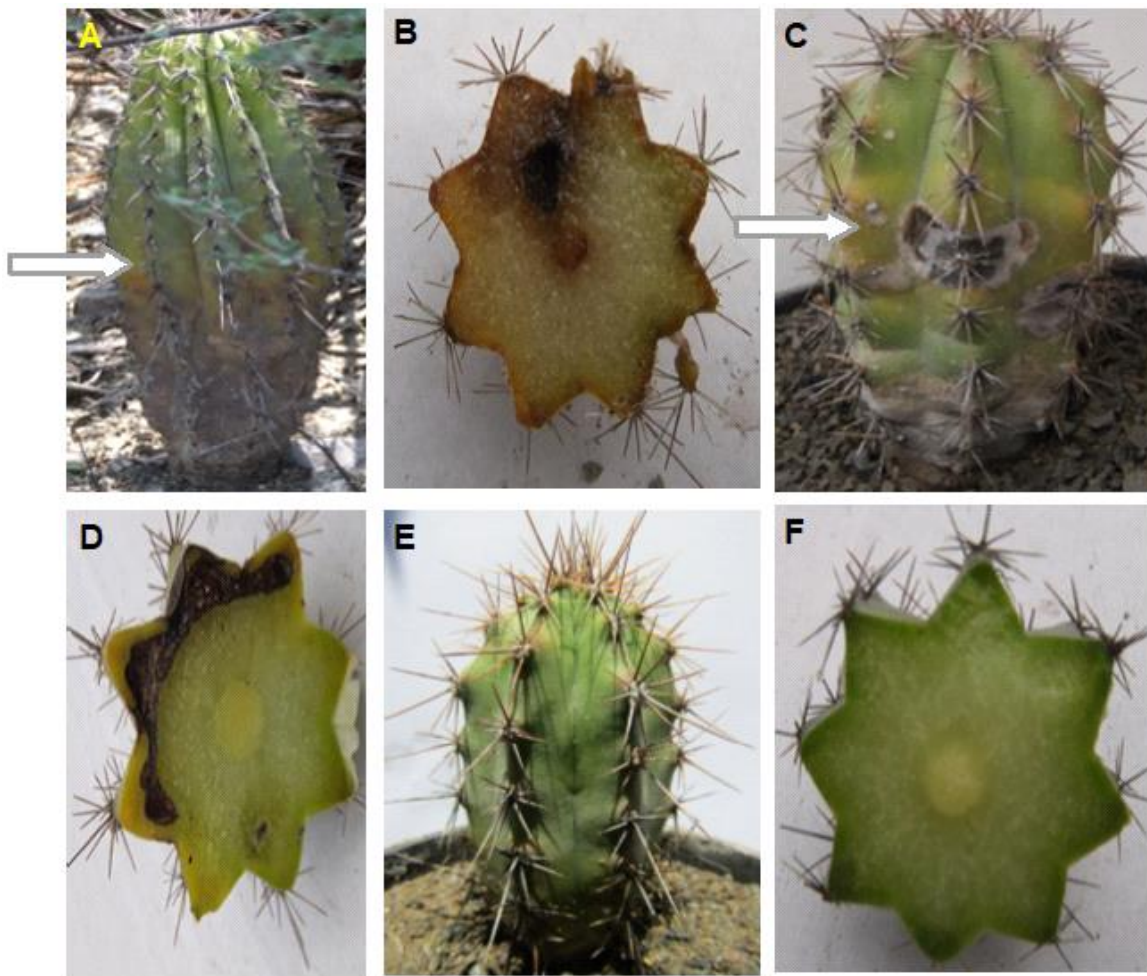


Figura 6. Síntomas externos e internos de tetecho en campo: (a) zonas de tejido amarillas, (b) necrosis interna. Síntomas en plantas inoculadas bajo condiciones de invernadero: (c) zona amarilla de tallo, (d) tejido interno con necrosis, (e) tejido externo de tetecho control y (f) tejido interno de tetecho control.

2.5.3. Identificación y caracterización fenotípica

Las cepas bacterianas del morfotipo **TetB** formaron colonias circulares de color blanco-grisáceo, brillante y apariencia húmeda, la morfología de las células fue bacilar corta, no móvil, Gram negativas, catalasa positiva, no fluorescen en medio BK, crecimiento en pH 9 en el medio de cultivo AN. Estas características coinciden con lo reportado para el género *Carnobacterium* (Car) (Wood y Holpzafel, 1995). El morfotipo **TetA**, formaron colonias circulares de color

amarillo, apariencia húmeda, brillante, células de forma bacillar, móviles, Gram negativas, catalasa positiva y coinciden con el perfil del género *Pseudomonas*. El morfotipo TetN formó colonias color naranja, circular, de aspecto húmedo, células de forma bacilar corto, Gram positivas, crece a 36⁰C en medio GNA y tolera 7% de cloruro de sodio (NaCl) en caldo nutritivo, ureasa negativa y coinciden para el género *Curtobacterium*. El morfotipo **TetG** mostró colonias circulares menores a 1 mm, color gris, aspecto húmedo, Gram positiva, oxidasa y catalasa negativa, características que coinciden con el género *Leuconostoc*.

2.5.4. Identificación y caracterización molecular

El análisis de las secuencias del gen 16S rDNA de las seis cepas del morfotipo **TetA** indicaron 100% de similitud con secuencias similares reportadas en el Genbank para el género *Pseudomonas* (número de acceso KP279879) y se confirmó con el análisis de las secuencias del gen *rpoB* con 97% de identidad con este género. Con el morfotipo **TetB**, el análisis del 16s rDNA mostró una similitud de 98% con el género *Carnobacterium*, confirmado con el análisis de las secuencias del ISRs 16s-23s con 100% de similitud. Con el morfotipo **TetN**, la comparación de las secuencias del gen 16s rDNA mostraron 99% de similitud con el género *Curtobacterium* (número de acceso KR906485), confirmado por el análisis del gen *gyrB* con 95% de similitud. Las secuencias del gen 16s rDNA de las seis cepas seleccionadas del morfotipo **TetG** mostraron una similitud del 99% con *Leuconostoc* sp. (número de acceso KY427111).

La PCR de los morfotipos bacterianos aislados de tetecho **TetA**, **TetB** y **TetN** usando los genes *rpoB* (Ait *et al.*, 2005), ISRs16s-23s (Rachman *et al.*, 2004) y *gyrB* (Richert *et al.*, 2004) respectivamente, generaron las bandas esperadas en gel de agarosa al 1.5% (Figura 7).

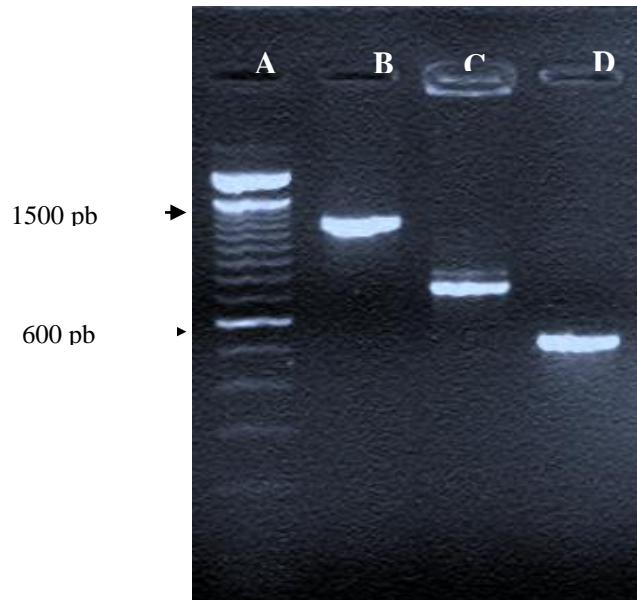


Figura 7. Amplificación molecular de diferentes géneros bacterianos: A). Marcador molecular 100 pb, B) gen *rpoB* de *Pseudomonas* sp. (1247 pb), C) gen 16s-23s rDNA ISRs de *Carnobacterium* sp. (550 pb), D) gen *gyrB* (pb) de *Curtobacterium* sp. (680 pb).

Por lo anterior, con base en la caracterización fisiológica, bioquímica, molecular y pruebas de patogenicidad, se identificaron a los géneros *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* como los agentes causales del amarillamiento externo de plantas de tetecho así como la necrosis interna de tejido

2.6. DISCUSIÓN

Las plantas de tetecho que presentan síntomas de amarillamiento de forma externa del tallo, muestran necrosis de los tejidos internos.

Los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* se aislaron e identificaron de muestras de tejido de estas plantas y reprodujeron los síntomas al inocularse en plantas sanas. Estas bacterias mostraron crecimiento lento en los medios de

cultivo CPG, AN y R2A. El crecimiento óptimo se observó en los medios de cultivo líquidos a 4°C por 10 días y posterior transferencia a medios sólidos por 10 días. La inoculación individual de estas bacterias causó diferente grado de necrosis de tejido interno en tetecho y garambullo (*Myrtilocactus geometrizzans*). Sin embargo, cuando se inoculó la mezcla de los cuatro morfotipos con la misma cantidad y densidad celular (20 µL con 1.5x10⁶ UFC mL⁻¹), se incrementó la severidad de la necrosis del tejido interno; lo anterior sugiere un nivel de interacción entre estas bacterias. Investigaciones previas han documentado que en diversas especies de plantas coinciden comunidades bacterianas de múltiples especies que pueden interactuar en diferentes niveles y que bajo ciertas condiciones contribuyen o desencadenan enfermedades en las plantas (Passos *et al.*, 2014; Kúdela *et al.*, 2010; Lamichhane y Venturi 2015; Vinatzer *et al.*, 2014; Uller *et al.*, 2016; Bulgarelli *et al.*, 2013 y Buonauro *et al.*, 2015). Investigaciones en otras cactáceas columnares han abordado el estudio de bacterias asociadas con el síntoma de pudriciones y necrosis de tejido. Un estudio con el cactus *Stenocereus gummosus* (Foster y Fogleman, 1994) sugirió que esta especie de cactus cuando sufre un daño por estrés ambiental o senescencia, promueve la colonización y desarrollo de bacterias y levaduras en el tejido causando muerte celular de los tejidos de este cactus y que es la fuente de alimento y sustrato de reproducción de la mosca endémica *Drosophila mojavensis* en el desierto de Sonora México, la cual disemina estas bacterias a otros cactus. En esta investigación asociaron la necrosis de este cactus a las especies *P. syringae* y *P. fluorescens* Martínez *et al.*, (2011) identificaron al género *Leuconostoc* como parte de la microflora bacteriana en los tejidos con pudrición de la cactácea columnar *Isolatocereus dumortieri* y en el intestino de la larva del insecto *Copestylum* (Díptera: Syrphidae) como parte del complejo de microorganismos causantes de la degradación del cactus. Este género también ha sido reportado

como patógeno en cultivos como tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Conn *et al.*, 1995), betabel (*Beta vulgaris* L.) (Strausbaugh, 2016), Ajo (*Allium sativum* L.) (Bonasera *et al.*, 2017) y zanahoria (*Daucus carota* L.) (Lampert *et al.*, 2017).

El género *Curtobacterium* hasta ahora incluye únicamente a la especie *flaccumfaciens* como fitopatógeno en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Chase *et al.*, 2016); poblaciones bacterianas dentro de este género también se han identificado como endófitos-simbiontes (Bulgari *et al.*, 2009), que induce una respuesta de defensa en las plantas (Bulgari *et al.*, 2011), disminuye la severidad de los síntomas inducidos por *Xylella fastidiosa* en *Catharanthus roseus* (Lacava *et al.*, 2007) y promueve el crecimiento vegetal (Sturz *et al.*, 1997).

En el presente estudio se evidencia que la inoculación experimental de las cepas identificadas como *Carnobacterium* (morfortipo TetB), causaron amarillamiento y necrosis de tejido en plantas de tetecho. *Carnobacterium* spp. se han reportado como endófitos en trigo (*Triticum durum*) (Minervini *et al.*, 2015), que induce una respuesta de defensa contra el patógeno bacteriano *Pectobacterium atrosepticum* en plantas de papa (Kõiv *et al.*, 2015); así mismo, se relaciona con la inducción de resistencia y promoción del crecimiento vegetal (Jain and Choudhary, 2014; Jain *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, el género *Carnobacterium* no se ha reportado como patógeno de plantas. Es posible que *Carnobacterium* sea un endófito natural en plantas de tetecho y que bajo ciertas modificaciones del tejido en esta cactácea pueda expresar mecanismos relacionados con la patogénesis así como los otros morfortipos aislados en el presente estudio. Kõiv *et al.*, (2015) concluyó que algunos microorganismos descritos como endófitos son patógenos latentes bajo ciertas condiciones y que estos inducen o participan en la infección de plantas. Patógenos y endófitos utilizan mecanismos moleculares similares de comunicación con su planta hospedante. Lo anterior resalta la

necesidad de realizar una investigación profunda de la interacción de este género bacteriano sobre el proceso de colonización y patogenicidad en tetecho y otras cactáceas de la zona estudiada. En condiciones de campo en Zapotitlán Salinas, las plantas de tetecho mostraron daño en el tallo por la formación de galerías de insectos que se reproducen en esta cactácea; lo anterior podría ser un factor relevante que ocasiona modificaciones en el tejido y estimule la colonización e infección de estas bacterias, provocando las condiciones óptimas en el tejido para que otros patógenos con mayor agresividad en su actividad enzimática causen la pudrición externa, desintegración y muerte de la planta.

Las galerías de insectos observadas en el tallo del tetecho con amarillamiento en esta región de Zapotitlán salinas, son causadas principalmente por larvas del género *Lagocheirus* (Datos no publicados). Tovar (2011), reportó estos daños causados por insectos y sugiere que esto permite el ingreso de bacterias que inducen la pudrición blanda. Investigaciones futuras deberán profundizar en el estudio de la posible interacción activa o pasiva de los géneros bacterianos reportados en este estudio con los insectos nativos en la zona relacionados con la pudrición blanda de esta cactácea.

Curtobacterium, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* no se han reportado como patógenos de cactáceas en México; se desconoce su virulencia, distribución geográfica y rango de hospedantes en otras cactáceas o cultivos hortícolas.

El amarillamiento del tallo y necrosis interna de tejidos en tetecho fueron causados por los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Leuconoscoc* y *Carnobacterium* en Zapotitlán Salinas, Puebla, México. La inoculación experimental de plantas de tetecho con la mezcla de las cuatro cepas bacterianas incrementó la severidad de la necrosis de los tejidos internos. El género *Carnobacterium* se reporta por primera vez como patógeno de plantas; su

inoculación individual o mezclado con *Pseudomonas*, *Curtobacterium* y *Leuconostoc* causó necrosis de tejido en plantas de tetecho.

2.7. LITERATURA CITADA

- Ait Tayeb, L., Ageron, E., Grimont, F., Grimont, P. A. D. 2005. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res. Microbiol.* 156:763–773.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.
- Arias, S., Valverde, T., Zavala-Hurtado, A. Hernández, C. 2015. *Neobuxbaumia tetetzo*. IUCN Red List Threat. *Species.* 8235:50.
- Bonasera, J. M., Ann, J., Asselin, E., Beer, S. V. 2017. Lactic Acid Bacteria Cause a Leaf Blight and Bulb Decay of Onion (*Allium cepa*). *Plant Dis.* 101:29–33.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver, E., Van Themaat, L., Schulze-Lefert, P. 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:807–38.
- Bulgari, D., Casati, P., Brusetti, L., Quaglino, F., Brasca, M., Daffonchio, D., et al. 2009. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *J. Microbiol.* 47:393–401.
- Bulgari, D., Casati, P., Crepaldi, P., Daffonchio, D., Quaglino, F., Brusetti, L., et al. 2011. Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5018–22.
- Buonaurio, R., Moretti, C., da Silva, D. P., Cortese, C., Ramos, C., Venturi, V. 2015. The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Front. Plant Sci.* 6:1–12.
- Chase, A. B., Arevalo, P., Polz, M. F., Berlemont, R., Martiny, J. B. H. 2016. Evidence for Ecological Flexibility in the Cosmopolitan Genus *Curtobacterium*. *Front. Microbiol.* 7:1874.
- Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., Pace, N. R. 1991. Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16s rRNA-Specific DNA. *I.J.S.B. Int. Union Microbiol. Soc.* 2591:29–324.
- Foster, J. L. M., y Fogleman, J. C. 1994. Bacterial succession in necrotic tissue of agria cactus (*Stenocereus gummosus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60:619–625.
- Godínez Alvarez, H. O. 2001. El tetecho: historia natural de una cactácea columnar del centro de México. *Rev. la Acad. Mex. Ciencias.* 52:52–57.

- Jain, S., y Choudhary, D. K. 2014. Induced defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants by *Carnobacterium* sp. SJ-5 upon challenge inoculation of *Fusarium oxysporum*. *Planta*. 239:1027–1040.
- Jain, S., Vaishnav, A., Kasotia, A., Kumari, S., Gaur, R. K., Choudhary, D. K. 2014. Rhizobacterium-mediated growth promotion and expression of stress enzymes in *Glycine max* L. Merrill against *Fusarium* wilt upon challenge inoculation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30:399–406.
- K. E. Conn; J. M. Ogawa, B. T. Manji, J. E. A. 1995. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, The First Report of a Coccoid Bacterium Causing a Plant Disease. *Phytopathol.* 85:593–599.
- Kõiv, V., Roosaare, M., Vedler, E., Ann Kivistik, P., Toppi, K., Schryer, D. W., et al. 2015. Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. *Sci. Rep.* 5:11606.
- Kůdela, V., Krejzar, V., Pánková, I. 2010. *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas marginalis* Associated with the Collapse of Tomato Plants in Rockwool Slab Hydroponic Culture. *Plant Prot. Sci.* 46:1–11.
- Lacava, P. T., Li, W., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., Hartung, J. S. 2007. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *J. Microbiol.* 45:388–393.
- Lamichhane, J. R., y Venturi, V. 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Front. Plant Sci.* 6:385.
- Lampert, Y., Dror, B., Sela, N., Teper-Bamnolker, P., Daus, A., Sela, S., et al. 2017. Emergence of *Leuconostoc mesenteroides* as a causative agent of oozing in carrots stored under non-ventilated conditions. *Microb. Biotechnol.* 10:1677–1689.
- Leonor, C., y Sierra, J. 2011. Las cactáceas mexicanas y Los riesgos que enfrentan. *Rev. Digit. Univ.* 12.
- Minervini, F., Celano, G., Lattanzi, A., Tedone, L., De Mastro, G., Gobbetti, M., et al. 2015. Lactic acid bacteria are endophytic components of durum wheat plant following the whole life cycle from plant to flour. *Appl. Environ. Microbiol.* :6736–48.
- Passos, D., Silva, D., Castañeda-Ojeda, M. P., Moretti, C., Buonauro, R., Ramos, C., 2014. Bacterial multispecies studies and microbiome analysis of a plant disease. *Microbiol.* 160: 556-566.
- Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prévost, H., Dousset, X. 2004. Identification of *Carnobacterium* species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S

- rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4468–77.
- Richert, K., Brambilla, E., y Stackebrandt, E. 2005. Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria, order Actinomycetales. *J. Microbiol. Methods.* 60:115–123.
- Ruedas, M., Valverde, T., y Zavala-hurtado, J. A. 2006. Analysis o. the factors that affect the distribution and abundance of three *Neobuxbaumia* species (Cactaceae) that differ in their degree of rarity. *Acta Oecologica.* 29:155–164.
- Schaad, N. W. (Norman W. ., Jones, J. B. (Jeffrey B., Chun, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.* 3rd ed. St. Paul, Minn.: American Phytopathological Society.
- Strausbaugh, C. A. 2016. *Leuconostoc* spp. Associated with Root Rot in Sugar Beet and Their Interaction with *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* 106:432–441.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., Nowak, J. 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils.* 25:13–19.
- Tovar, D. C. 2011. Insectos y patógenos que afectan las áreas arboladas de Puebla. In *La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado. México*, ed. CONABIO. Mèxico: CONABIO, p. 441.
- Uller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., Vorholt, J. A. 2016. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annu. Rev. Genet.* 50:211–34.
- Vinatzer, B. A., Monteil, C. L., y Clarke, C. R. 2014. Harnessing Population Genomics to Understand How Bacterial Pathogens Emerge, Adapt to Crop Hosts, and Disseminate. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:19–43.

CAPITULO III. DETECCIÓN DE BACTERIAS EN EL INTESTINO DE INSECTOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN BLANDA DE *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter) Backeberg EN EL VALLE DE ZAPOTITLÁN SALINAS PUEBLA, MÉXICO.

3.1. RESUMEN

El tetecho (*Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter) [Backeberg]) es una cactácea columnar endémica de México. Las plantas, frutos, flores y semillas de tetecho desempeñan un papel importante dentro del ecosistema semiárido, ya que sirven de refugio y alimento de insectos, murciélagos, aves y es de amplio uso por diferentes etnias desde tiempos prehispánicos. Individuos de la población de esta cactácea en el valle de Zapotitlán Salinas Puebla, México es afectada por una pudrición blanda, que eventualmente puede dañar a toda la planta y provocar su caída y desintegración; en el tejido con pudrición blanda, se asocian diferentes larvas y adultos de insectos. El objetivo de esta investigación fue identificar las poblaciones más abundantes de insectos asociados a este síntoma y detectar e identificar las bacterias presentes en el intestino de estos insectos. Se realizó una colecta dirigida de los insectos más abundantes en ochenta plantas de tetecho con esta pudrición. Se identificaron como los insectos más abundantes a *Lagocheirus lugubris* (Coleoptera: Cerambycidae), *Chalcolepidius* sp. (Coleoptera: elateridae) y *Glyphidops flavifrons* (Diptera: Neriidae). Del intestino de larvas y adultos de estos coleópteros y adulto del díptero, se detectaron por PCR las bacterias dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Carnobacterium*, y *Pectobacterium*. Los géneros *Carnobacterium* y *Curtobacterium* se detectaron en las larvas de *Lagocheirus lugubris*; el género *Pseudomonas* se detectó en todos los insectos excepto en el adulto de *Chalcolepidius* sp., *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* se detectó en larvas y adultos de *Lagocheirus* y en el adulto de *Glyphidops flavifrons*. En ninguno de los insectos se detectó el género *Leuconostoc*. En un estudio anterior por nuestro grupo de investigación, se evidenció que estas bacterias causan la necrosis interna del tallo y

podrición. Este es el primer reporte de las bacterias en insectos asociados a la necrosis interna y pudrición blanda en esta cactácea en México.

Palabras clave: Cactacea, insectos, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pectobacterium*.

3.2. ABSTRACT

Tetecho (*Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter [Backeberg]) is a columnar cactus endemic to Mexico. Plants, fruits, flowers and tetecho seeds play an important role in the semi-arid ecosystem, as they serve as a refuge and food for insects, bats, birds and is widely used by different ethnic groups since pre-Hispanic times. Individuals of the population of this cactus in the valley of Zapotitlán Salinas Puebla. Mexico is affected by a soft rot, which can eventually damage the entire plant and cause its fall and disintegration; in soft rotted tissue, different larvae and adults of insects are associated. The objective of this research was to identify the most abundant populations of insects associated with this symptom and to detect and identify the bacteria present in the intestine of these insects. A directed collection of the most abundant insects was carried out in eighty tetecho plants with this rot. The most abundant insects were *Lagocheirus lugubris* (Coleoptera: Cerambycidae), *Chalcolepidius* sp. (Coleoptera: elateridae) and *Glyphidops flavifrons* (Diptera: Neriidae). From the intestine of larvae and adults of these Coleoptera and adult of the Diptera, were detected by PCR: *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Carnobacterium*, and *Pectobacterium*. The genera *Carnobacterium* and *Curtobacterium* were detected in the larvae of *Lagocheirus lugubris*; the genus *Pseudomonas* was detected in all insects but not in the adult *Chalcolepidius* sp., *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* was detected from larvae and adults of *Lagocheirus* and adults of *Glyphidops flavifrons*. In none

of the insects was the genus *Leuconostoc* detected. In a previous study, it was evidenced that these bacteria cause internal necrosis of the stem and decay. This is the first report of bacteria in internal necrosis and soft rot and that are associated to insects in this cactus in Mexico.

Additional keyword: Cactacea, insects, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pectobacterium*.

3.3. INTRODUCCIÓN

La Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán es una región semiárida con una gran diversidad de Cactáceas endémicas. Dentro de estas abundan las cactáceas columnares (Jiménez, 2011) como *Neobuxbaumia tetetzo* (Coultier [Backeberg]) (Arias *et al.*, 2013) principalmente en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla y la cañada de Cuicatlán, Oaxaca (Arias *et al.*, 2010).

Esta cactácea es fundamental dentro del ecosistema ya que desde abril a junio tiene su etapa reproductiva y de la parte apical emergen flores que producen una gran cantidad de néctar y polen del cual se alimentan aves, insectos y murciélagos que polinizan y dispersan la semilla (Godínez, 2001). Así mismo, es muy importante para la población humana de esta región, ya que aprovechan los botones florales, frutos y semillas como alimento (Godínez, 2001).

En Zapotitlán Salinas, se han observado individuos de tetecho enfermos. Los síntomas en estas plantas incluyen áreas externas de tejido en el tallo de color amarillento, tejido interno con necrosis, ruptura de corteza y escurrimiento de exudado a partir de las galerías formadas por insectos. Las plantas enfermas posteriormente muestran una pudrición blanda que invade todo el tallo y provoca la desintegración y colapso de la planta completa. Así mismo, en las plantas afectadas se observa abundante exudado acuoso que emana de las galerías de insectos que atrae más insectos. Este fenómeno había sido referido por Cibrián (2011) quien asoció esta exudación como consecuencia de la infestación de insectos barrenadores y en cuyas lesiones se desarrollan bacterias que aceleran la muerte del tetecho. Sin embargo, Cibrián no evidencia sobre la posible interacción entre patógenos e insectos. Otras investigaciones con cactáceas columnares demostraron que las bacterias establecen una íntima interacción con insectos (Basset *et al.*, 2000; Muniz *et al.*, 2007). El síntoma de necrosis en el tejido de la cactacea columnar *Stenocereus gummosus* sirve como alimento y sustrato de reproducción de la mosca *Drosophila*

mojavensis, la cual es endémica en el desierto de Sonora, México (Fogleman y Foster, 1989); cuatro especies endémicas de *Drosophila* se alimentan y reproducen en este tejido necrótico en cinco especies de cactus columnares (Fogleman y Danielson, 2001).

En un estudio previo, nuestro equipo de investigación evidenció que en la necrosis interna del tallo del tetecho se encuentran involucradas bacterias de los géneros *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium*, mientras que la posterior pudrición blanda es causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*; estos resultados representan el primer reporte a nivel mundial de este patógeno causando pudrición blanda en cactáceas (en prensa); Así mismo, se ha observado la predominancia de ciertas poblaciones de larvas e insectos en las galerías, tejido necrótico y pudrición blanda en el tetecho. Se desconoce si existe una relación de estas bacterias identificadas anteriormente con las poblaciones de insectos asociados a estos síntomas. Nuestra hipótesis establece que estos insectos tienen una relación como portadores o vectores con las bacterias previamente identificadas y desempeñan un papel fundamental en el patosistema del tetecho. Hasta la fecha no existe ninguna investigación que aborde la identificación de bacterias en los insectos asociados a la pudrición blanda del tetecho en México, por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar los insectos más abundantes asociados a los síntomas de pudrición blanda y determinar la presencia de las bacterias en el intestino de estos insectos .

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Colecta e identificación de insectos

De 2015 a 2017 en la región de Zapotitlán Salinas, Puebla (18⁰20'N, 97⁰28'W), México, se colectaron larvas de insectos dentro del tallo de 80 plantas enfermas de tetecho con síntomas de pudrición blanda. El muestreo se realizó principalmente de plantas o brazos podridos que colapsaron naturalmente; así mismo, se colectaron adultos de coleópteros presentes en tejidos con pudrición. A partir de las galerías del tallo de tetecho de donde emanaban abundantes exudados y burbujas por la presencia de gases, se colectaron adultos del díptero presente en mayor abundancia y de forma constante. Las larvas colectadas en la médula de la planta con mayor presencia se mantuvieron en recipientes estériles de plástico con suelo de la región y trozos de tejido de tetecho sano como fuente de alimento. Los recipientes se cubrieron con malla mosquitera de acero inoxidable (tipo 304, marca Solford.) de 20 cm en la parte superior para mantener las condiciones adecuadas de oxigenación, temperatura y humedad durante 4 meses. Los adultos que emergieron a partir de estas larvas fueron utilizados para su identificación y para la detección de bacterias en el intestino. Los insectos adultos coleópteros más abundantes en los tejidos macerados y los dípteros presentes en las galerías del tallo de donde emanan exudados, también se mantuvieron en recipientes plásticos con tejido sano de tetecho, bajo condiciones de laboratorio.

Los insectos colectados más abundantes asociados con la pudrición blanda del tetecho fueron identificados de acuerdo a claves taxonómicas y literatura disponible (Toledo *et al.*, 2007; Aguirre, 2009; Casari, 2002; Tatiana, 2013).

3.4.2. Detección molecular específica de bacterias en el intestino de insectos

3.4.2.1. Desinfestación de insectos

Previo a la separación del intestino, las dos especies de coleópteros y el díptero se desinfestaron superficialmente en una solución de cloro al 3% y alcohol al 70% durante 3 min; después, se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada. El intestino se separó bajo condiciones asépticas (Chung *et al.*, 2017) con pinzas estériles bajo un microscopio estereoscópico y se colocó en un mortero estéril con 5 mL de agua estéril. El mortero con el tejido se enfrió a -75⁰C en un ultracongelador (Revco. Thermo scientific). El tejido se maceró y se utilizó para la extracción del ADN total (Chandler *et al.*, 2011a; Chung *et al.*, 2017)

3.4.2.2. Extracción de ADN

La extracción del ADN total se realizó con el producto comercial PureLinktm Genomic DNA Kits (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído de dos especies de coleópteros (larva y adulto) y adultos de una especie de díptero colectados de tetecho enfermo, se utilizó para la amplificación de genes específicos de los géneros y especie de las bacterias previamente reportados en esta planta como se detalla a continuación.

3.4.2.3. Amplificación de IGS 16S-23S rDNA de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* y el género *Carnobacterium*

Para detectar la presencia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* se amplificó la región espaciadora intergénica (IGS) 16S-23S rDNA con los iniciadores BR1f (5'-GCGTGCCGGGTTTATGACCT-3') y L1r (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') específicos para esta bacteria. El iniciador BR1f fue generado de la región IGS en base al corte de la enzima de restricción SEXA1 y L1r de la dirección 5' del gen 23s rRNA (Duarte *et al.*, 2004). La PCR se

llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 1x PCR buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.1 mM de cada dNTP, 0.3 µM de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR consideró una desnaturalización inicial a 94⁰C por 2 min, seguido de 30 ciclos a 94⁰C por 30 s, 62⁰C por 45 s, 72⁰C por 90 min y una extensión final de 72⁰C por 7 min (Choi y Kim, 2013). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 2%.

3.4.2.4. Amplificación específica del Género *Carnobacterium*

Para detectar la presencia del género *Carnobacterium* se amplificó la región espaciadora intergénica (ISR) 16S-23S rDNA con los iniciadores específicos 16s-2 (5'-CTTGTACACACCGCCCGTC-3) y 23s-7 (5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3`), los cuales corresponden a la posición 1390 a 1407 y 188 a 208 respectivamente (Rachman *et al.*, 2004). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 1x PCR buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP, 0.3 µM de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó una desnaturalización inicial a 94⁰C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94⁰C por 1 min, 56⁰C por 1 min, 72⁰C por 1 min y una extensión final de 72⁰C por 5 min (Rachman *et al.* 2004). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5%.

3.4.2.5. Amplificación del gen *gyrB* de *Curtobacterium*

Para evidenciar la presencia del género *Curtobacterium* se amplificó el gen que codifica para la DNA girasa B (*gyrB*) con los iniciadores específicos 2F (5'-ACCGTCGAGTTCGACTACGA-3) y 4R (5'-CCTCGGTGTTGCCSARCTT-3`), los cuales corresponden a la posición 220-239 y 760-778 respectivamente (Richert *et al.*, 2005). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 1x PCR buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.6 µM de cada

oligonucleótido, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó una desnaturalización inicial a 94⁰C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94⁰C por 1 min, 56⁰C por 1 min, 72⁰C por 3 min y una extensión final de 72⁰C por 5 min (Richert *et al.*, 2005). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5%.

3.4.2.6. Amplificación del gen *rpoB* de *Pseudomonas*

Para detectar la presencia del género *Pseudomonas* se amplificó el gen que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*) con los iniciadores específicos LAPS5 (5'-TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT-3') y LAPS27 (5'-CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG-3'), que cubren la secuencia *rpoB* de AE004842 en su posición 1531-2760 (Ait Tayeb *et al.*, 2005). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 1x PCR buffer, 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada oligonucleótido, 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó una desnaturalización inicial a 94⁰C por 1.30 min, seguido de 40 ciclos a 94⁰C por 10 s, 50⁰C por 20 s, 72⁰C por 50 s y una extensión final de 72⁰C por 5 min (Ait Tayeb *et al.*, 2005). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5%.

3.4.2.7. Amplificación específica con 16S rDNA de *Leuconostoc*

Para determinar la presencia del género *Leuconostoc* se utilizaron los iniciadores LeuF (5'-CGAAAGGTGCTTGACCTTTCAAG-3') el cual corresponde a la posición 74-98 y LeuR (5'-TTTGTCTCCGAAGAGAACA-3') que corresponde a la posición 1023-1040 (Jang *et al.*, 2003). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 1x PCR buffer, 25 mM de MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 1.25 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 10 ng de DNA. La PCR incluyó una desnaturalización inicial

a 94⁰C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94⁰C por 30 s, 55⁰C por 30 s, 72⁰C por 1 min y una extensión final de 72⁰C por 7 min (Jang *et al.* 2003). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Promega, USA) al 1.5%.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Colecta e identificación de insectos

De ochenta muestras de tejido de plantas de tetecho con síntomas de pudrición blanda, el 100% evidenció la presencia de una larva apoda, color crema, mandíbulas fuertes y quitinizadas (Figura 8a). De estas larvas conservadas en los recipientes plásticos, emergieron adultos Cerambícidos con las típicas antenas largas, el cual se identificó como *Lagocheirus lugubris* (Coleoptera: Cerambicidae) (Figura 8b) de acuerdo a las claves y descripción de esta especie (Noguera 2002; Noguera, 2014); en 40 muestras (50%), se observaron larvas y adultos de Elateridae (coleóptero) el cual se identificó dentro del género *Chalcolepidius* (Casari, 2002; Aguirre, 2009) (Figura 8d). De las 80 muestras, 50 provinieron de plantas de tetecho en pie y en 30 (60%) de ellas se observaron galerías en el tallo, de las cuales emanaban exudados acuosos, con formación de burbujas que sugiere la producción de algún tipo de gas. En la periferia de estas galerías, se observó alimentándose un díptero comúnmente conocido como mosca de los cactus, el cual se identificó como *Glyphidops flavifrons* (Diptera: Neriidae) (Figura 8c) de acuerdo a las claves e información de referencia (Sepulveda, 2013).



Figura 8. Insectos frecuentes en la pudrición blanda del tetecho. a) Larva de *Lagocheirus lugubris*. b) Adulto de *Lagocheirus lugubris*. c) Adulto de *Glyphidops flavifrons* y d) Adulto de *Chalcolepidius* sp.

3.5.2. Amplificación molecular de bacterias del intestino de insectos

La larva del Cerambícido *Lagocheirus* fue el insecto más abundante asociado con la pudrición blanda de tetecho. A partir del ADN extraído del intestino se obtuvo la amplificación molecular específica de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*, los géneros *Carnobacterium*, *Pseudomonas* y *Curtobacterium* (Figura 9a, 9b, 9c y 9d); en adultos que emergieron de los recipientes conservados bajo condiciones de laboratorio solo se detectó *P.c.* subsp. *brasiliense*

(Figura 9a y 9b), lo cual podría sugerir que existe una relación más estrecha entre esta bacteria causante de la pudrición blanda con este insecto, al detectarse tanto en larvas como adultos.

Del insecto *Glyphidops flavifrons* presente en las galerías de los tallos del tetecho donde emanan exudados, se detectó a *P.c.* subsp. *brasiliense* y *Pseudomonas* (Figura 9a y 9b). El insecto menos abundante en tejido de tetecho con pudrición blanda fue el coleóptero *Chalcolepidius* sp, en el cual se detectó únicamente al género *Pseudomonas* en larvas pero no en el adulto (Figura 9c). En ninguno de los insectos (larva y adulto) se detectó al género *Leuconostoc* (Cuadro 1).

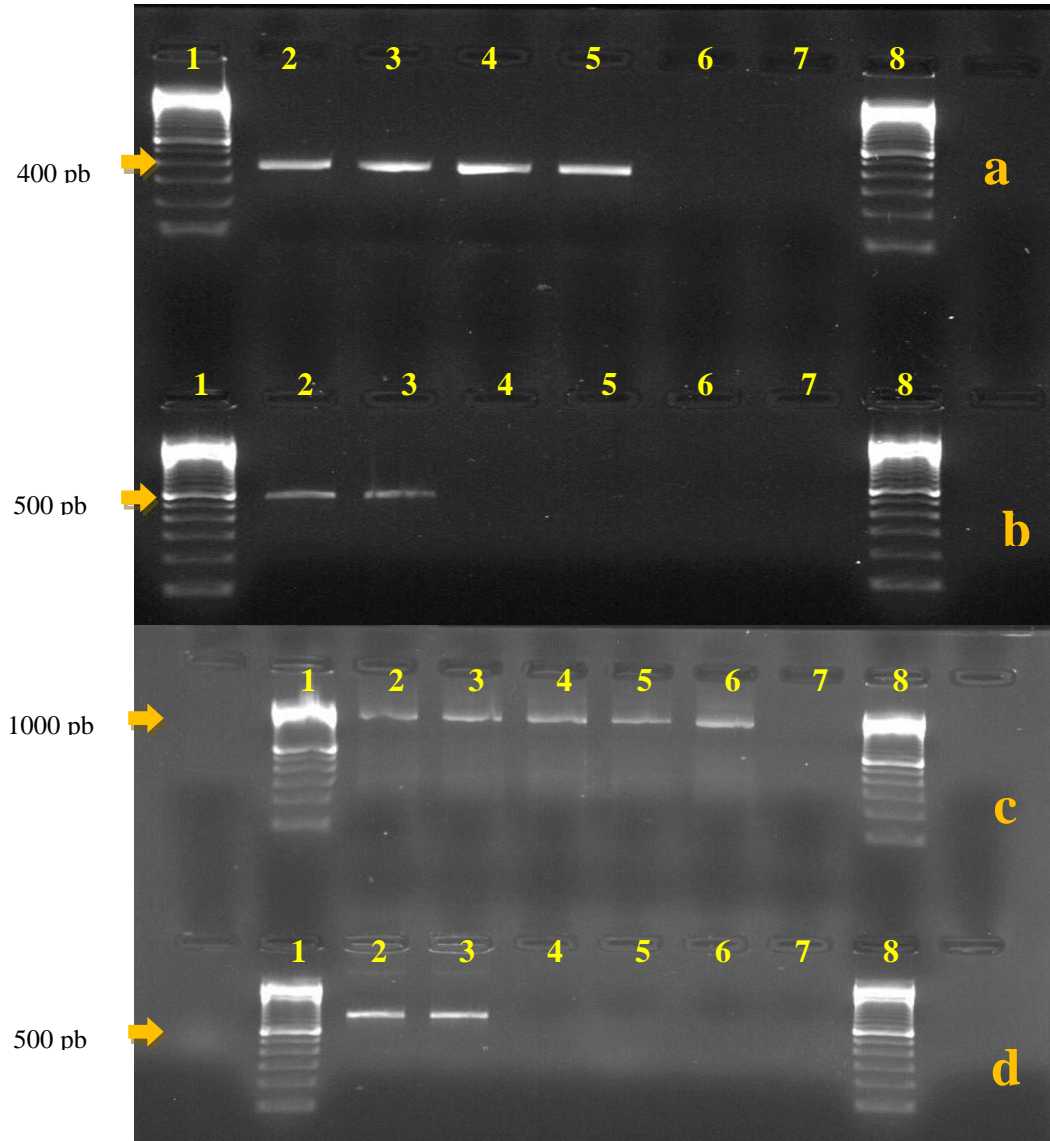


Figura 9. a) amplicónes de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (381 pb). b) *Carnobacterium* sp. (550 pb). c) *Pseudomonas* sp. (1247 pb) y d) *Curtobacterium* sp. (680 pb). Carril 1 y 8. Marcador molecular de 100 pb (Promega). Carril 2. Positivo. Carril 3 y 4. Larva y adulto de *Lagocheirus*. Carril 5 y 6 larva y adulto de *Chalcolepidius* sp. Carril 7. Adulto de *Glyphidops*.

Cuadro 1. Bacterias detectadas en el intestino de los diferentes estados de los insectos.

	<i>Lagocheirus lugubris</i>		<i>Chalcolepidius</i> sp.		<i>Glyphidops flavifrons</i>
	Larva	Adulto	Larva	Adulto	Adulto
<i>P.c.subsp. brasiliense</i>	+ ^a	+	-	-	+
<i>Carnobacterium</i> sp.	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	+	-	+
<i>Curtobacterium</i> sp.	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc</i> sp.	- ^b	-	-	-	-

^aDetección positiva por PCR; ^bDetección negativa por PCR

3.6. DISCUSIÓN

En este estudio se identificaron los insectos más abundantes asociados al síntoma de pudrición blanda y necrosis del tetecho y se detectó en el intestino de larvas y adultos las bacterias previamente identificadas como los agentes causales de estos síntomas. Los insectos más abundantes asociados a la pudrición fueron *Lagocheirus lugubris* (Coleótera: Cerambycidae), *Chalcolepidius* sp. (Coleóptera: Elateridae) y *Glyphidops flavifrons* (Díptera: Neriidae).

En las plantas de tetecho se observó que las larvas de *Lagocheirus* barrenan el tallo y solo permanecen en el tejido macerado cuando está húmedo; sin embargo, en cuanto se seca el tejido, las larvas migran posiblemente a otras plantas o al suelo. Estos hábitos coinciden con lo reportado para la especie y otras especies del mismo género, las larvas barrenan los tejidos, alteran el transporte de agua y nutrientes en la planta y favorecen el ingreso de patógenos

(Noguera *et al.*, 2002). Algunos miembros de este grupo de insectos desempeñan un papel ecológico importante en la degradación de la madera, hay especies que se alimentan de raíces, ramas y tallos herbáceos de plantas anuales. Sin embargo, cuando un ecosistema es perturbado, algunos cerambícidos pueden provocar severos daños a especies arbóreas (Noguera, 2014). En la reserva de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán donde crece el tetecho, se encuentra el jardín botánico Helia Bravo, en donde se desarrollan diversas actividades antropogénicas que podrían ser un factor que modifica el ecosistema natural xerófito y favorecer la acción de estos cerambícidos.

Chalcolepidius, hiberna debajo de la corteza de algunos árboles, en grietas u oquedades de troncos (Casari, 2002; Aguirre-Tapiero, 2009) (Figura 1c). Por otro lado, la familia Neriidae (al cual pertenece el díptero *Glyphidops flavifrons* identificado en este estudio) se ha descrito asociada a cactus y se alimenta además de la savia de la planta y de tejidos en descomposición (Sepulveda *et al.*, 2013). Fogleman y Danielson (2001) han descrito un sistema similar de dípteros asociados a necrosis de cactus columnares en el desierto de Sonora, México, como un modelo cactus-microorganismo-*Drosophila*. En dicho modelo se observaron cuatro especies endémicas de *Drosophila* que se alimentan y reproducen en cinco especies columnares, mostrando especificidad entre dípteros y cactus y que esta especificidad está influenciada por la actividad metabólica de bacterias y levaduras que se desarrollan en el tejido con necrosis de los cactus y que esta infección genera compuestos químicos volátiles específicos, los cuales atraen sólo a ciertas especies de *Drosophila*. Un modelo similar podría ocurrir en la pudrición del tetecho; en los exudados que emanan de las galerías del tallo, se forman abundantes burbujas por la producción de gases o compuestos químicos volátiles atrayentes; lo anterior podría explicar la mayor abundancia del díptero *Glyphidops flavifrons* colectado e identificado en ese tejido.

En el patosistema de tetecho en la reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, se identificó a los géneros *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Carnobacterium* y *Curtobacterium* como inductores de necrosis interna del tallo (no publicado) y a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* como responsable de la pudrición blanda del tetecho (en prensa). En esta investigación se describen los insectos más abundantes asociados directamente al tetecho enfermo y evidenciamos la presencia de las mismas bacterias en el intestino de estos insectos; sin embargo, se desconoce el tipo de asociación entre estas bacterias, los insectos y la planta. Investigaciones futuras deberán enfocarse en dilucidar si los insectos son portadores o vectores de estas bacterias que contribuyan a su dispersión; determinar la naturaleza de los compuestos químicos volátiles producidos en el exudado y en los tejidos con pudrición y si existe selectividad con estos insectos.

Estudios de la necrosis de la cactácea columnar *Isolatocereus dumortieri* (Cactácea) evidenciaron colonización bacteriana de la planta y del intestino de las larvas del díptero *Copestylum* (Díptera: Syrphidae). Los autores sugieren que estas bacterias causan lisis de las células vegetales, exponen el contenido celular y crean un microambiente cuyos productos químicos volátiles atraen insectos cactófilos como moscas (Díptera) y escarabajos (Coleóptera), los cuales al alimentarse pueden dispersar a las bacterias a otra planta que ha sido atacada por insectos o tiene estrés de algún tipo. Esto contribuye al reciclado de nutrientes en estos ambientes xéricos (Martínez *et al.*, 2011).

Estudios en el desierto de Sonora, México, con tejido necrótico de *Stenocereus gummosus* (Cactácea) encontraron que sirve como fuente de alimento y substrato de reproducción de la mosca endémica en el desierto de Sonora *Drosophila mojavensis* (Díptera). Destacando la alta frecuencia de bacterias con capacidad de modificar el tejido, fomentar la emisión de volátiles

que atraen a otras *Drosophilas*; incluso que esta interacción química permite especializar el tipo de díptero con el tipo de cactus (Fogleman y Foster 1989; Fogleman y Danielson, 2001).

En muchos insectos, la presencia de ciertas bacterias en su intestino tiene diferentes funciones biológicas ya que pueden ser esenciales para la supervivencia del insecto, o desempeñar un papel central en la fisiología y adaptación ecológica del mismo (Chandler *et al.*, 2011).

La presencia de los géneros *Pectobacterium* y *Pseudomonas* se han reportado en el intestino de insectos en otros sistemas, como es el caso de la mosca oriental de la fruta (*Bactrocera dorsali*) y el barrenador de los bosques europeos (*Melolontha hippocastani*) respectivamente (Wang *et al.*, 2011; Arias *et al.*, 2012). Los autores indicaron que la presencia de estas bacterias en el intestino de estos insectos va más allá de un simple fenómeno de colaboración alimenticia y que más bien involucra aspectos de co-evolución. El género *Leuconostoc* ha sido reportado como parte de la microflora bacteriana en los tejidos con pudrición de la cactácea columnar *Isolatocereus dumortieri* y en el intestino de la larva del insecto *Copestylum* (Díptera: Syrphidae) como parte del complejo de microorganismos causantes de la degradación del cactus (Martínez *et al.*, 2011)

En la presente investigación se identificaron asociados a la pudrición blanda del tetecho los insectos *Lagocheirus lugubris* (Coleoptera: Cerambycidae), *Chalcolepidius* sp. (Coleóptera: Elatéridae) y *Glyphidops flavifrons* (Díptera: Neriidae). Del intestino de larvas y adultos de estos coleópteros y adulto del díptero, se detectaron las bacterias reportadas por nuestro equipo de investigación (en prensa) como responsables de la necrosis interna del tallo y pudrición blanda del tetecho con los genes 16s rDNA, IGS 16S-23S rDNA y *rpoS*. Se evidenció la presencia de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* en intestino de larvas y adultos de *Lagocheirus* y adultos de *Glyphidops*, mientras que los géneros *Carnobacterium* y *Curtobacterium* sólo se

detectaron en larvas de *Lagocheirus*. El género *Pseudomonas* se detectó en todos los insectos excepto en el adulto de *Chalcolepidius*. En ningún insecto se detectó al género *Leuconostoc*. Algunos miembros de estos insectos se han reportado como depredadores de insectos esternorincos de cuerpo suave (como cóccidos y pulgones) y de invertebrados pequeños, otros se alimentan de frutas maduras o caídas, néctar, polen, partes florales, cuerpos fructíferos, nectarios extra-florales y secreciones radiculares (Zurita *et al.*, 2014) La evidencia aportada sobre la presencia diferencial de estas bacterias en el intestino de los insectos estudiados, merece profundizar en la investigación de la posible interacción que ocurre entre insectos-bacteria como promotores y dispersores de las bacterias causantes de la pudrición y necrosis de tejido del tetecho en Zapotitlán Salinas, Puebla.

Los resultados sugieren que los insectos *Lagocheirus lugubris* y *Glyphidops flavifrons* están estrechamente relacionados con las bacterias identificadas como agentes causales de la pudrición blanda y necrosis interna del tetecho, ya que el mayor número de bacterias se detectó en las larvas de *Lagocheirus lugubris*. Para el agente causal de la pudrición blanda (*P.c.* subsp. *brasiliense*) se detectaron tanto en larvas como en adultos de este insecto y en el adulto de *Glyphidops flavifrons*. *Pseudomonas* se detectó en los tres insectos más abundantes identificados.

3.7. LITERATURA CITADA

- Aguirre Tapiero, M. del P. 2009. clave de identificación de géneros conocidos y esperados de elateridae leach (coleoptera: elateroidea) en colombia. *Bol. del Mus. Entomol. la Univ. del Val.* 10:25–35.
- Ait Tayeb, L., Ageron, E., Grimont, F., Grimont, P. A. D. 2005. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. *Res. Microbiol.* 156:763–773.
- Arias-Cordero, E., Ping, L., Reichwald, K., Delb, H., Platzer, M., Boland, W. 2012. Comparative Evaluation of the Gut Microbiota Associated with the Below- and Above-Ground Life Stages (Larvae and Beetles) of the Forest Cockchafer, *Melolontha hippocastani* ed. Pedro Lagerblad Oliveira. *PLoS One.* 7:e51557.
- Casari, S. A. 2002. Review of the genus *Chalcolepidius* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae). *Rev. Bras. Entomol.* 46:263–428.
- Chandler, J. A., Morgan Lang, J., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., Kopp, A. 2011a. Bacterial Communities of Diverse *Drosophila* Species: Ecological Context of a Host–Microbe Model System ed. Harmit S. Malik. *PLoS Genet.* 7:e1002272.
- Chandler, J. A., Morgan Lang, J., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., Kopp, A. 2011b. Bacterial Communities of Diverse *Drosophila* Species: Ecological Context of a Host–Microbe Model System ed. Harmit S. Malik. *PLoS Genet.* 7:e1002272.
- Chung, S. H., Scully, E. D., Peiffer, M., Geib, S. M., Rosa, C., Hoover, K., et al. 2017. Host plant species determines symbiotic bacterial community mediating suppression of plant defenses. *Sci. Rep.* 7:39690.
- Noguera, f. a Santiago Zaragoza-Caballero, John a. Chemsak,, Alicia Rodríguez-Palafox, Enrique Ramirez, Enrique Gonzalez-Soriano y Ricardo Ayala. 2002. Diversity of the Family Cerambycidae (Coleoptera) of the Tropical Dry Forest of Mexico, I. Sierra de Huautla, Morelos. *Conserv. Biol. Biodivers.*
- Fogleman, J. C., y Danielson, P. B. 2001. Chemical Interactions in the Cactus-Microorganism-*Drosophila* Model System of the Sonoran Desert. *Am. Zool.* 41:877–889.
- Fogleman, J. C., y Foster, J. L. 1989. Microbial colonization of injured cactus tissue (*Stenocereus gummosus*) and its relationship to the ecology of cactophilic *Drosophila mojavensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:100–5.
- Jang, J., Kim, B., Lee, J., y Han, H. 2003. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. *J. Microbiol. Methods.* 55:295–302.

- Martínez-Falcón, A. P., Durbán, A., Latorre, A., Antón, J., Marcos-García, M. de los Á. 2011. Bacteria Associated with *Copestylum* (Diptera, Syrphidae) Larvae and Their Cactus Host *Isolatocereus dumortieri* ed. Jack Anthony Gilbert. *PLoS One*. 6:e27443.
- Noguera, F. A. 2014. Biodiversidad de Cerambycidae (Coleoptera) en México. *Rev. Mex. Biodivers.* 85:290–297.
- Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R., Prévost, H., Dousset, X. 2004. Identification of Carnobacterium species by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4468–77.
- Richert, K., Brambilla, E., y Stackebrandt, E. 2005. Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria, order Actinomycetales. *J. Microbiol. Methods.* 60:115–123.
- Tatiana A, Sepulveda, A. P.-C. A. C. J. B. D. C. 2013. Revision of the neotropical genus *Cerantichir* (Diptera:Neriidae) with new records and a key to species. *Rev. Colomb. Entomol.* 39:125–131.
- Toledo, V. H., Corona, A. M., Morrone, J. J. 2007. Track analysis of the Mexican species of Cerambycidae (Insecta, Coleoptera). *Rev. Bras. Entomol.* 51:131–137.
- Wang, H., Jin, L., y Zhang, H. 2011. Comparison of the diversity of the bacterial communities in the intestinal tract of adult *Bactrocera dorsalis* from three different populations. *J. Appl. Microbiol.* 110:1390–1401.
- Zurita-García, M. L., Johnson, P., y Zaragoza-Caballero, S. 2014. Biodiversidad de Elateridae (Coleoptera) en México. *Rev. Mex. Biodivers.* 85:303–311.

CONCLUSIONES GENERALES

La pudrición blanda del tetecho en Zapotitlan Salinas, Puebla es causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. Este es el primer reporte a nivel mundial de esta subespecie de *carotovorum* causando enfermedad en la familia Cactácea.

La inoculación experimental de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causó maceración de tejido en diversas hortalizas de importancia agrícola en México incluyendo nopal verdura, lo cual podría representar un riesgo potencial en estos cultivos.

La necrosis del tejido interno del tallo de tetecho es causado por los géneros bacterianos *Leuconostoc*, *Curtobacterium*, *Curtobacterium* y *Pseudomonas*.

La inoculación experimental en plantas jóvenes de tetecho con la misma densidad celular y cantidad de inóculo de estas bacterias, incrementa la severidad de la necrosis del tejido interno. *Lagocheirus lugubris* (Coleóptera: Cerambycidae), *Chalcolepidius* sp. (Coleóptera: Elateridae) y *Glyphidops flavifrons* (Díptera: Neriidae), son los insectos más abundantes asociados con la pudrición y el colapso del tetecho.

Pectobacterium carotovorum subsp. *brasiliense* y los géneros *Carnobacterium*, *Pseudomonas* y *Curtobacterium*, se encuentran en el intestino de los insectos más abundantes asociados con la pudrición y colapso del tetecho.

El mayor número de bacterias identificadas previamente se encuentran en las larvas de *Lagocheirus lugubris*.

Pseudomonas se encuentra en el intestino de los tres insectos más abundantes identificados. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*, agente causal de la pudrición blanda del tetecho, se encuentra en el intestino tanto de larvas como adultos del insecto *Lagocheirus*, lo cual sugiere que existe una relación más específica con este insecto. Investigaciones futuras

deben enfocarse en dilucidar el nivel de interacción que existe entre los insectos identificados en este estudio como potenciales vectores de estas bacterias.