



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

**ESTRÍADO CLORÓTICO Y MARCHITEZ BACTERIANA DEL MAÍZ:
IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL, EPIDEMIOLOGÍA Y CALIDAD
DE SEMILLA**

GUADALUPE MORALES VALENZUELA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO


2016

La presente tesis, titulada: **Estriado clorótico y marchitez bacteriana del maíz: identificación del agente causal, epidemiología y calidad de semilla**, realizada por el alumno: **Guadalupe Morales Valenzuela**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



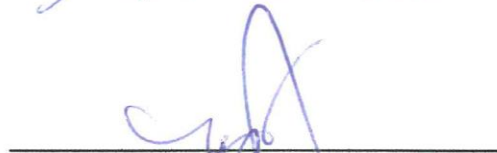
Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

ASESOR



Dr. Aquiles Carballo Carballo

ASESORA



Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR



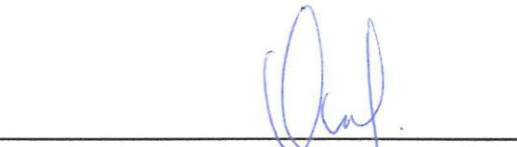
Dr. Leobigildo Córdova Téllez

ASESOR



Dr. Humberto Vaquera Huerta

ASESOR



Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado De México, diciembre de 2016

ESTRIADO CLORÓTICO Y MARCHITEZ BACTERIANA DEL MAÍZ: IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL, EPIDEMIOLOGÍA Y CALIDAD DE SEMILLA

GUADALUPE MORALES VALENZUELA, DR.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2016

RESUMEN

El estriado clorótico y la marchitez bacteriana del maíz (*Zea mays* L.) es una enfermedad que están cobrando importancia en este cultivo por su capacidad de transmitirse a través de la semilla. A la fecha no se tiene información precisa del agente causal, su epidemiología y su importancia en la calidad de la semilla. El presente trabajo tuvo como propósito generar información acerca de su etiología, epidemiología y efecto en la calidad de la semilla como elementos para proponer estrategias de manejo. Se identificó el agente causal mediante amplificación de un segmento del 16S rDNA y se determinaron sus requerimientos de azúcares y alcoholes, se estudió la dispersión espacial y temporal de la enfermedad en lotes experimentales de dos genotipos de maíz infectados de forma natural y se analizó la calidad fisiológica de la semilla producida en plantas infectadas. Se identificó a la bacteria *Pantoea agglomerans* asociada a la enfermedad, se registraron incidencias de 26.13 y 26.87% de plantas con síntomas en los híbridos Triunfo y 9Bx52, respectivamente siendo la temperatura el único factor que se correlacionó significativamente con esta variable. El progreso temporal de la enfermedad se ajustó al modelo monomolecular en ambos casos. El patrón espacial de la enfermedad fue agregado en Triunfo y aleatorio en 9Bx52. Las plantas con síntomas de infección sistémica produjeron semillas con porcentajes de germinación y vigor más bajo que las provenientes de plantas con síntomas de infección local

Palabras claves: *Pantoea agglomerans*, 16S rDNA, epidemiología, calidad de semillas.

CHLOROTIC STREAKS AND WILT OF MAIZE: AGENT CAUSAL IDENTIFICATION, EPIDEMIOLOGY AND SEED QUALITY.

GUADALUPE MORALES VALENZUELA, DR.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2016

ABSTRACT

Chlorotic streaks and bacterial wilt of corn (*Zea mays* L.) is a disease that are becoming more important in this crop for their ability to seed transmission. To date there is no precise causal agent, its epidemiology and its importance in seed quality information. This work was aimed to generate information about its etiology, epidemiology and impact on the quality of the seed as elements to propose management strategies. The causal agent was identified by amplification of a segment of the 16S rDNA and its requirements sugars and alcohols were determined, the spatial and temporal spread of the disease was studied in experimental plots of two genotypes of infected corn naturally and quality was analyzed physiological seed produced in infected plants. It was identified the bacterium *Pantoea agglomerans* associated with the disease, incidences of 26.13 and 26.87% in Triunfo and 9Bx52 hybrids were recorded respectively, the temperature being the only factor that was significantly correlated with this variable. The temporal progress of the disease was adjusted to the monomolecular model in both cases. The spatial pattern of the disease was aggregated in Triunfo and random in 9Bx52. Plants with symptoms of systemic infection produced seeds with germination rates and vigor lower than those from healthy plants with signs of local infection

Keywords: *Pantoea agglomerans*, 16S, epidemiology, seed quality.

DEDICATORIA

A mi ascendencia genética inmediata, mi ejemplo

A mi descendencia genética inmediata, mi inspiración

A mi esposa, mi motivación

A mis hermanos y hermanas, mi apoyo

A todos los que preguntaron: ¿Para cuándo la tesis?, mis
amigos

A la memoria de Cherit Jesua Isidro Morales (2004-2016)

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México, que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), financiaron mis estudios.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por la beca para concluir la tesis.

A la Universidad Intercultural del Estado de Tabasco por brindarme las facilidades para concluir esta etapa de mi formación.

Al Colegio de Postgraduados por abrirme el espacio para continuar preparándome.

A mi consejera la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por permitirme formar parte de su línea de investigación y por orientarme en todo mi proceso formativo.

A mis asesores: Dr. Aquiles Carballo Carballo, Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, Dr. Leobigildo Córdova Téllez, Dr. Humberto Vaquera Huerta y Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez, por todo su apoyo y sugerencias.

A todo el personal adscrito al Programa de Semillas, en especial a la Sra. Alicia, por todas las facilidades brindadas.

A Edwin, Raquel y María, por todas las atenciones durante mi estancia en Texcoco

A todos los amigos, por acompañarme en este largo camino

CONTENIDO

		Pág.
RESUMEN		iii
ABSTRACT		iv
DEDICATORIA		v
AGRADECIMIENTOS		vi
LISTA DE CUADROS		ix
LISTA DE FIGURAS		x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN		1
	Introducción	1
	Objetivo general	4
	Objetivos específicos	4
	Hipótesis	4
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA		5
1.1	Generalidades	5
1.2.	Descripción del agente causal	5
	1.2.1. Nomenclatura	5
	1.2.2. Características morfológicas y fisiológicas	5
1.3	Epidemiología	6
	1.3.1. Hospedantes	6
	1.3.2. Sintomatología	6
	1.3.3. Detección y transmisión por semilla	7
	1.3.4. Vectores	8
	1.3.5. Ciclo de la enfermedad	8
	1.3.6. Distribución espacial y temporal	9
1.4.	Manejo de la enfermedad	10
	Literatura citada	11

CAPÍTULO III: IDENTIFICATION OF CAUSAL AGENT OF CHLOROTIC STREAKS AND WILT IN MAIZE USING POLYPHASIC APPROACHES		20
3.1	Abstract	20
3.2	Introduction	21
3.3	Materials and methods	22
3.4	Results	23
3.5	Discussion	25
3.6	Conclusion	26
3.7	References	27
CAPÍTULO IV: DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DEL ESTRIADO CLORÓTICO Y MARCHITEZ DEL MAÍZ (<i>Pantoea agglomerans</i>)		30
4.1	Resumen	30
4.2	Introducción	31
4.3	Materiales y métodos	33
4.4	Resultados y discusión	35
4.5	Conclusiones	44
4.7	Literatura citada	45
CAPÍTULO V: CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLA DE MAÍZ PROVENIENTE DE PLANTAS INFECTADAS POR <i>Pantoea agglomerans</i>		49
5.1	Resumen	49
5.2	Introducción	50
5.3	Materiales y métodos	51
5.4	Resultados	53
5.5	Discusión	59
5.7	Conclusiones	61
5.8	Literatura citada	63
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES		64

LISTA DE CUADROS

		Pág.
CAPÍTULO IV: DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DEL ESTRIADO CLORÓTICO Y MARCHITEZ DEL MAÍZ (<i>Pantoea agglomerans</i>) EN MONTECILLO, MÉXICO		
Cuadro 1.	Resumen de los estadísticos utilizados en la evaluación de tres modelos de crecimiento para describir el progreso del estriado clorótico y marchitez bacteriana causada por <i>Pantoea agglomerans</i> en dos híbridos de maíz. Montecillo, Estado de México, 2003	41
Cuadro 2.	Patrón espacial de la incidencia del estriado clorótico y marchitez bacteriana (<i>Pantoea agglomerans</i>) en dos híbridos de maíz en Montecillo, Estado de México. 2003.	42
CAPÍTULO V: CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLA DE MAÍZ PROVENIENTE DE PLANTAS INFECTADAS POR <i>Pantoea agglomerans</i>		
Cuadro 1.	Peso de mil semillas por genotipo y por tipo de infección.	54
Cuadro 2.	Cuadrados medios del análisis de varianza de las variables de la prueba de germinación en laboratorio.	55
Cuadro 3.	Comparación de medias por genotipo.	56
Cuadro 4.	Cuadrados medios del análisis de varianza de las variables de la prueba de emergencia en microtúnel.	57
Cuadro 5.	Comparación de medias de variables de germinación y emergencia por tipo de infección.	58
Cuadro 6.	Comparación de medias del porcentaje de germinación al primer conteo (PGPC) y longitud de la parte aérea (LPA) para la interacción	58

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA		
Figura 1.	Ciclo de <i>Pantoea agglomerans</i> en maíz.	9
CAPÍTULO III: IDENTIFICATION OF CAUSAL AGENT OF CHLOROTIC STREAKS AND WILT IN MAIZE USING POLYPHASIC APPROACHES		
Figure 1.	Phylogenetic tree constructed with a UPGMA method using MEGA 3.1 program with a bootstrap analysis based on 5,000 resamplings.	23
Figure 2.	Symptoms on the pathogenicity test in maize leaf (cv. Triunfo) inoculated with <i>Pantoea agglomerans</i> strain PGHL-M1. a) leaf blight, b) wilted plant.	24
Figure 3.	Hypersensitive response in tobacco leaves. a) control leaf, b) inoculated leaf.	25
CAPÍTULO IV: DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DEL ESTRIADO CLORÓTICO Y MARCHITEZ DEL MAÍZ (<i>Pantoea agglomerans</i>)		
Figura 1.	Síntomas de <i>Pantoea agglomerans</i> en plantas de maíz del híbrido comercial Triunfo en en Montecillo, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano 2003.	36
Figura 2.	Curvas de progreso del estriado clorótico y marchitez bacteriana provocada por <i>Pantoea agglomerans</i> en dos híbridos de maíz en Montecillo, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano 2003.	36
Figura 3.	Incidencia absoluta del estriado clorótico y marchitez bacteriana causada por <i>Pantoea agglomerans</i> en dos híbridos de maíz en Montecillo, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano 2003.	37
Figura 4.	Severidad del estriado clorótico y marchitez bacteriana (<i>Pantoea agglomerans</i>) en dos híbridos de maíz en Montecillo, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano 2003.	38
Figura 5.	Temperatura y humedad relativa (promedios semanales) prevalecientes durante el periodo 10 de junio a 02 de septiembre de 2003 en Montecillo, México.	39
Figura 6.	Precipitación y velocidad del viento (promedios semanales) prevalecientes durante el periodo 10 de junio a 02 de septiembre de 2003 en Montecillo, México.	40

CAPÍTULO V: CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLA DE MAÍZ PROVENIENTE DE PLANTAS INFECTADAS POR <i>Pantoea agglomerans</i>		
Figura 1.	Incidencia de plantas de maíz con estriado clorótico y marchitez causado por <i>Pantoea agglomerans</i> en los híbridos a)Triunfo y b) 9BX52, evaluadas durante el ciclo primavera-verano 2003 en Montecillo, Estado de México.	54

INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz (*Zea mays* L.) es un cereal que ocupa un lugar preponderante en la agricultura mundial, junto con el trigo y el arroz son una importante fuente para la alimentación humana (Ranum, 2014). Es el único cereal importante nativo del hemisferio occidental, su cultivo se ha extendido en los más variados climas y latitudes con diversos usos: alimenticio, forrajero, industrial, comercial, medicinal, cultural y científico, entre otros (Esteva. 2003; Kato *et al.*, 2009, Ortega-Coronado *et al.*, 2013).. A nivel mundial, este cereal representa el 5.4% del total de las fuentes alimenticias de la población humana (FAOSTAT, 2016).

La producción mundial de este cereal ha ido en aumento en los últimos 10 años y los países con mayor volumen de producción son Estados Unidos, China y Brasil (FAOSTAT, 2016).

En México el maíz es el principal cultivo por su importancia en la dieta de la población, también es el principal producto que se importa de Estados Unidos y en 2014 se incrementaron las importaciones en un 45.7% con relación al 2013. En el año 2014 se produjeron 23'273,257 toneladas en una superficie de 7'060,275 hectáreas con un rendimiento promedio de 3.3 t ha⁻¹. El 80% de la producción se concentró en 10 entidades federativas, entre las que destacan Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Estado de México y Guanajuato, las cuales aportan el 53% de la producción nacional (SIAP, 2015).

A nivel mundial se identifican diversos factores que influyen en la productividad del maíz, entre las que destacan una compleja red de elementos socioeconómicos y culturales y las limitantes biológicas, edáficas y ambientales, de las cuales las mas

importantes son: la fertilidad del suelo, el clima, las malezas, las plagas y las enfermedades (Lafitte, 1993; Quiroga-Madrigal, 1995; Paliwal, 2001).

Las pérdidas causadas por plagas y enfermedades en la producción total anual del maíz en el mundo alcanzan hasta un 9 % (Oerke, 2006). La magnitud y gravedad de las enfermedades del maíz dependen de la presencia de un patógeno virulento, del ambiente y de la susceptibilidad del hospedante.

Se considera que cerca de 83 hongos, 43 virus, 13 bacterias, un fitoplasma y un espiroplasma pueden afectar al maíz, de los cuales más del 50% pueden transmitirse por semilla (Agarwal and Sinclair, 1996; Munkvold and White, 2016). El Programa de Maíz del Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT) (2004) describe 58 patógenos de importancia para el maíz en México, de los cuales 43 son hongos, 10 virus, tres bacterias, un fitoplasma y un espiroplasma. Además, la literatura reporta un crecimiento importante de nuevas enfermedades de los cultivos, entre los cuales el maíz ocupa el primer lugar en nuevos reportes (Bebber, 2015).

En el caso de bacterias, recientes estudios muestran un crecimiento importante en el número de ellas que afectan maíz, entre las que destacan las del género *Pantoea*. En Canadá Nadarasah y Stavrinides (2014) encontraron que 11 especies de *Pantoea* inoculadas en plántulas de maíz tuvieron la capacidad de desarrollarse sobre dicho hospedante.

De las 11 especies del género *Pantoea* descritas actualmente, tres han sido reportadas como patógenas del maíz. *P. stewartii* fue detectada en Estados Unidos en 1895 y a partir de esta fecha se ha reportado en otras partes del mundo (Stewart, 1897; Pataky and Ikin, 2003). *P. ananatis* está asociada a la mancha foliar del maíz en Polonia, Argentina y Brasil (Krawczyk *et al.*, 2010, Alippi, 2009; Lana, 2012). *P.*

agglomerans ha sido reportada como patógeno del maíz en China, Indonesia y Sudáfrica (Hui-Ying *et al.*, 2011; Aini *et al.*, 2013; Goszczynska *et al.*, 2007). En México, se han reportado *P. ananatis* y *P. agglomerans* ocasionando mancha foliar y estriado clorótico, respectivamente (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007; Pérez y Terrón *et al.*, 2009).

P. agglomerans es una bacteria de importancia por su impacto en la salud humana, animal y vegetal (Dutkiewicz *et al.*, 2016), probablemente sea uno de los organismos más ampliamente distribuidos en el mundo. Sin embargo, desde la perspectiva agrícola puede ser un agente benéfico o perjudicial. Algunas cepas han sido utilizadas para el control biológico de enfermedades y como promotoras del crecimiento (Quecine *et al.*, 2012), mientras que por otro lado se ha reportado como fitopatógena de varias especies de interés agrícola y particularmente en el caso del maíz ocasiona estriado clorótico y marchitez de la planta.

Esta enfermedad ha cobrado interés por su capacidad de afectar a la planta de maíz en cualquier etapa de desarrollo y por su probable transmisión por semilla que puede ser superior al reportado para *P. stewartii*. En el caso de *P. agglomerans* se reportan índices de transmisión por semilla de 26 (Silva-Rojas *et al.*, 2010) hasta 100% (Hui-Ying *et al.*, 2011) mientras que para *P. stewartii* van de 0.038 a 0.14 % (Block *et al.*, 1999; Michener *et al.*, 2002).

En México, el estriado clorótico y marchitez bacteriana de maíz causada por *P. agglomerans* ha ocasionado pérdidas no determinadas, sin embargo, la incidencia de la enfermedad registrada de 1967 a 1971 varió entre 89 y 26% en diferentes áreas de producción (Fucikovsky *et al.*, 1972).

Debido a la importancia del estriado clorótico y marchitez del maíz, en el presente trabajo se realizaron estudios relacionados con el agente causal, su distribución espacio-temporal y su efecto en la calidad de las semillas.

Objetivo general

Conocer al agente y la epidemiología del estriado clorótico y marchitez bacteriana del maíz y su importancia en la calidad de la semilla

Objetivos específicos

1. Identificar al agente causal del estriado clorótico y marchitez del maíz.
2. Conocer la distribución espacio-temporal de esta enfermedad.
3. Evaluar la calidad de semilla obtenida de plantas con síntomas.

Hipótesis

El agente causal del estriado clorótico y marchitez del maíz en el Montecillo, Estado de México es una bacteria diferente a la reportada en trabajos anteriores, la distribución espacio temporal de la enfermedad se afecta por la temperatura y humedad relativa y reduce la calidad de la semilla.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Generalidades

Pantoea agglomerans comb. nov., conocida anteriormente como *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola* o *Erwinia milletiae*, es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (Gavini *et al.*, 1989).

1.2. Descripción del agente causal

1.2.1. Nomenclatura

Reino: Bacteria

Phyllum: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Pantoea*

Especie: *Pantoea. agglomerans*

(Gavini *et al.*, 1989).

1.2.2. Características morfológicas y bioquímicas

Las bacterias del género *Pantoea* poseen bastones rectos de 0.5-1.0 de longitud X 1-3 µm de ancho y la mayoría de las cepas son móviles por flagelos peritricos. Las colonias crecidas en agar son lisas, translúcidas, más o menos convexas, de color amarillo, amarillo pálido, amarillo rojizo o no pigmentado y anaerobio facultativos. Producen ácido a partir de la fermentación de la D-fructosa, D-galactosa, trehalosa, y D-ribosa. La temperatura óptima de crecimiento es 30°C. Utilizan como fuente de

carbono y energía a: N-acetil-D-glucosamina, L-aspartato, D-fructosa, D-galactosa, D-gluconato, D-glucosamina, la D-glucosa, L-glutamato, glicerol, D-manosa, D-ribosa, y d-trehalosa (Grimont and Grimont, 2015).

1.3. Epidemiología

La epidemiología agrícola estudia los diversos factores que afectan el proceso y diseminación de las enfermedades en poblaciones de plantas cultivadas (Achicanoy-López, 2000); tiene dos propósitos fundamentales: el conocimiento del comportamiento de las enfermedades en tiempo y espacio, y el uso de este conocimiento para manejar las enfermedades (Madden *et al.*, 2007).

1.3.1. Hospedantes

Aunque *P. agglomerans* se ha reportado como agente para el control biológico y promotor de crecimiento en algunos cultivos (Feng *et al.*, 2006; Quecine *et al.*, 2012, Dutkiewicz *et al.*, 2016), en otros casos se comporta como fitopatógena con una amplia gama de hospedantes. Se ha identificado en especies de plantas y en algunos casos se reporta como patógeno de animales y humanos (Cruz, 2007; Dutkiewicz *et al.*, 2016). El hecho de infectar plantas comestibles puede representar un riesgo para la salud humana (Mudryk, 2012).

En cultivos de interés agrícola, *P. agglomerans*, se ha reportado en *Pennisetum glaucum* (Frederickson *et al.*, 1997), *Allium cepa* (Edens *et al.*, 2006), *Oryza sativa* (González *et al.*, 2015), *Vigna angularis* (Lu *et al.*, 2015), *Juglans regia* (Yang *et al.*, 2011), *Dioscorea alata* (Rodríguez *et al.*, 2008), *Gossypium hirsutum* (Medrano y Bell, 2007), *Alocasia cucullata* (Romeiro *et al.*, 2007), *Gloxinia alba* (Jiménez *et al.*, 2007), *Zea mays* y *Sorghum vulgare* (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007).

1.3.2. Sintomatología

P. agglomerans en algunas especies ocasiona formación de agallas, pudriciones, necrosis, tizones, estrías cloróticas y marchitez (Barash and Manulis-Sasson, 2007; Morales-Valenzuela *et al.*, 2007).

En el caso del maíz, los síntomas ocurren en dos fases. Una fase afecta plantas jóvenes, regularmente estas plantas se marchitan rápidamente, semejándose a plantas que presentan estrés hídrico, deficiencia nutrimental o lesiones provocadas por insectos. Las hojas muestran estrías cloróticas o de color amarillo, con bordes irregulares u ondeados que rodean las nervaduras y pueden extenderse a lo largo de toda la hoja. Las lesiones se secan rápidamente y se tornan marrones. Las plantas infectadas que no mueren pueden producir mazorcas descoloridas y de menor tamaño (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007; Aini *et al.*, 2013)

La enfermedad puede confundirse con los síntomas ocasionados con *P. stewartii* (Thai Agricultural Standard, 2008), y en plantas severamente infectadas a nivel de suelo se forman cavidades en la médula del tallo, debido a que las bacterias colonizan el sistema vascular, y se movilizan por el xilema a toda la planta. Posteriormente se observa un estriado clorótico que aparece después de la floración femenina. Las lesiones en las hojas son de color verde-grisáceo a verde-amarillo y en forma de raya a lo largo de las nervaduras. Las áreas necróticas, que mueren y se tornan de color paja, se originan a partir de las lesiones ocasionadas por insectos. A veces toda la hoja se muere y se seca. Cuando las hojas mueren prematuramente, la cosecha se reduce (Munkvold and White, 2016). En otros casos se observa una pudrición seca del tallo (Hui-Ying *et al.*, 2011; Goszczyńska *et al.*, 2007).

1.3.3. Detección y transmisión por semilla

Bacterias fitopatógenas del género *Pantoea* son acarreadas y transmitidas por semilla. En el caso de *P. agglomerans*, se ha reportado infección y transmisión por semilla en algodón (Medrano and Bell, 2007), maíz (Silva-Rojas *et al.*, 2010; Hui-Ying *et al.*, 2011). Asimismo, se sabe que *P. agglomerans* puede completar el ciclo semilla-semilla, ya que la bacteria es capaz de moverse de semilla inoculada a hojas y semillas a través del sistema vascular de las plantas de maíz (Hui-Ying *et al.*, 2011).

1.3.4. Vectores

Debido a que la bacteria ha sido reportada recientemente en maíz no se tiene registro de posibles vectores, sin embargo, en otros cultivos se han reportado que puede ser transmitida por *Thrips tabaci* en cebolla (Dutta *et al.*, 2014), *Daktulosphaira vitifoliae* en uva (Vorwerk *et al.*, 2007) y *Nezara viridula* en algodón (Medrano *et al.*, 2009), algunos de estos insectos también se encuentran en maíz. Inclusive se ha aislado de la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) (Lauzon *et al.*, 2009) y termitas (*Macrotermes natalensis*) (Palmer *et al.*, 2016).

1.3.5. Ciclo de la enfermedad

Considerando la información generada para diversas especies de bacterias fitopatógenas, en particular del género *Pantoea*, el ciclo del estriado clorótico y marchitez bacteriana del maíz inicia en la semilla infectada y posteriormente se transmite mediante insectos vectores durante todo el ciclo de cultivo.

Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad son temperatura y humedad alta, aunque para *P. agglomerans* no se han determinado los rangos mínimos y máximos de temperatura, para la mayoría de las bacterias es superior a los 22°C (Agrios, 2015).

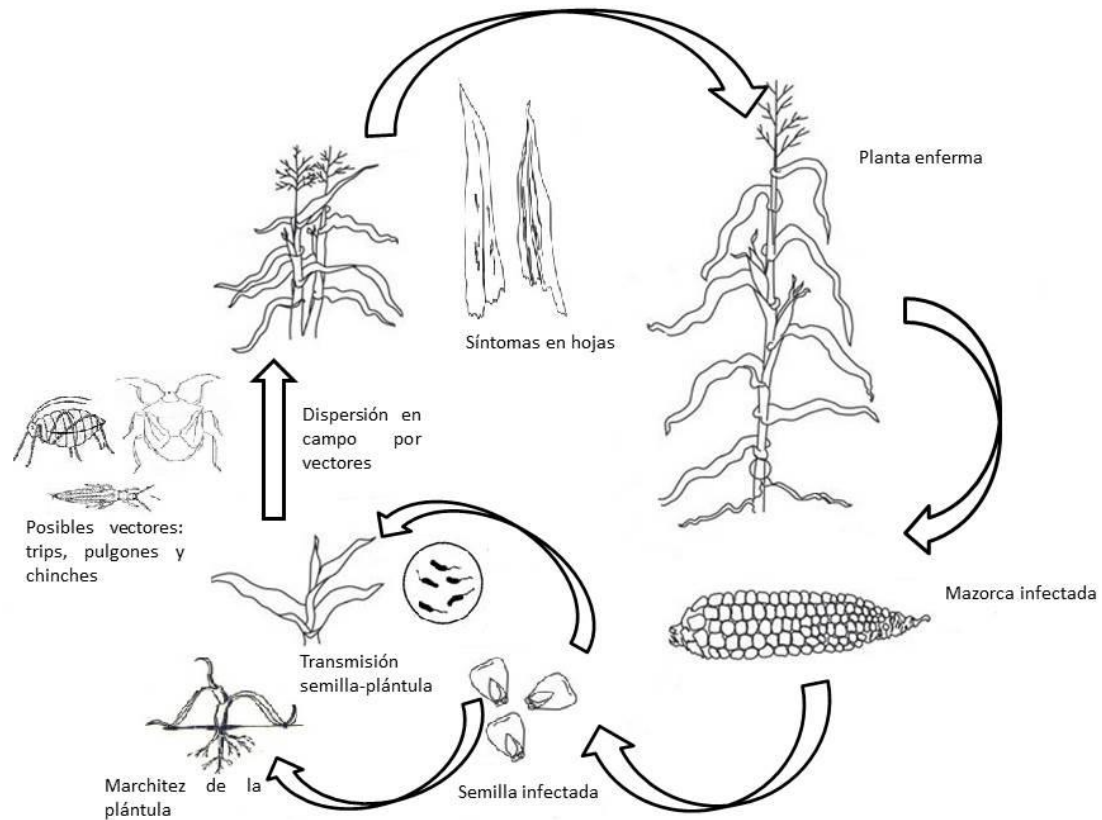


Figura 1. Ciclo de la enfermedad ocasionada por *Pantoea agglomerans* en maíz que inicia con la semilla infectada.

1.3.6. Distribución espacial y temporal

El estudio espacio-temporal de las enfermedades proporciona información sobre su dinámica en una población de plantas que puede ser importante para desarrollar planes de muestreo más precisos, optimizar y dirigir el control, cuantificar efectos ambientales y para realizar estudios de regionalización (Campbell and Madden, 1990).

El ambiente atmosférico y el suelo son elementos modificadores importantes del desarrollo de las enfermedades pues afectan la actividad del patógeno o la fisiología de la planta hospedante. Las variables climáticas de interés en la epidemiología de las

enfermedades de las plantas incluyen la temperatura, humedad relativa, radiación y velocidad y dirección del viento. Cada una de ellas ya sea individualmente o interactuando con otras puede tener influencia sobre el inicio y progreso de una epidemia (Rotem, 1978; Madden *et al.*, 2007).

El progreso temporal de *P. agglomerans* en maíz no ha sido determinado, no obstante, en bacterias del género *Pantoea* en maíz, Liu (2010) encontró que el mejor modelo que se ajusta a la enfermedad es el exponencial. En cuanto a la distribución espacial, reporta un patrón aleatorio en la distribución de *P. stewartii* en maíz, lo cual se explica por la adquisición del insecto vector.

1.4. Manejo de la enfermedad

Las prácticas de exclusión mediante cuarentenas y producción de semillas en regiones semiáridas son medidas que tienen cierto grado de efectividad en el control de enfermedades bacterianas transmitidas por semilla (Gitaitis and Walcott, 2007).

Si bien *P. agglomerans* se transmite por semilla, en la lista de patógenos regulados en el mundo, aparece solo para la India (Mezzalama, 2012). En este tipo de enfermedades las estrategias de control de este patógeno deben centrarse en el manejo de los lotes de producción de semilla. McGee (1995) sugiere tomar medidas para eliminar las fuentes de inóculo, manejar la enfermedad durante la anthesis y durante el desarrollo y madurez de la semilla.

Las medidas de control para la eliminación del patógeno pueden ser prácticas culturales, tratamiento físico y químico. En el caso de las prácticas culturales se recomienda el uso de semillas libres de la bacteria, eliminar malezas hospedantes y

plantas enfermas, rotar cultivos y evitar sobre riego. El tratamiento a la semilla con agua a 50°C reduce los niveles de infección; en plántulas (Hui-Ying *et al.*, 2011).

Con relación al control químico Mudryk (2012) encontró resistencia en cuatro cepas a cuatro de siete antibióticos lo cual hace necesaria una búsqueda constante de agentes antimicrobianos naturales y bioplaguicidas que no afecten el entorno y controlen las enfermedades. En el caso de *P. agglomerans* se ha demostrado la actividad antimicrobiana *in vitro* de 100 aceites esenciales (Chudasama and Thaker, 2014). Por otro lado, el mejoramiento genético para la resistencia a enfermedades se considera como el método de control más importante (Trigiano *et al.*, 2008), aunque para *P. agglomerans* no se han desarrollado genotipos resistentes.

Literatura citada

- Achicanoy-López, H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 53: 941-968.
- Agarwal, V. K., and Sinclair J. B. 1996. Principles of Seed pathology 2nd edition CRC Press USA 539 p.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elseiver Academic Press USA. 922 p.
- Aini, L. Q., Suryani, L., Sugiharto, A. N., and Abadi, A. L. 2013. Identification of bacterial wilt and leaf blight disease on maize (*Zea mays*) found in Kediri, Indonesia. Agrivita 35: 1-7.
- Alippi, A. M., and López, A. C. 2010. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. Plant Dis. 94: 487.
- Barash, I., and Manulis-Sasson, S. 2007. Virulence mechanisms and host specificity of

- gall-forming *Pantoea agglomerans*. Trends Microbiol. 15: 538–545.
- Bebber, D. P. 2015. Range-expanding pests and pathogens in a warming world. Annu. Rev. Phytopathol. 53: 335–356.
- Block, C. C.; Hill, J. H., and McGee, D. C. 1999. Relationship between late-season severity of Stewart's bacterial wilt and seed infection in maize. Plant Dis. 83: 527–530.
- Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons. New York. 532 p.
- Chudasama, K. S., and Thaker, V. S. 2014. Biological control of phytopathogenic bacteria *Pantoea agglomerans* and *Erwinia chrysanthemi* using 100 essential oils. Arch. Phytopathology and Plant Protect. 47: 2221-2232.
- Cruz, A. T., Cazacu, A. C., and Allen, C. H. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. J. Clin. Microbiol. 45: 1989-1992.
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M. and Milanowski, J. 2016a. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. Ann. Agric. Environ. Med. 23: 197–205.
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., and Milanowski, J. 2016b. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. Ann. Agric. Environ. Med. 23: 206-222.
- Dutta, B., Barman, A. K., Srinivasan, R., Avci, U., Ullman, D. E., Langston, D. B., and Gitaitis, R. D. 2014. Transmission of *Pantoea ananatis* and *P. agglomerans*, causal agents of center rot of onion (*Allium cepa*), by onion thrips (*Thrips tabaci*) through feces. Phytopathology 104: 812-819.

- Edens, D. G., Gitaitis, R. D., Sanders, F. H., and Nischwitz, C. 2006. First report of *Pantoea agglomerans* causing a leaf blight and bulb rot of onions in Georgia. Plant Dis. 90: 1551.
- Esteva, G. y Marielle, C. 2003. Sin maíz no hay país. CONACULTA.
- FAOSTAT. 2016. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S>.
- Feng, Y., Shen, D. and Song, W. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. J. Appl. Microbiol. 100: 938-945.
- Frederickson, D. E., Monyo, E. S., Odvody, G. N., and King, S. B. 1997. A disease of pearl millet in Zimbabwe caused by *Pantoea agglomerans*. Plant Dis. 81: 959
- Fucikovsky, L., Moreno, M. y Téliz, D. 1972. Datos preliminares sobre la bacteriosis de maíz en el Valle de Toluca. Agrociencia 9: 55-68.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, C., Kersters, K., and De Ley, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Bierjerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 9: 337-345.
- Gitaitis, R. and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 45: 371–397
- González, A. D., Franco, M. A., Contreras, N., Galindo-Castro, I., Jayaro, Y., and Graterol, E. 2015. First report of *Pantoea agglomerans* causing rice leaf blight in Venezuela. Plant Dis. 99: 552.
- Goszczyńska, T., Botha, W. J. Venter, S. N., and Coutinho, T. A. 2007. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. Plant Dis. 91: 711-718.

- Grimont, P. A. and Grimont, F. 2015. *Pantoea*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria 1–14.
- Hui-Ying, C., Hong-Jie, L., Zhen-Dong, Z., and Xiao-Ming, W. 2011. Seed transmission of *Pantoea agglomerans* causal agent of dry stalk rot in maize. Acta Phytophylacica Sinica. 38: 31-36.
- Jiménez, O., Contreras, N., y Rodríguez, C. 2007. Identificación y caracterización de *Pantoea agglomerns* aislada en plantas de gloxinia (*Gloxinia alba*). Bioagro 19: 53-57.
- Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A. y Bye, R. A. 2009. Origen y deversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 116p.
- Krawczyk, K., Kamasa, J., Zwolinska, A., and Pospieszny, H. 2010. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. Journal of Plant Pathology. 92: 807-811.
- Lafitte, H. R. 1993. Identificación de problemas en la producción de maíz tropical. Guía de campo. México, D.F.: CIMMYT.
- Lana, U. G. D. P., Gomes, E. A., Silva, D. D., Costa, R. V., Cota, L. V., Parreira, D. F., Souza, I. R. P., and Guimarães, C. T. 2012. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with white spot disease in maize, sorghum and crabgrass in Brazil. J. Phytopathology 160: 441–448.
- Lauzon, C. R., Mccombs, S. D., Potter, S. E., and Peabody, N. C. 2009. Establishment and vertical passage of *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* and *Klebsiella*

- pneumoniae* through all life stages of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 102: 85-95.
- Liu, L. 2010. Quantifying the aggressiveness, temporal and spatial spread of *Pantoea stewartii* in sweet corn. Graduate Theses and Dissertations. Master of Science. Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Lu, B. H., Jia, M. J., and Gao, J. 2015. First report of *Pantoea agglomerans* causing bacterial leaf blight on *Vigna angularis* in Jilin Province, China. Plant Dis. 99: 1269.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F. 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. APS Press, St. Paul, MN
- McGee, D. C. 1995. Epidemiological approach to disease management through seed technology. Ann. Rev. Phytopathol. 33: 445-466.
- Medrano, E. G., and Bell, A. A. 2007. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. J. Appl. Microbiol. 102: 134-143.
- Medrano, E. G., Esquivel, J., Bell, A., Greene, J., Roberts, P., Bacheler, J., Marois, J., Wright, D., Nichols, R., and Lopez, J. 2009. Potential for *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) to transmit bacterial and fungal pathogens into cotton bolls. Curr Microbiol. 59: 405-412.
- Mezzalama, M. 2012. Seed Health: Fostering the Safe Distribution of Maize and Wheat Seed: General guidelines. Third edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Michener, P. M., Pataky, J. K., and White, D. G. 2002- Rates of transmitting *Erwinia stewartii* from seed to seedlings of a sweet corn hybrid susceptible to Stewart's wilt. Plant Dis. 86: 1031–1035.

- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D. L. Valadez-Moctezuma, E., Alarcón-Zúñiga, B., Zelaya-Molina, L. X., Córdova-Téllez, L., Mendoza-Onofre, L., Vaquera-Huerta, H., Carballo-Carballo, A., Farfán-Gómez, A., and Ávila-Quezada, G. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Dis.* 91: 1365.
- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D. L., Carballo-Carballo, A., and Cordova-Téllez, L. 2004. Spatio-temporal analysis of Stewart's wilt of corn caused by *Pantoea stewartii* in Mexico. *Phytopathology* 94: S72.
- Mudryk, M. R. 2012. Plant-Isolated *Pantoea agglomerans* – new look into potential pathogenicity. *Мікробіологічний журнал* 74: 53-57.
- Munkvold, G. P., and White, D. G. 2016. *Compendium of Corn Diseases*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 165 p.
- Nadarasah, G., and Stavrinides, J. 2014. Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium *Pantoea* using plant and insect hosts. *Microbiology* 160: 602–615.
- Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pest. *J. Agric. Sci.* 144: 31-43.
- Ortega-Coronado, A., Guerrero-Herrera, M. J. y Preciado-Ortiz, R. E. 2013. *Diversidad y distribución del maíz nativo y sus parientes silvestres*. INIFAP, México. 263 p.
- Paliwal, R. 2001. *El maíz en los trópicos*. FAO.
- Palmer, M., de Maayer, P., Poulsen, M., Steenkamp, E. T., van Zyl, E., Coutinho, T. A., and Venter, S. N. 2016. Draft genome sequences of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea vagans* isolates associated with termites. *Stand. Genomic Sci.* 11: 23.

- Pataky, J., and Ikin, R. 2003. Pest Risk Analysis: The risk of introducing *Erwinia stewartii* in maize seed. Nyon: The International Seed Federation.
- Pérez-y-Terrón A., Villegas, M. C., Cuellar, A. B. C. 2009. Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize in Mexico. Aust. Plant Dis. Not. 4: 96–99.
- Programa de Maíz del CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F.: CIMMYT.
- Quecine M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B. , Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P. T., Mondin, M., Azevedo, J. L., and Pizzirani-Kleiner, A. A. 2012. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. Appl. Environ. Microbiol. 78: 7511–7518.
- Quiroga-Madrugal, R. R. 1995. Enfermedades del maíz en algunas regiones tropicales de México, con énfasis en el estado de Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas. 116 p.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P. and Garcia-Casal, M. N. 2014. Global maize production, utilization, and consumption. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1312: 105–112.
- Rodríguez, M., Matehus, J., Gerstl, A. y Santana, M. A. 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). Interciencia 33: 537-541.
- Romeiro, R. S., Macagnan, D., Mendonça, H. L., and Rodrigues-Neto, J. 2006. Bacterial spot of Chinese taro (*Alocasia cucullata*) in Brazil induced by *Pantoea agglomerans*. Plant Pathol. 56: 1038.
- Rotem, J. 1978. Climate and Weather influence on epidemics. Plant Disease, Vol. 2: How disease develops in population (J.G. Horsfall and A.E. Dimond, eds) Academic, New York. Pp 317-436.

- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Atlas Agroalimentario México 2014. SAGARPA. México. 196 p.
- Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed. Minnesota, EE.UU. APS Press. 158 pp.
- Silva-Rojas, H. V., Mahuku G., and Esker, P. D. 2010. *Pantoea agglomerans*, a maize seed transmitted bacterium in Mexico. *Phytopathology* 100: S119.
- Stewart, F. C. 1897. A bacterial disease of sweet corn. *NY State Agric. Exp.* 130: 422–439.
- Thai Agricultural Standard. 2008. Diagnostic protocols for *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* bacterial wilt of maize. National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards. Ministry of Agriculture and Cooperatives. Thailand. 14 p.
- Trigiano, R. N., Windham, M. T., and Windham, A. S. 2008. *Plant Pathology: Concepts and Laboratory exercises*. 2nd Edition. CRC Press. USA. 558 p.
- Vorwerk, S., Martinez-Torres, D., and Forneck, A. 2007. *Pantoea agglomerans*-associated bacteria in grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch). *Agric. For. Entomol.* 9:57–64.
- Yang, K. Q., Qu, W. W., Liu, X., Liu, H. X., and Hou, Q. 2011. First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. *Plant Dis.* 95:773.
- Walterson A. M., and Stavrínides, J. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Rev.* 39: 968-984.

CAPÍTULO II

Identification of Causal Agent of Chlorotic Streaks and Vascular Wilt in Maize using polyphasic approaches

Abstract

In a 3-year field breeding experiment (2003 to 2006), chlorotic streaks and vascular wilt symptoms were frequently observed in plots of maize crop in Montecillo and Tecamac, Mexico. To identify and characterize the causal agent of these symptoms, isolations were conducted in CPG medium. 12 isolates were characterized through physiological and biochemical tests with API 50 CHE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). For DNA analysis, 1.4-kbp fragments of the 16S rRNA gene were amplified with primer set 8F/1492R and sequenced with universal primers U514F/ 800R. Five sequences were obtained and deposited in GenBank. A phylogenetic tree was constructed. Pathogenicity of the 12 isolates was confirmed in maize seedlings. In addition, the 12 isolates were infiltrated at 10^7 CFU mL⁻¹ into tobacco leaves, those displayed a hypersensitive response. Isolates were reisolated and DNA analysis did done. All bacterial colonies isolated in CPG medium were yellow and the isolates were nonfluorescent on King's B medium. The physiological and biochemical tests revealed characteristics of *Pantoea agglomerans*. Results of the phylogenetic analysis grouped the species *P. ananatis*, *P. stewartii*, and *P. agglomerans* into three clusters. The five unknown sequences were grouped into the *P. agglomerans* cluster. There was a 98 to 99% similarity of the five 16S rDNA sequences with *P. agglomerans* strain type ATCC 27155. Pathogenicity test show that all test strains developed symptoms. The hypersensitive response indicating the presence of the type III secretion system. 16S

rDNA gene fragments of the reisolates were 100% similar to their original isolate sequences.

Additional Keywords: *Pantoea agglomerans*, isolate, pathogenicity, 16S rDNA

Introduction

Maize is an important crop for animal and human nutrition worldwide. In Mexico, maize is produced in the most varied climates and latitudes and has been given the most diverse uses: food, industrial, commercial, medical, religious, artistic and scientific. However, there are many factors that influence the productivity of maize, among which the soil fertility, climate, pests, weeds and diseases are the most important. So that, in The Central Highland Valley of Mexico, this crop is extremely important, and research is aimed toward increasing yield, disease resistance, and crop adaptation from 1,900- to 2,700-m elevation.

Respect to disease, Munkvold and White (2016) describe about 80 diseases of which more than 50% are caused by fungi. The CIMMYT Maize Program (2004) reports 58 pathogens most important for maize in Mexico of which 43 are fungi, 10 virus, three bacteria, a phytoplasma and a spiroplasma. The most important and common maize bacterial diseases is bacterial leaf blight and wilt.

A bacterial disease of maize was reported in Mexico by Elliot in 1938. Since then the disease has been reported in several locations as Stewart's bacterial wilt caused by *Pantoea stewartii* (Fucikovsky *et al.*, 1972; Valencia-Torres *et al.*, 2004; Morales-Valenzuela *et al.*, 2004). However, the symptoms in leaves are pale green to yellow streaks with irregular margins running parallel to the veins, streaks dry out and turn

brown. Infection may move into the stem, causing a general stunting, wilting, and plant death.

However, the identification of causal agent has been based on symptomatology, different phenotypic characters and biochemical tests so these methods may be uncertain. Other hand, 16S rRNA gene sequences allow bacterial identification that is more robust, reproducible, and accurate than that obtained by phenotypic testing (Clarridge, 2004).The objective of the present work was to determine the causal agent of chlorotic streak and vascular wilt in maize through polyphasic approaches.

Materials and Methods

Isolation and characterization

A total of 22 isolates were obtained of maize leaves showing chlorotic streak symptoms. Leaf sections of 1 cm² of diseased plant were disinfested, placed on casamino acid-peptone-glucose (CPG) medium (Shaad *et al.*, 2001), and incubated at 28°C. After 48 h 12 isolates suspected to be *Pantoea* spp. were selected for further characterization. For the biochemical characterization each colony was evaluated according to the API 50CHE profile index (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The systems were incubated at 35°C and all reactions were read after 24 h. Results of affirmative or negative tests were recorded and interpreted according to the manufacturer's directions.

PCR amplification

PGHLT1, PGHL6, PGHL10, PGHL22 and PGHLT4 strains were selected for the 16S rRNA gene sequence. 1.4-kbp fragments of the 16S rRNA gene were amplified with

primer set 8F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Sasoh *et al.*, 2006) and sequenced with universal primers U514F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3-) and 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') (Anzai *et al.*, 2000). A phylogenetic tree was constructed using the UPGMA method (Mega version 3.1) including species of the genus *Pantoea* and *Erwinia* with available sequences.

Pathogenicity test

Pathogenicity of the 12 isolates was evaluated by injecting 10^8 CFU mL⁻¹ of inoculum into stems of 3-week-old maize cv. Triunfo seedlings in the greenhouse at 28°C and 80% of relative humidity. Seedlings were inoculated with water, nonpathogenic isolates of *P. agglomerans* from maize (GM13 and HLA1), and not inoculated as negative controls. Three replications were included for each isolate and control. Isolates were reisolated and DNA analysis was done as mentioned previously.

Hypersensitivity reaction on tobacco plants

The 12 isolates were infiltrated at 10^7 CFU mL⁻¹ into tobacco leaves and plants were kept at 28°C. Control leaves were infiltrated with sterile distilled water.

Results

Characterization of the pathogen

In CPG only yellow colonies were observed and the isolates were nonfluorescent on King's B medium. Physiological and biochemical tests (API 50 CHE) showed that all isolates had characteristic resembling *P. agglomerans* described by Schaad *et al.* (2000). All isolates were negative for gelatin hydrolysis, indole production, acid production from raffinose and positive for utilization of glycerol, D-glucose, mannitol,

arbutine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, melibiose, D-fucose, and D-arabitol; all characteristics of *Pantoea agglomerans*.

PCR amplification

Five sequences were obtained and deposited in GenBank (Accession Nos. EF050806 to EF050810). In all cases the expected amplicon was obtained. Results of the phylogenetic analysis grouped the species *P. ananatis*, *P. stewartii*, and *P. agglomerans* into three clusters. The five unknown sequences were grouped into the *P. agglomerans* cluster (Figure 1). There was a 98 to 99% similarity of the five 16S rRNA gene sequences with *P. agglomerans* strain type ATCC 27155.

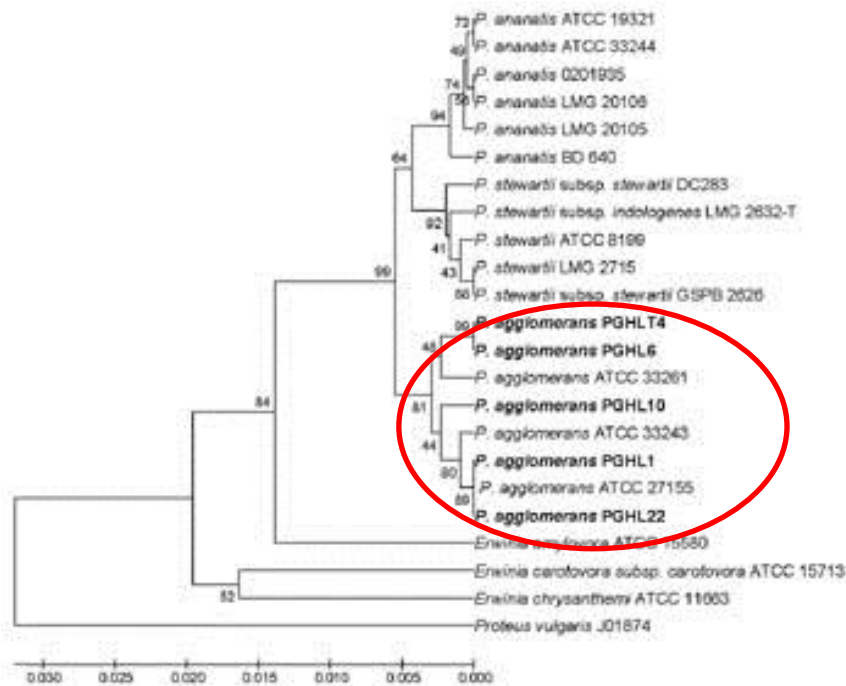


Figure 1. Phylogenetic tree constructed with a UPGMA method using MEGA 3.1 program with a bootstrap analysis based on 5,000 resamplings. PGHLT1, PGHL6, PGHL10, PGHL22 and PGHLT4

Pathogenicity test

Pathogenicity test show that all test strains developed water-soaked lesions on young leaves at 8 days postinoculation and were followed by chlorotic to straw-colored leaf streaks and then leaf blight symptoms at 3 weeks postinoculation (Figure 2). All negative control seedlings did not develop symptoms. 16S rRNA gene fragments of the reisolates were 100% similar to their original isolate sequences.

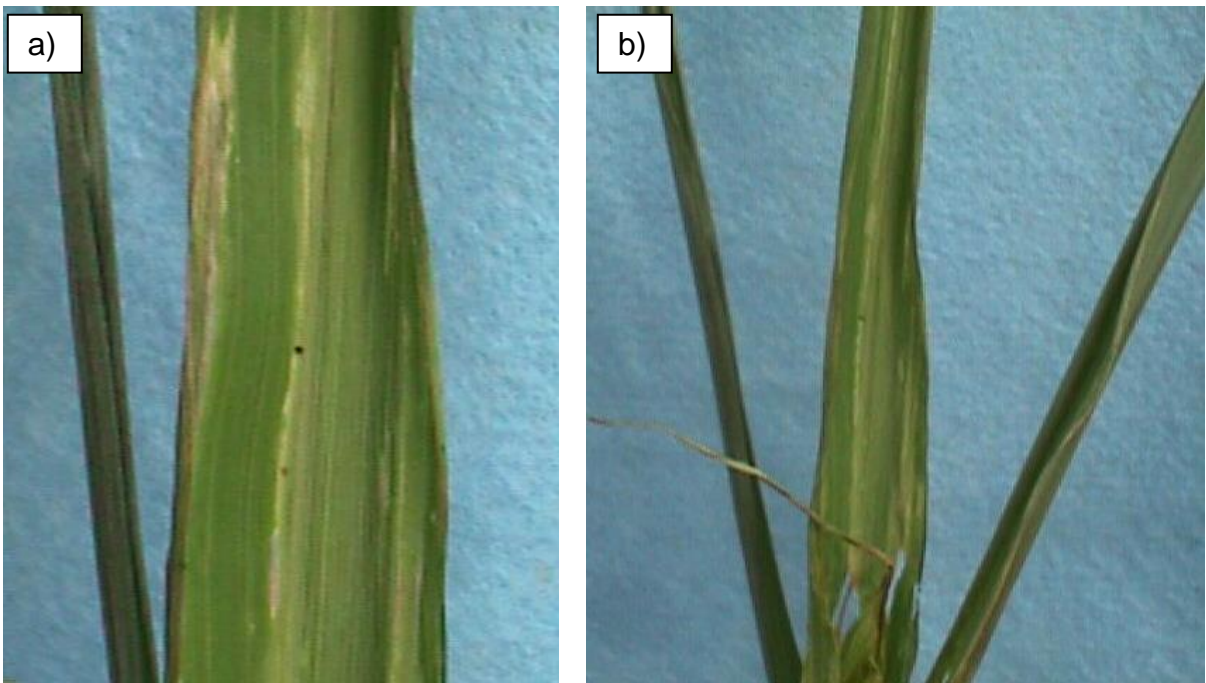


Figure 2. Symptoms on the pathogenicity test in maize leaf (cv. Triunfo) inoculated with *Pantoea agglomerans* strain PGHL-M1. a) leaf blight b) wilt plant.

Hypersensitivity reaction on tobacco plants

Tobacco leaves displayed an hypersensitive response at 4 days after inoculation indicating the presence of the type III secretion system (Alfano and Collmer, 2004).

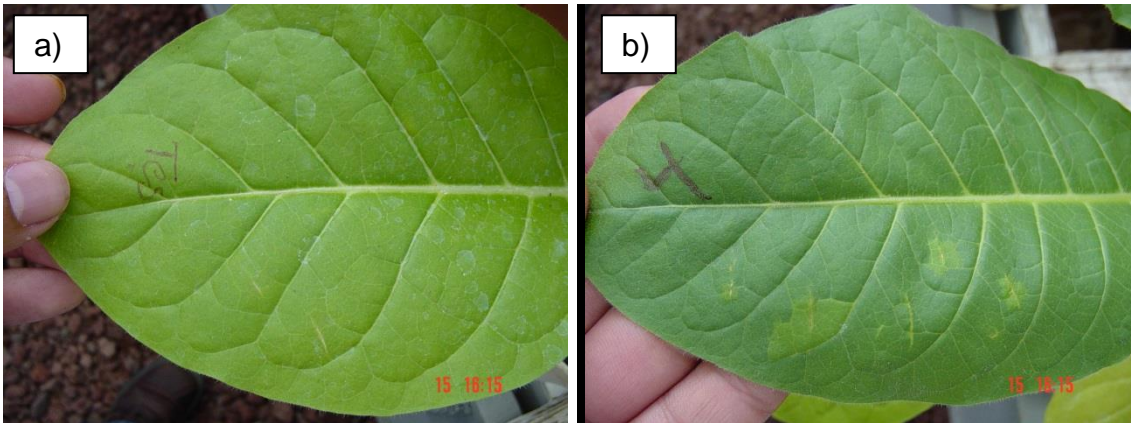


Figure 3. Hypersensitive response in tobacco leaves. a) control leaf. b) inoculated leaf.

Discussion

The chlorotic streaks and vascular wilt disease on maize in Central Highland Valley of Mexico is caused by *P. agglomerans*. This is the first report of *P. agglomerans* in México. Other authors reported to *Pantoea stewartii* in several locations (Fucikovsky *et al.*, 1972; Valencia-Torres *et al.*, 2004). However, the identification of causal agent has been based on symptomatology, different phenotypic characters and biochemical tests. Further, immuno-PCR technique has been used for detection *P stewartii* of maize seed imported from the USA (Rocha-Revilla *et al.*, 2009)

These results are consistent with those found by others authors who have reported that the bacteria recently to affect other crops, including onion in the United States (Edens *et al.*, 2006), chinese taro in Brazil (Romeiro *et al.*, 2007), walnut and red adzuki bean in China (Yang *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2015) and rice in Venezuela (González *et al.*, 2015); moreover, Goszczyńska *et al.* (2007) reported *P. agglomerans* causing brown stalk rot of maize in South Africa. However, these results differ from those found

by Aini *et al.* (2013), who reported that the similarity percentages were too low to conclude that the bacteria were similar to *P. agglomerans*.

Further, recent studies show a significant increase in the number of plant pathogenic bacteria affecting maize, among which the genus *Pantoea*. For example Nadarasah and Stavrinides (2014) found that 115 isolates of 11 species of *Pantoea* inoculated into corn seedlings had the capacity to develop. Which suggest that is necessary to use methods more adequate for identification. Rezzonico *et al.* (2009) said that specific gene sequences (such as *gyrB* rather than 16S rDNA) are more robust than biochemical identification regarding *P. agglomerans*.

The results suggests that the chorotic streak and vascular wilt disease on maize in Central Highland Valley of Mexico was not caused by *P. stewartii*. Physiological and biochemical characters and 16S rRNA analysis showed that the bacteria resembled *P. agglomerans*. This is important because *P. stewartii* is restricted by quarantine rule in Mexico. Moreover, *P. agglomerans* has a high rate of seed transmission (Silva-Rojas *et al.*, 2010; Hui-Ying *et al.*, 2011), which involves a risk of spread of this pathogen since this is not regulated.

Conclusion

This is the first report of *P. agglomerans* associated with chorotic streak and vascular wilt symptoms in maize in the Central Highland Valley of Mexico. Since *P. agglomerans* is a bacteria widely distributed in the world with high rates of seed transmission, further research on the epidemiology is necessary to develop strategies to manage the disease. Also it required to distinguish between benefic and pathogenic strains.

References

- Aini, L. Q., Suryani, L., Sugiharto, A. N., and Abadi, A. L. 2013. Identification of bacterial wilt and leaf blight disease on maize (*Zea mays*) found in Kediri, Indonesia. *Agrivita* 35: 1-7.
- Alfano, J., and Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385-414.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., and Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563-1589.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 840–862.
- Edens, D. G., Gitaitis, R. D., Sanders, F. H., and Nischwitz, C. 2006. First report of *Pantoea agglomerans* causing a leaf blight and bulb rot of onions in Georgia. *Plant Dis.* 90: 1551.
- Elliott, C. 1938. Bacterial wilt of sweet corn in Mexico. *Phytopathology* 28: 443-444.
- Fucikovsky, L., Moreno, M. y Téliz, D. 1972. Datos preliminares sobre la bacteriosis de maíz en el Valle de Toluca. *Agrociencia* 9: 55-68.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, C., Kersters, K., and De Ley, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Bierjerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 9: 337-345.

- González, A. D., Franco, M. A., Contreras, N., Galindo-Castro, I., Jayaro, Y. and Graterol, E. 2015. First report of *Pantoea agglomerans* causing rice leaf blight in Venezuela. *Plant Dis.* 99: 552.
- Goszczyńska, T., Botha, W. J. Venter, S. N. and Coutinho, T. A. 2007. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. *Plant Dis.* 91: 711-718.
- Hui-Ying, C., Hong-Jie, L., Zhen-Dong, Z., and Xiao-Ming, W. 2011. Seed transmission of *Pantoea agglomerans* causal agent of dry stalk rot in maize. *Acta Phytopythologica Sinica.* 38: 31-36.
- Lu, B. H., Jia, M. J., and Gao, J. 2015. First report of *Pantoea agglomerans* causing bacterial leaf blight on *Vigna angularis* in Jilin Province, China. *Plant Dis.* 99: 1269.
- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D. L., Carballo-Carballo, A., and Cordova-Téllez, L. 2004. Spatio-temporal analysis of Stewart's wilt of corn caused by *Pantoea stewartii* in Mexico. *Phytopathology* 94: S72.
- Munkvold, G. P., and White, D. G. 2016. *Compendium of Corn Diseases*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 165 p.
- Nadarasah, G., and Stavrinides, J. 2014. Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium *Pantoea* using plant and insect hosts. *Microbiology* 160: 602–615.
- Rezzonico, F., Smits, T. H., Montesinos, E., Frey, J. E., and Duffy, B. 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiol.* 9: 204-221.

- Rocha-Revilla, J. C Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C. N., Ramírez-Ramírez, E. y Lara-Victoriano, F. 2009. Detección de *Pantoea stewartii* mergaert, Verdonck & Kersters directamente de la semilla de maíz utilizando inmuno-PCR. Universidad y Ciencia 25: 245-252.
- Romeiro, R. S., Macagnan, D., Mendonça, H. L., and Rodrigues-Neto, J. 2006. Bacterial spot of Chinese taro (*Alocasia cucullata*) in Brazil induced by *Pantoea agglomerans*. Plant Pathol. 56: 1038.
- Sasoh, M., Masai, E., Ishibashi, S., Hara, H., Kamimura, N., Miyauchi, K., and Fukuda, M. 2006. Characterization of the terephthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1825.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edn. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Silva-Rojas, H. V., Mahuku G., and Esker, P. D. 2010. *Pantoea agglomerans*, a maize seed transmitted bacterium in Mexico. Phytopathology 100: S119
- The CIMMYT Maize Program. 2004. Maize Diseases: A Guide for Field Identification. 4th edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Valencia-Torres, N., Mezzalama, M., Leyva-Mir, S. G., y Jeffers, D. P. 2004. Detección de la marchitez bacteriana del maíz, *Pantoea stewartii* (Smith) Mergaert, Verdonck y Kersters, en el Valle Central de México. Rev. Mex. Fitopatol. 22: 308-314.
- Yang, K. Q., Qu, W. W., Liu, X., Liu, H. X., and Hou, Q. 2011. First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. Plant Dis. 95: 773.

CAPÍTULO III

DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DEL ESTRIADO CLORÓTICO-Y MARCHITEZ DEL MAÍZ (*Pantoea agglomerans*)

Resumen. Se estudiaron los patrones de distribución espacial y temporal de la bacteriosis del maíz, causada por *Pantoea agglomerans* en los híbridos de maíz Triunfo y 9Bx52 infectados naturalmente. Las evaluaciones de la enfermedad fueron hechas durante tres meses a partir de la aparición de los primeros síntomas a los 48 días después de la siembra. La incidencia de la enfermedad fue similar en ambos genotipos (26.13 y 26.87% para el híbrido Triunfo y 9Bx5, respectivamente). Sin embargo, la severidad fue mayor en el híbrido Triunfo, aunque en ambos genotipos hubo infección sistémica desde el inicio de la enfermedad. Se encontró una correlación positiva significativa entre la incidencia y la temperatura. El área bajo la curva del progreso de la enfermedad no fue significativamente diferente entre los dos híbridos. El mejor modelo que describe el progreso de la enfermedad en ambos genotipos fue el monomolecular, mientras que el patrón espacial de la enfermedad fue agregado en Triunfo y aleatorio en 9Bx52.

Palabras claves adicionales: enfermedad, incidencia, severidad, epidemiología.

SPATIAL AND TEMPORAL DISTRIBUTION OF LEAF BLIGHT AND WILT OF MAIZE (*Pantoea agglomerans*) IN MONTECILLO, MEXICO

Abstract. The temporal and spatial patterns of bacteriosis of corn, caused by *Pantoea agglomerans*, were studied on two dent corn hybrids (Triunfo and 9Bx52) naturally

infected in Montecillo, Mexico. Disease assessments were made during three months after that first symptoms were appeared. Data of temperature and relative humidity were obtained from Meteorological Station in Montecillo. Incidence data sets were transformed and fitted to logistic, monomolecular and Gompertz models. The area under disease progress curves (AUDPC) were calculated with incidence data sets of two hybrids. The BBD program was used to calculate the index of dispersion. Disease incidences were 26.13% and 26.87% for Triunfo and 9Bx52, respectively; systemic infection was present since initial phase of disease. Temperature was significantly related to disease incidence. AUDPC was not significantly different between two hybrids. The best model that describes disease progress was monomolecular in both Triunfo and 9Bx52 hybrid. Tests of the index of dispersion indicated that the spatial pattern of bacterial wilt of corn was aggregated in Triunfo and random in 9Bx52. These result support the theory of seed transmission, provide relevant information on the importance of the disease in the State of Mexico and its epidemiology.

Additional keywords: AUDPC, incidence, severity, epidemiology.

INTRODUCCIÓN

El estriado clorótico y marchitez bacteriana del maíz (*Zea mays* L.) ocasionada por *Pantoea agglomerans* fue reportada por primera vez en México en 2007 en maíz y sorgo (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007).

P. agglomerans es una bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae y aunque se ha reportado como agente para el control biológico y promotor de crecimiento en algunos cultivos (Feng *et al.*, 2006; Dutkiewicz *et al.*, 2016b), es una bacteria fitopatógena que tiene una amplia gama de hospedantes. Se ha encontrado

en diferentes especies vegetales y en algunos casos se reporta como patógena de animales y humanos (Cruz *et al.*, 2007, Dutkiewicz *et al.*, 2016a).

P. agglomerans se ha reportado en *Pennisetum glaucum* (Frederickson *et al.*, 1997), *Allium cepa* (Edens *et al.*, 2006), *Oryza sativa* (González *et al.*, 2015), *Vigna angularis* (Lu *et al.*, 2015), *Juglans regia* (Yang *et al.*, 2011), *Dioscorea alata* (Rodríguez *et al.*, 2008), *Gossypium hirsutum* (Medrano and Bell, 2007), *Alocasia cucullata* (Romeiro *et al.*, 2007), *Gloxinia alba* (Jiménez *et al.*, 2007), *Zea mays* y *Sorghum vulgare* (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007).

La enfermedad en el maíz se caracteriza por causar estrías cloróticas con bordes irregulares y marchitez, los cuales se pueden observar desde los primeros estadios del desarrollo de las plantas y son influenciados por las condiciones ambientales favorables (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007).

Las semillas representan una de las principales fuentes de inóculo. Silva-Rojas *et al.* (2010) reportan índices de transmisión por semilla de hasta 26%, valor por encima de los reportados para otras especies del género *Pantoea*, mientras que Hui Ying *et al.*, (2011) reportan índices de transmisión de hasta 100% y señalan que *P. agglomerans* puede moverse de semilla inoculada a las hojas y a las semillas a través del sistema vascular de las plantas de maíz. Gitaitis and Walcott (2007) señalan que las bacterias fitopatógenas transmitidas por semilla son responsables de la reemergencia de enfermedades, su dispersión e introducción a nuevas zonas.

La epidemiología agrícola estudia los diversos factores que afectan el proceso y diseminación de las enfermedades en poblaciones de plantas cultivadas (Achicanoy-López, 2000) con el propósito de conocer el comportamiento de las enfermedades en tiempo y espacio, y el uso de esta información para diseñar estrategias de manejo

(Madden *et al.*, 2007). Jeger (2004) señala que la epidemiología y el manejo de las enfermedades son dos aspectos diferentes que deben estar unidos. Gitaitis and Walcott (2007) hicieron una amplia revisión de la epidemiología de las enfermedades ocasionadas por bacterias transmitidas por semilla; estos investigadores concluyen que se requiere más investigación especialmente para calcular los umbrales de infección

El estudio espacio-temporal de las enfermedades proporciona información sobre la dinámica de la enfermedad como base para desarrollar planes de muestreo más precisos, optimizar y dirigir el control, cuantificar efectos ambientales y para realizar estudios de regionalización. La descripción de la distribución espacial de patógenos y plantas enfermas es esencial para la modelación y simulación de epidemias, el diseño de experimentos y programas de muestreo, así como para su manejo (Campbell and Madden, 1990). Con base en lo anterior, se realizó la presente investigación con el propósito de conocer la incidencia y severidad así como determinar la distribución espacial y temporal del estriado clorótico y marchitez causada por *Pantoea agglomerans* en dos híbridos de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético. Se utilizaron semillas del híbrido comercial trilineal “Triunfo” y del híbrido experimental de cruza simple “9Bx52”, las cuales fueron sembradas en el campo experimental del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México en el ciclo primavera-verano 2003. Cada genotipo se sembró en una parcela de 24 m de ancho por 7 m de largo, obteniendo 30 surcos de 80 cm de ancho y 25 plantas por surco.

Evaluación de la enfermedad. A partir de la aparición de los primeros síntomas de estrías cloróticas con bordes irregulares y marchitez, se realizaron evaluaciones en las primeras hojas de la planta a intervalos semanales hasta la cosecha (del 10 de junio al 9 de septiembre de 2003).

La incidencia se determinó contando el número de plantas con síntomas y expresada en porcentaje. La severidad se evaluó utilizando la escala propuesta para *P. stewartii* por Suparyono y Pataky (1989) modificando la observación de los síntomas iniciales por tratarse de una infección natural. Esta escala se divide en dos tipos de infección (lesiones locales y lesiones sistémicas) y tiene 10 clases: 0= planta sana, lesiones locales: 1= <1%, 2= 1-3%, 3= 3-5%, 4= 5-15%, lesiones sistémicas: 5= 15-25%, 6= 25-50%, 7= 50-75%, 8= 75-90% y 9= >90% del área de la hoja clorótica o necrótica o marchitez de la planta.

Datos meteorológicos. Datos de velocidad del viento, precipitación, temperatura y humedad relativa se obtuvieron de la estación meteorológica del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. Se calcularon los promedios semanales de cada variable en cada evaluación.

Análisis de correlación. Se realizaron análisis de correlación lineal simple mediante el coeficiente de correlación de Pearson entre la incidencia y la severidad con las variables climáticas con el programa estadístico SAS versión 8.0 (SAS Institute, 1999). La incidencia fue transformada con la raíz cuadrada del arco seno para normalizar esta variable debido a su valor porcentual.

Análisis temporal. El progreso temporal de la enfermedad se caracterizó utilizando los datos de incidencia acumulada para obtener las curvas de progreso. Dichas curvas se ajustaron a los modelos epidemiológicos: logístico, monomolecular y Gompertz

mediante un análisis de regresión lineal simple con el programa estadístico SAS versión 8.0 (SAS Institute, 1999). La selección del mejor modelo se realizó con base en los estadísticos: coeficiente de determinación (R^2), cuadrado medio del error (CME), intercepto (β_0), pendiente (β_1) y desviaciones estándar del intercepto y pendiente.

La epidemia se determinó con el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), estimada con la ecuación propuesta por Campbell y Madden (1990):

$$ABCPE = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2][(X_{i+1} + X_i)]$$

Donde:

Y_i = proporción de la enfermedad en la i -ésima observación

X_i = tiempo en la i -ésima observación

n = número total de observaciones

Análisis espacial. La parcela se dividió en 40 cuadrantes con 18 plantas por cuadrante (tres surcos con seis plantas por surco) y se tomaron datos de incidencia de la enfermedad a intervalos semanales. Las distribuciones fueron ajustadas a una distribución beta binomial con el programa Beta Binomial Distribution (BBD) versión 1.3, usando el índice de dispersión (D), una medida del nivel de agregación, considerando que un valor $D > 1$ indica agregación (Madden and Hughes, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incidencia y severidad. Los síntomas aparecieron a los 48 días después de la siembra (dds) con una incidencia de 1.48% para Triunfo y 2.06% para 9Bx52 (Figuras 1 y 2). Al final del ciclo la incidencia fue de 26.13% en Triunfo y 26.87% en 9Bx52

(Figura 2). La incidencia absoluta presentó su máximo incremento a los 62 dds en Triunfo con 5.73% y a los 97 dds en 9Bx52 con 3.53% (Figura 3).



Figura 1. Síntomas en plantas de maíz del híbrido comercial Triunfo en Montecillo, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano 2003.

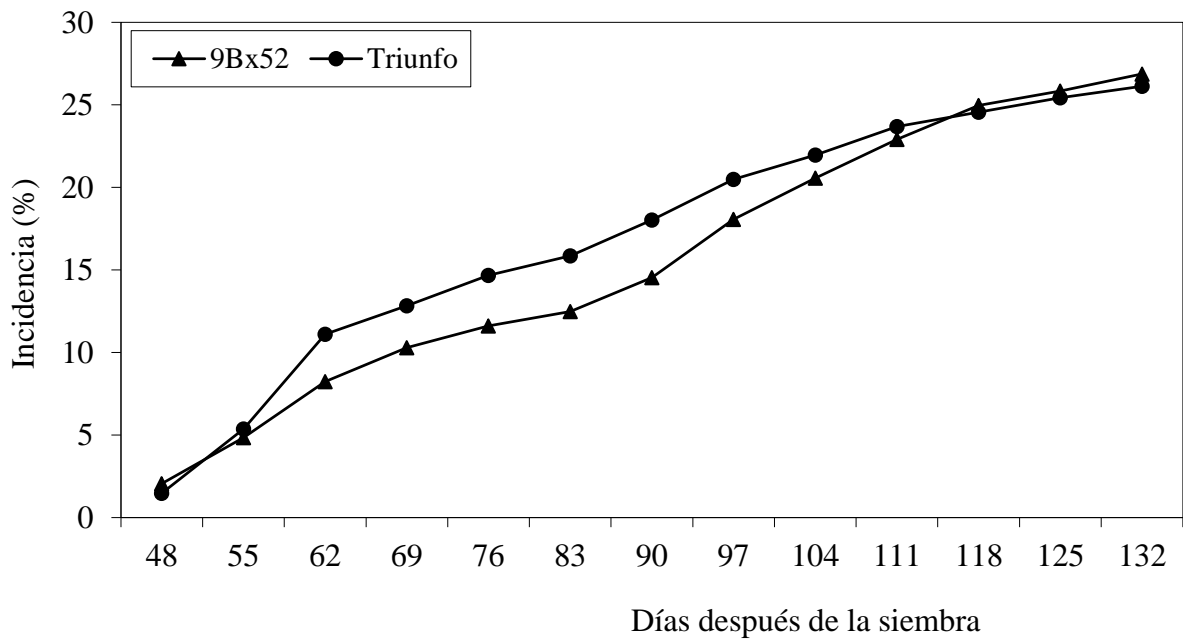


Figura 2. Curvas de progreso del estriado clorótico y marchitez bacteriana provocada por *Pantoea agglomerans* en dos híbridos de maíz en Montecillo, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano 2003.

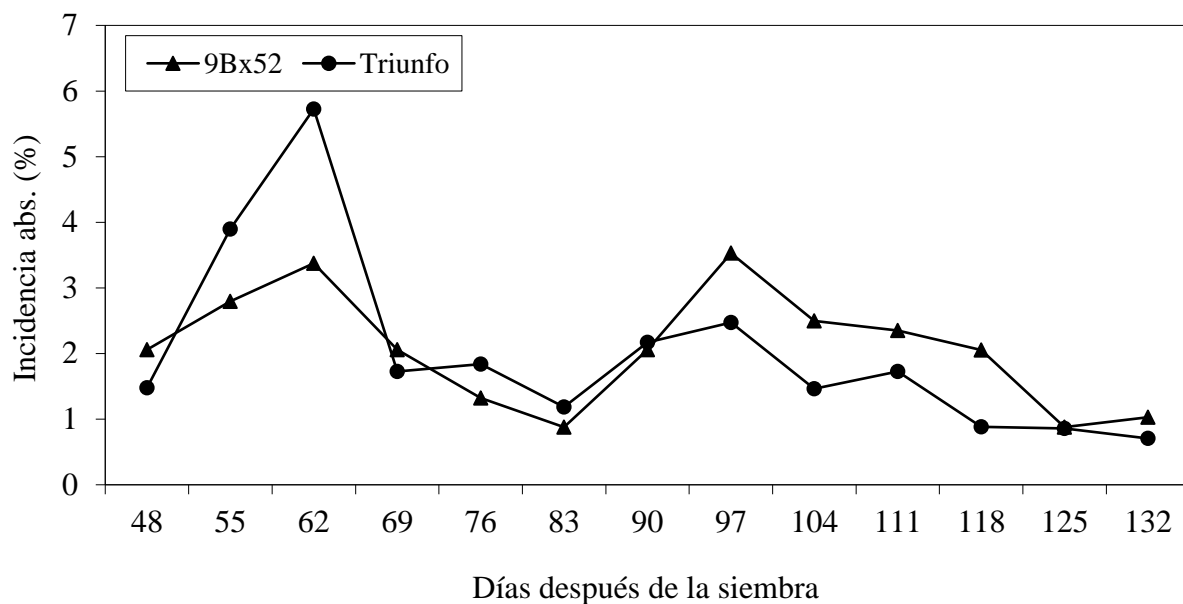


Figura 3. Incidencia absoluta del estriado clorótico y marchitez bacteriana causada por *Pantoea agglomerans* en dos híbridos de maíz en Montecillo, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano 2003.

La incidencia de infección sistémica fue de 3.58% en Triunfo y 2.64% en 9Bx52. La severidad fue mayor en Triunfo ya que en algunas fechas de muestreo se aproximó a la clase 4 (15% del área de la hoja infectada) (Figura 4). Sin embargo, en 9Bx52 la severidad se mantuvo entre las clases 2 y 3. Cabe señalar que hubo plantas de ambos híbridos que alcanzaron la clase 9 en las primeras fechas de muestreo.

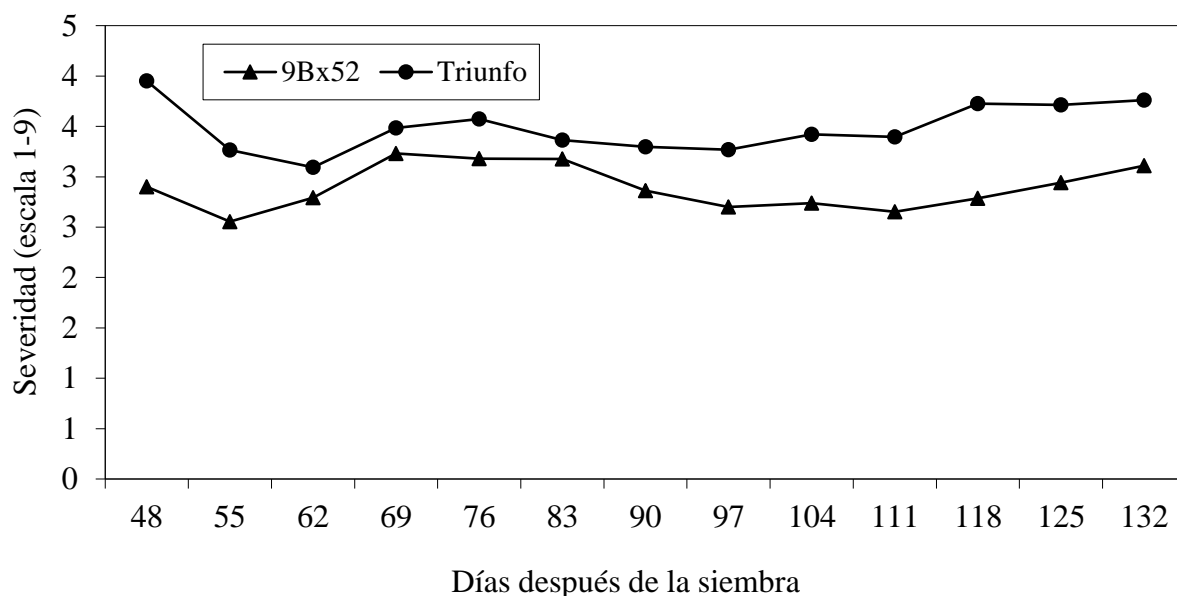


Figura 4. Severidad del estriado clorótico y marchitez bacteriana causada por *Pantoea agglomerans* en dos híbridos de maíz en Montecillo, Estado de México, durante el ciclo primavera-verano 2003.

La incidencia puede parecer baja en comparación con otras enfermedades bacterianas del maíz reportadas en la zona de estudio (Fucikovsky, 1972), sin embargo, el hecho de encontrar plantas con infección sistémica puede ser atribuido a la transmisión por semilla de *P. agglomerans*, señaladas por otros autores (Silva-Rojas *et al.*, 2010; Hui-Ying *et al.*, 2011) por lo que se considera que ésta fue la principal fuente de inóculo para el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, se desconoce el umbral de semillas infectadas para iniciar la enfermedad en campo (Gitaitis and Walcott, 2007).

Estudios de correlación. Se encontró una correlación negativa entre la incidencia absoluta y la severidad con $R=-0.834$ ($P=0.001$) en Triunfo y $R=-0.72$ ($P=0.012$) en 9Bx52. El análisis de correlación entre la incidencia y la severidad con los factores

climáticos presentes durante el desarrollo de este estudio (Figura 5 y 6) muestra que en Triunfo la temperatura fue el único factor que presentó una correlación significativa con el incremento absoluto de la enfermedad $R=0.67$ ($P=0.025$). Sin embargo, en 9Bx52 hubo correlación significativa entre la incidencia absoluta con la temperatura y humedad relativa máxima con $R=0.67$ ($P=0.024$) y $R=0.73$ ($P=0.01$), respectivamente. Además, la severidad se correlacionó negativamente con la temperatura con $R=-0.69$ ($P=0.02$).

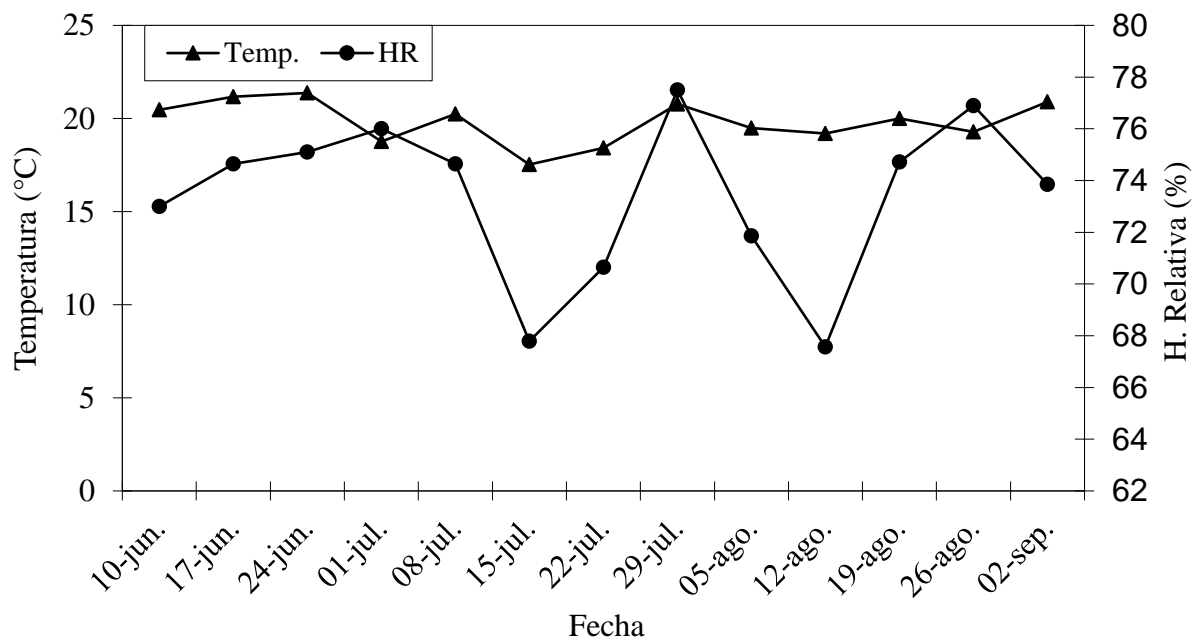


Figura 5. Temperatura y humedad relativa (promedios semanales) prevalcientes durante el periodo 10 de junio a 02 de septiembre de 2003 en Montecillo, Estado de México.

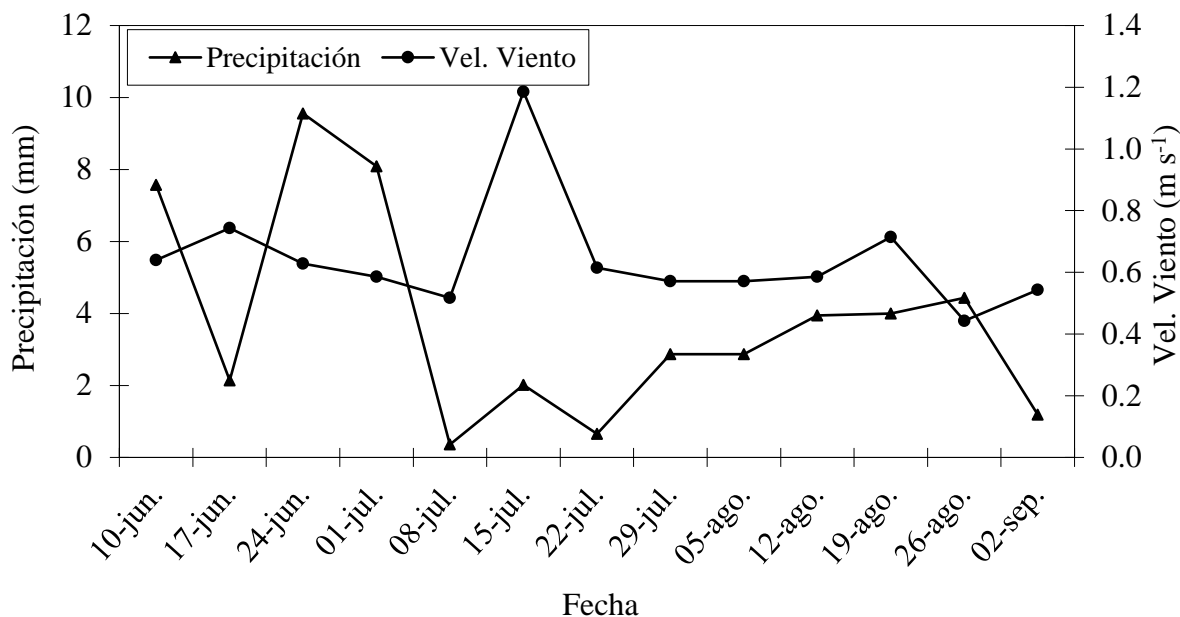


Figura 6. Precipitación y velocidad del viento (promedios semanales) prevalecientes durante el periodo 10 de junio a 02 de septiembre de 2003 en Montecillo, Estado de México.

La temperatura fue el único factor que se correlacionó positivamente con el cambio absoluto de la enfermedad en ambos híbridos, lo cual concuerda con lo señalado por Agrios (2005) y Trigiano *et al.* (2008) quienes señalan que las temperaturas y humedades altas son las que se relacionan con las enfermedades bacterianas. Además, Johnson *et al.* (2000) encontraron una correlación positiva entre la temperatura y la dispersión de una cepa benéfica de *P. agglomerans* en pera y manzana.

Progreso temporal. Las curvas de progreso de la enfermedad obtenidas con base en la incidencia acumulada en función del tiempo, fueron mejor descritas por el modelo monomolecular con $R^2 = 0.8996$ y 0.9492 para Triunfo y 9Bx52, respectivamente

(Cuadro 1). Por otro lado, el análisis del ABCPE no mostró diferencias entre los dos híbridos, con 1454.27 %-días para Triunfo y 1321.92 %-días para 9Bx52.

El hecho de que las curvas de progreso de la enfermedad fueran descritas por el modelo monomolecular, el cual es apropiado para las enfermedades denominadas monocíclicas (Campbell and Madden, 1990), diferencia de otros reportes para enfermedades bacterianas en maíz (Liu, 2010), esto se explica porque a medida que las plantas de maíz se acercaron a la senescencia hubo menos tejido para infectar y el incremento de la enfermedad fue más lento. Además, de que pudo haber sido influenciado por otros factores como la susceptibilidad y la cantidad de inóculo inicial, lo cual no fue medido en este estudio.

Cuadro 1. Resumen de los estadísticos utilizados en la evaluación de tres modelos de crecimiento para describir el progreso del estriado clorótico y marchitez bacteriana causada por *Pantoea agglomerans* en dos híbridos de maíz. Montecillo, Estado de México, 2003.

Modelo	Parámetros ^z						
	R ²	CME	β_0	S $_{\beta_0}$	β_1	S $_{\beta_1}$	P
Híbrido "Triunfo"							
Logístico	67.98	0.2797	-4.3303	0.3712	0.02827	0.003960	< .0001
Monomolecular	89.96	0.0009	-0.1067	0.0211	0.00331	0.000226	< .0001
Gompertz	78.75	0.0252	-1.6273	0.1113	0.01120	0.000119	< .0001
Híbrido "9Bx52"							
Logístico	82.00	0.1416	-4.5440	0.2641	0.02946	0.002818	< .0001
Monomolecular	94.92	0.0005	-0.1462	0.0158	0.00356	0.000168	< .0001

Gompertz 90.02 0.0117 -1.7394 0.0758 0.01190 0.000809 < .0001

$^2R^2$ = Coeficiente de determinación, CME= Cuadrado medio del error β_0 = Intercepto S_{β_0} = desviación estándar del intercepto β_1 = Pendiente S_{β_1} = desviación estándar de la pendiente y P= Probabilidad.

Distribución espacial. Los valores del índice de dispersión (*D*) en Triunfo estuvieron entre 0.97 y 1.66, y fueron significativos excepto los de 48, 55 y 90 dds (Cuadro 2). Sin embargo, los valores de *D* en 9Bx52 no fueron significativos y estuvieron entre 1.02 y 1.28 (Cuadro 2). Lo que es indicativo que en Triunfo se presentó un patrón agregado, mientras que 9Bx52 se presentó un patrón aleatorio de distribución de la enfermedad durante todas las fechas de muestreo. Además, en Triunfo la agregación incrementó con el tiempo al aumentar la incidencia.

Cuadro 2. Patrón espacial de la incidencia del estriado clorótico y marchitez bacteriana causada por *Pantoea agglomerans* en dos híbridos de maíz en Montecillo, Estado de México, 2003.

Híbrido	Días después de la siembra	Incidencia (%)	Índice de dispersión (D)	Probabilidad
Triunfo	48	1.48	1.20	0.187
	55	5.37	0.97	0.530
	62	11.10	1.47	0.029
	69	12.83	1.42	0.043
	76	14.67	1.49	0.025
	83	15.85	1.41	0.047

Híbrido	Días después de la siembra	Incidencia (%)	Índice de dispersión (D)	Probabilidad
	90	18.02	1.27	0.118
	97	20.49	1.37	0.063
	104	21.96	1.57	0.013
	111	23.68	1.63	0.008
	118	24.57	1.66	0.006
	125	25.42	1.56	0.014
	132	26.13	1.61	0.009
9Bx52	48	2.06	1.07	0.347
	55	4.85	1.04	0.410
	62	8.23	1.18	0.200
	69	10.29	1.22	0.167
	76	11.61	1.09	0.317
	83	12.49	1.02	0.440
	90	14.54	1.02	0.428
	97	18.07	1.06	0.364
	104	20.57	1.24	0.147
	111	22.92	1.11	0.292
	118	24.97	1.27	0.120
	125	25.85	1.28	0.112
	132	26.87	1.27	0.120

La distribución beta binomial provee un buen ajuste a la incidencia de enfermedades causadas por virus, hongos y bacterias (Madden and Hughes, 1995); sin embargo, de acuerdo al índice de dispersión en este estudio solo en Triunfo hubo ajuste a la distribución beta binomial. En el caso de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* en cebolla se reporta un mejor ajuste a la distribución beta binomial (Roumagnac *et al.*, 2004). En el híbrido Triunfo se mostró un patrón agregado y en 9Bx52 un patrón aleatorio (Cuadro 2). En campos de producción de semilla de cebolla se reporta un patrón agregado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii* (Humeau *et al.*, 2006), aunque Campbell y Madden (1990) mencionan que el patrón agregado está reportado en trabajos donde el vector es considerado importante en la dispersión de la enfermedad.

CONCLUSIONES

La incidencia de *P. agglomerans* fueron de 26.13% y 26.87% en los híbridos Triunfo y 9Bx52, respectivamente. En este estudio la temperatura fue factor importante en el desarrollo de la enfermedad. El progreso temporal de la enfermedad se ajustó al modelo monomolecular en ambos híbridos lo que nos indica una enfermedad monocíclica atribuida a que la fuente de inóculo primario puede ser la semilla. El patrón espacial de la enfermedad fue agregado en Triunfo y aleatorio en 9Bx52.

LITERATURA CITADA

- Achicanoy-López, H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 53: 941-968.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press USA. 922 p.
- Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons. New York. 532 p.
- Cruz, A. T., Cazacu, A. C. and Allen, C. H. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. J. Clin. Microbiol. 45: 1989-1992.
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., and Milanowski, J. 2016a. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. Ann. Agric. Environ. Med. 23: 197–205.
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., and Milanowski, J. 2016b. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. Ann. Agric. Environ. Med. 23: 206-222.
- Edens, D. G., Gitaitis, R. D., Sanders, F. H., and Nischwitz, C. 2006. First report of *Pantoea agglomerans* causing a leaf blight and bulb rot of onions in Georgia. Plant Dis. 90: 1551.
- Feng, Y., Shen, D. and Song, W. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. J. Appl. Microbiol. 100: 938-945.
- Frederickson, D. E., Monyo, E. S., Odvody, G. N., and King, S. B. 1997. A disease of pearl millet in Zimbabwe caused by *Pantoea agglomerans*. Plant Dis. 81: 959

- Fucikovsky, L., Moreno, M. y Téliz, D. 1972. Datos preliminares sobre la bacteriosis de maíz en el Valle de Toluca. *Agrociencia* 9: 55-68.
- Gitaitis, R. and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 45: 371–397
- González, A. D., Franco, M. A., Contreras, N., Galindo-Castro, I., Jayaro, Y. and Graterol, E. 2015. First report of *Pantoea agglomerans* causing rice leaf blight in Venezuela. *Plant Dis.* 99: 552.
- Hui-Ying, C., Hong-Jie, L., Zhen-Dong, Z., and Xiao-Ming, W. 2011. Seed transmission of *Pantoea agglomerans* causal agent of dry stalk rot in maize. *Acta Phytopylacica Sinica.* 38: 31-36.
- Humeau, L., Roumagnac, P., Picard, Y., Robène-Soustrade, I., Chiroleu, F., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2006. Quantitative and molecular epidemiology of bacterial blight of onion in seed production fields. *Phytopathology* 96: 1345-1354.
- Jeger, M. J. 2004. Analysis of disease progress as a basis for evaluating diseasemanagement practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 42: 61–82
- Jiménez, O., Contreras, N. y Rodríguez, C. 2007. Identificación y caracterización de *Pantoea agglomerans* aislada en plantas de gloxinia (*Gloxinia alba*). *Bioagro* 19: 53-57.
- Johnson, K. B., Stockwell, V. O., Sawyer, T. L., and Sugar, D. 2000. Assessment of environmental factors influencing growth and spread of *Pantoea agglomerans* on and among blossoms of pear and apple. *Phytopathology* 90: 1285-1294.
- Liu, L. 2010. Quantifying the aggressiveness, temporal and spatial spread of *Pantoea stewartii* in sweet corn. Graduate Theses and Dissertations. Master of Science. Iowa State University, Ames, Iowa, USA.

- Lu, B. H., Jia, M. J., and Gao, J. 2015. First report of *Pantoea agglomerans* causing bacterial leaf blight on *Vigna angularis* in Jilin Province, China. *Plant Dis.* 99: 1269.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F. 2007. *The Study of Plant Disease Epidemics*. APS Press, St. Paul, MN
- Madden, L.V., and Hughes, G. 1994. BBD - Computer software for fitting the beta-binomial distribution to disease incidence data. *Plant Dis.* 78: 536-540.
- Madden, L. V., and Hughes, G. 1995. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 529-564.
- Medrano, E. G., and Bell, A. A. 2007. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *J. Appl. Microbiol.* 102: 134-143.
- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D. L. Valadez-Moctezuma, E., Alarcón-Zúñiga, B., Zelaya-Molina, L. X., Córdova-Téllez, L., Mendoza-Onofre, L., Vaquera-Huerta, H., Carballo-Carballo, A., Farfán-Gómez, A., and Ávila-Quezada, G. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Dis.* 91: 1365.
- Mudryk, M. R. 2012. Plant-Isolated *Pantoea agglomerans* – new look into potential pathogenicity. *Мікробіологічний журнал* 74: 53-57.
- Rodríguez, M., Matehus, J., Gerstl, A. y Santana, M. A. 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia* 33: 537-541.
- Romeiro, R. S., Macagnan, D., Mendonça, H. L., and Rodrigues-Neto, J. 2006. Bacterial spot of Chinese taro (*Alocasia cucullata*) in Brazil induced by *Pantoea agglomerans*. *Plant Pathol.* 56: 1038.

- Roumagnac, P., Pruvost, O., Chiroleu, F., and Hughes, G. 2004. Spatial and temporal analyses of bacterial blight of onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Phytopathology* 94: 138-146.
- SAS Institute, Inc. 2002. SAS System for Windows version 9.1. SAS Institute, Inc Cary, N.C. USA.
- Silva-Rojas, H. V., Mahuku G., and Esker, P. D. 2010. *Pantoea agglomerans*, a maize seed transmitted bacterium in Mexico. *Phytopathology* 100: S119.
- Suparyono, and Pataky, J.K. 1989. Influence of resistance and growth stage at the time of inoculation on Stewart's wilt and Goss's wilt development and sweet corn hybrid yield. *Plant Dis.* 73: 339-345.
- Trigiano, R. N., Windham, M. T. and Windham, A. S. 2008. *Plant Pathology: Concepts and Laboratory exercises*. 2nd Edition. CRC Press. USA. 558 p.
- Yang, K. Q., Qu, W. W., Liu, X., Liu, H. X., and Hou, Q. 2011. First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. *Plant Dis.* 95: 773.

CAPÍTULO IV

GERMINACIÓN Y VIGOR DE SEMILLA DE MAÍZ PROVENIENTE DE PLANTAS INFECTADAS POR *Pantoea agglomerans*

RESUMEN

Pantoea agglomerans es un patógeno transmitido por semilla de maíz, se ha reportado recientemente como agente causal del estriado clorótico y marchitez bacteriana en los Valles Altos de México. El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad de semillas producidas en plantas infectadas por esta bacteria. Se cosecharon mazorcas de los híbridos Triunfo y 9BX52 infectados naturalmente. Las semillas se separaron con base en el tipo de infección de la planta (sanas, no sistémica y sistémica). Se evaluó la calidad fisiológica de la semilla con pruebas de germinación estándar en laboratorio recomendadas por la ISTA y la emergencia en invernadero. Los resultados mostraron que el peso de mil semillas fue menor en las procedentes de plantas infectadas sistémicamente. Todas las variables evaluadas en laboratorio e invernadero, excepto germinación al primer conteo, fueron significativamente inferiores en semilla de plantas con infección sistémica. Estos resultados indican que la severidad de infección de la planta madre afecta la calidad de la semilla.

Palabras claves adicionales: Calidad fisiológica patógeno, tipo de infección, *Zea mays* L.

Abstract

Pantoea agglomerans is an important seed borne pathogen of maize. There are reports about transmission rates; however, information concerning the quality seed is weak.

The aim of this study was to evaluate the quality of seed produced in infected plants with *Pantoea agglomerans*. Dent corn hybrids Triunfo (comercial) and 9Bx52 (experimental) were sown in Experimental Station of Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico. Disease assessments were made once a week during crops cycle. Seeds were harvested and separed acording severity of mother plant (healthy, non-systemic and systemic). Seed quality was evaluated with standard test germination in laboratory and vigour in greenhouse. Disease incidences of sistemic infection were 3.6% for Triunfo and 2.8% for 9Bx52. The results show that 1000-seed weight was lower in systemically infected plants. All variables in laboratory and greenhouse were significantly lower in seed plants with systemic infection. These results indicate that the severity of infection from the mother plant affects seed quality.

Additional key words: germination, emergency,

INTRODUCCIÓN

La marchitez bacteriana del maíz es una de las enfermedades de mayor importancia fitosanitaria debido a que se transmite por semilla y puede afectar la planta en cualquier etapa de su desarrollo. Silva-Rojas *et al.* (2010) reportan índices de transmisión por semilla de hasta 26%, valor por encima de los reportados para el género *Pantoea*. Por otra parte, Hui-Ying *et al.* (2011) reportan índices de 100% y mencionan que *P. agglomerans* puede moverse de semilla infectada a hojas y a semillas a través del sistema vascular de las plantas de maíz.

Las semillas son un componente esencial para la producción. Alrededor del 90% de los cultivos alimenticios en el mundo se propagan por semilla y gran parte de ellos son atacados por patógenos los cuales en su mayoría también son transmitidos por semilla

(Agarwal and Sinclair, 1996). Por lo anterior, se requieren ambientes libres de patógenos que puedan infectar a los lotes de producción de semillas.

Las bacterias fitopatógenas transmitidas por semilla son responsables de la re-emergencia de enfermedades pasadas, así como la introducción de enfermedades a nuevas áreas (Gitaitis and Walcott (2007). Por esta situación se están haciendo esfuerzos por desarrollar nuevas pruebas de sanidad de semillas aprovechando las nuevas tecnologías para mejorar su sensibilidad y selectividad.

Se han realizado algunos estudios para conocer los índices de transmisión por semilla, sin embargo, hay poca información respecto a la calidad de la semilla procedente de planta madre infectada. Con base en lo anterior, el presente trabajo se realizó con el propósito de conocer el efecto de la severidad de *P. agglomerans* en plantas de maíz en la germinación y vigor de la semilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos y establecimiento en campo. Se utilizaron los híbridos de maíz Triunfo (trilineal comercial) y 9BX52 (cruza simple experimental), los cuales se establecieron en lotes de 24 X 7m, obteniendo 30 surcos a una distancia de 80 cm entre surcos y a 30 cm entre plantas.

Evaluación de la enfermedad. La evaluación de la enfermedad se realizó desde la aparición de los primeros síntomas hasta los 132 días después de la siembra. Se registró la incidencia total, la incidencia de infección no sistémica y la incidencia de infección sistémica, para lo cual se consideró la escala de Suparyono y Pataky (1989): planta sana= 0% de infección, infección no sistémica= lesiones en una hoja de 1-

15%, infección sistémica = lesiones en más de una hoja > 15%, planta marchita o muerta.

Obtención de semilla. Las mazorcas se cosecharon manualmente en madurez de cosecha a los 174 días después de la siembra. Las semillas se desgranaron y se formaron compuestos por tipo de infección de la planta (sana, no sistémica y sistémica) en cada genotipo. Para realizar las pruebas de germinación y vigor se generaron seis tratamientos y ocho repeticiones con un diseño factorial 2 X 3 (2 genotipos y tres tipos de infección).

Peso de mil semillas. Se contaron y pesaron 100 semillas de cada tratamiento y se calculó el coeficiente de variación. El peso de mil semillas se obtuvo multiplicando por 10 la media aritmética de las ocho repeticiones (ISTA, 2005).

Germinación estándar. Se colocaron 400 semillas de cada tratamiento entre papel toalla con cuatro repeticiones de 100 semillas cada una. Las toallas se enrollaron y colocaron en una cámara germinadora a 25°C por siete días. Al término de este período, se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de germinación al primer conteo (PGPC), porcentaje de germinación total (plántulas normales) (PG), porcentaje de plántulas anormales (PPA) y viabilidad (plántulas normales + anormales) (VI). El primer conteo se realizó a los cuatro días después de siembra y el conteo final a los siete días usando los criterios de la ISTA (2005).

Prueba de vigor. La prueba se realizó en un invernadero móvil tipo microtúnel en un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. Se sembraron 100 semillas por tratamiento a una profundidad de 5.5 cm. Las semillas se colocaron en un semillero de 2.0 m de ancho por 5.0 m de largo con arena como sustrato. La

unidad experimental estuvo conformada por dos surcos de 50 semillas cada uno con una distancia entre surcos y semillas de 10 y 3.6 cm, respectivamente.

El porcentaje de emergencia diario (PE) se registró a los siete y a los 14 días después de la siembra. Se consideró emergida una plántula cuando la punta del coleóptilo fue visible. Se calculó la velocidad de emergencia (VE) con la fórmula de Maguire (1962). A 28 días después la siembra se cosecharon las plántulas y se seleccionaron al azar 20 plantas de cada unidad experimental para determinar la longitud de la parte aérea (LPA) en centímetros por planta, peso fresco de la parte aérea (PFA) en gramos por planta y peso seco de la parte aérea (PSA) en miligramos por planta.

Análisis estadístico. Todas las variables, excepto peso de mil semillas, se sometieron al análisis de varianza mediante el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS versión 8.0 (SAS Institute, 1999), a las variables con diferencias significativas se les hizo la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Los valores en porcentaje se transformaron a arco seno $\sqrt{x/100}$.

RESULTADOS

Evaluación de la enfermedad. Los primeros síntomas fueron visibles a los 48 días después de la siembra (dds) con una incidencia de 1.4% en Triunfo y 2.1% en 9BX52. A partir de los 93 dds no se registró aumento en la incidencia en ambos híbridos. La incidencia final fue de 26% en Triunfo y 26.9% en 9BX52, sin embargo, la incidencia de infección sistémica fue mayor en Triunfo con 3.6% por 2.8% en 9BX52 (Figura 1).

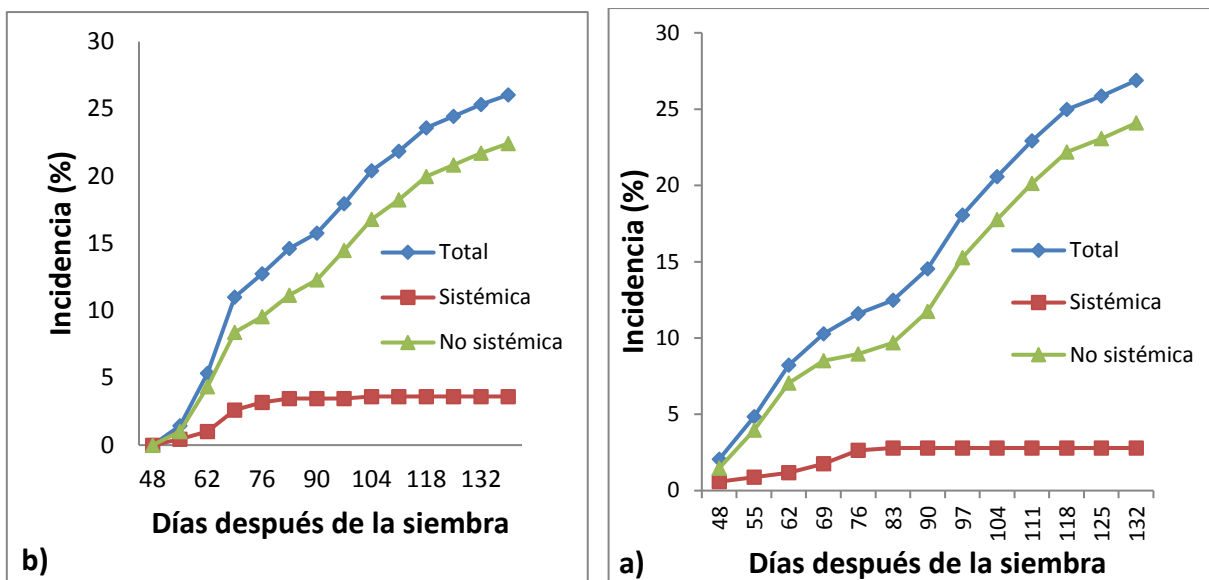


Figura 1. Incidencia de plantas de maíz con estriado clorótico y marchitez causado por *Pantoea agglomerans* en los híbridos a) Triunfo y b) 9BX52, evaluadas durante el ciclo primavera-verano 2003 en Montecillo, Estado de México.

Peso de mil semillas. En ambos genotipos se observa una tendencia a disminuir de acuerdo con el tipo de infección (Cuadro 1), lo cual indica que la infección de la planta por *P. agglomerans* tiene influencia sobre esta variable que se considera como la más importante para clasificar el tamaño de semilla (Thomson, 1979). Consecuentemente, la media de las muestras obtenidas de plantas infectadas sistémicamente de ambos genotipos fue menor estadísticamente que las de plantas sanas.

Cuadro 1. Peso de mil semillas (gramos) por genotipo y por tipo de infección.

Genotipo	Tipo de infección			Media
	Sanas	No sistémica	Sistémica	
Triunfo	329.88	298.21	220.88	282.99

9Bx52	359.92	288.25	264.66	304.28
Media	344.90	293.23	242.77	293.63

Germinación estándar. El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre tipo de infección en las variables PG y VI, y diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en PGPC (Cuadro 2). Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre genotipos en las variables PGPC y PG. La interacción genotipo por tipo de infección fue significativa únicamente en la variable PGPC.

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza de las variables de la prueba de germinación en laboratorio.

FV	GL	PGPC	PG	VI
Gen	1	0.018*	0.017*	0.010
Infec	2	0.011	0.058**	0.050**
Gen*Infec	2	0.020*	0.007	0.000
Media		42.08	92.46	94.67
R ²		0.55	0.78	0.71
C.V		8.53	3.66	3.71

Gen= genotipo (Triunfo, 9BX52); Infec= tipo de infección (sana, sistémica, no sistémica); PGPC=Germinación al primer conteo; PG=Porcentaje de germinación; VI=Viabilidad.

Valores seguidos por * o ** indican significancia a $P < 0.05$ o $P < 0.01$, respectivamente.

El híbrido Triunfo presentó el mayor valor en la variable PGPC. Sin embargo, en PG fue inferior que el híbrido 9BX52 (Cuadro 3). En el análisis de comparación de medias de la interacción (Cuadro 6) el valor más alto de PGPC lo tuvo la muestra de semillas de plantas infectadas sistémicamente del híbrido Triunfo.

Cuadro 3. Comparación de medias por genotipo.

Genotipo	PGPC (%)	PG (%)
Triunfo	44.75a ^y	91.08b
9B X 52	39.42b	93.83a

^yValores en cada columna seguidos por la misma letra no son diferentes estadísticamente al 5% de nivel de probabilidad según la prueba de Tukey $P < 0.05$. PGPC, porcentaje de germinación al primer conteo. PG, porcentaje de germinación

Prueba de vigor: Se encontraron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre tipo de infección en las variables VE y PE. Las variables LPA, PFA y PSA mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tipo de infección (Cuadro 4). Para ninguna variable hubo diferencias entre genotipos. Sin embargo, la interacción genotipo por tipo de infección fue significativa en la variable LPA con valores más bajos en la muestra de plantas infectadas sistémicamente del híbrido Triunfo.

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis de varianza de las variables de la prueba de emergencia en microtúnel

FV	GL	VE	PE	LPA	PFA	PSA
Gen	1	1.058	0.006	17.716	0.051	4676.04
Infec	2	8.140**	0.177**	62.194*	5.814*	31540.63*
Gen*Infec	2	0.026	0.003	31.180*	2.879	9076.04
Media		12.37	91.33	26.86	4.65	438.13
R ²		0.74	0.85	0.61	0.42	0.44
C.V		4.68	4.52	10.08	24.89	17.81

Gen= genotipo (Triunfo, 9BX52); Infec= tipo de infección (sana, sistémica, no sistémica); VE=Velocidad de emergencia; PE=Porcentaje de emergencia; LPA=Longitud de la parte aérea; PFA=Peso fresco de la parte aérea; PSA=Peso seco de la parte aérea.

En general, los valores más bajos fueron significativamente inferiores en todas las variables en las muestras de semillas provenientes de plantas con infección sistémica (Cuadro 5). En el caso de la interacción genotipo por tipo de infección las únicas variables que mostraron diferencias significativas fueron el porcentaje de germinación al primer conteo y longitud de la parte aérea, en el cuadro 6 se muestra la comparación de medias para dichas variables.

Cuadro 5. Comparación de medias de variables de germinación y emergencia por tipo de infección.

Tipo de infección	PG (%)	VI (%)	VE	PE (%)	LPA (cm)	PFA (g)	PSA (mg)
Sanas	94.63a ^y	97.38a	13.17a	97.88a	27.93a	5.09a	475.00a
No sistémica	95.63a	96.13a	12.71a	93.38b	28.96a	5.20ab	473.75a
Sistémica	87.13b	90.50b	11.24b	82.75c	23.70b	3.67b	365.63b

^yLas cifras en cada columna con letras diferentes son diferentes estadísticamente.

Comparación múltiple de medias DSH, Tukey P<0.05.

Cuadro 6. Comparación de medias del porcentaje de germinación al primer conteo (PGPC) y longitud de la parte aérea (LPA) para la interacción genotipo por tipo de infección.

Genotipo	Tipo de infección	PGPC (%)	LPA (cm)
Triunfo	Sanas	42.00ab	29.148ab
	No sistémica	37.75b	31.59a
	Sistémica	54.00a	22.43c
9B X 52	Sanas	39.00b	26.718abc
	No sistémica	41.25ab	26.328abc
	Sistémica	38.50b	24.968bc

^yLas cifras en cada columna con letras diferentes son diferentes estadísticamente.

Comparación múltiple de medias DSH, Tukey P<0.05.

En todas las variables los valores significativamente inferiores fueron los de las muestras de semillas de plantas infectadas sistémicamente (Cuadro 6).

DISCUSIÓN

El peso de mil semillas fue menor en muestras de semillas de plantas infectadas sistémicamente, lo cual sugiere que éstas eran de menor tamaño que las sanas. No se tienen reportes sobre el tamaño y peso de la semilla producida en plantas de maíz infectadas por *P. agglomerans*. Aunque las plantas con infección severa producen semillas de mala calidad (Pepper, 1967).

La calidad fisiológica se vio afectada por la infección de *P. agglomerans* a la planta. El porcentaje de germinación al primer conteo fue mayor en la muestra de semillas de plantas infectadas sistémicamente del híbrido Triunfo, esto puede deberse al tamaño, ya que dicha muestra fue la que presentó menor peso y esto permitió una rápida imbibición.

Los valores de germinación, viabilidad, velocidad de emergencia, longitud de la parte aérea, peso fresco de la parte aérea y peso seco de la parte aérea fueron menores en muestras de semillas de plantas infectadas sistémicamente, las cuales presentaron el menor peso y por ende un menor tamaño. Al respecto, El-Abady (2015) señala que un incremento en el tamaño de la semilla aumenta la emergencia y vigor de las plántulas de maíz.

Sin embargo, en otros estudios no se encontraron diferencias significativas en tamaño de semillas sobre la germinación del híbrido de maíz B-15 (Moreno *et al.*, 1998). En el caso de la germinación, el valor más bajo (85.25%) fue en la muestra de semillas de plantas infectadas sistémicamente del híbrido Triunfo.

Diversos autores confirman el efecto del tamaño de semilla de maíz en la germinación y vigor (Bockstaller and Girardin, 1994; Molatudi and Mariga, 2009; Yusuf *et al.*, 2014; El-Abady, 2015).

Por otra parte, reportes sobre los efectos del ambiente en el que se desarrolla la planta en diferentes aspectos de la calidad de la semilla, incluyendo capacidad de germinación, latencia, tamaño y composición (Fenner, 1992; Ghassemi-Golezani *et al.*, 1997). En este caso, las condiciones de estrés de la planta provocado por la enfermedad redujeron la calidad fisiológica de la semilla.

Aunque no se evaluó el porcentaje de semillas infectadas, es posible que las plantas con infección sistémica transmitieran la bacteria a la semilla. Block, *et al.* (1998) reportaron los valores más bajos en germinación en muestras infectadas con *P. stewartii* con los más altos porcentajes de infección. Rahmatzai and Saifulla (2011) señalan que los patógenos transmitidos por semilla de maíz reducen la germinación y vigor y producen plántulas anormales. En el presente trabajo se observó que los valores más altos de plántulas anormales fueron de las semillas de plantas con infección sistémica.

Incluso, enfermedades no asociadas a las semillas, pero que afectan cualquier parte de la planta pueden producir semillas malformadas y su potencial de germinación se reduce o pierde (McGee, 1995).

CONCLUSIÓN

Las semillas procedentes de plantas de maíz con síntomas de estriado clorótico y marchitez mostraron valores más bajos de germinación y vigor.

En general, las plantas con infección sistémica en los híbridos Triunfo y 9BX52 mostraron una reducción de la calidad de semilla, lo que indica que la infección local a la planta madre no tiene efecto significativo en la calidad de semilla.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, V. K., and Sinclair J. B. 1996. Principles of Seed pathology 2nd edition CRC Press USA 539 p.
- Block, C. C., Hill, J. H., and McGee, D. C. 1998. Seed transmission of *Pantoea stewartii* in field and sweet corn. Plant Dis.82: 775-780.
- Bockstaller, C., and Girardin, P. 1994. Effects of seed size on maize growth from emergence to silking. Maydica. 39: 213-218.
- El-Abady, M. I. 2015. Influence of maize seed size/shape, planted at different depths and temperatures on seed emergence and seedling vigor. Res. J. Seed Sci. 8:1-11.
- Fenner, M. 1992. Environmental influences on seed size and composition. Horticultural Rev. 13: 183- 221.
- Ghassemi-Golezani, K., Soltanii, A., and Atashi, A. 1997. The effect of water limitation in the field on seed quality of maize and sorghum. Seed Sci.Technol. 25: 321-323.
- Gitaitis, R., and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 45: 371–397

- Hui-Ying, C., Hong-Jie, L., Zhen-Dong, Z., and Xiao-Ming, W. 2011. Seed transmission of *Pantoea agglomerans* causal agent of dry stalk rot in maize. *Acta Phytopylacica Sinica*. 38: 31-36.
- ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza.
- McGee, D. C. 1995. Epidemiological approach to disease management through seed technology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 445-466.
- Molatudi, R. L., and Mariga, I. K. 2009. The effect of maize seed size and depth of planting on seedling emergence and seedling vigour. *J. Applied Sci. Res.* 5: 2234-2237.
- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D. L. Valadez-Moctezuma, E., Alarcón-Zúñiga, B., Zelaya-Molina, L. X., Córdova-Téllez, L., Mendoza-Onofre, L., Vaquera-Huerta, H., Carballo-Carballo, A., Farfán-Gómez, A., and Ávila-Quezada, G. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Dis.* 91: 1365.
- Pepper, E. H. 1967. Stewart's bacterial wilt of corn. Monograph No. 4. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 36 p.
- Rahmatzai, N., and Saifulla, M. 2011. Effects of seed-borne pathogens on seed quality parameters of maize. *Mysore J. Agric. Sci.* 45: 32-38
- SAS Institute, Inc. 1999. SAS System for Windows version 8.0. SAS Institute, Inc Cary, N.C.
- Silva-Rojas, H. V., Mahuku G., and Esker, P. D. 2010. *Pantoea agglomerans*, a maize seed transmitted bacterium in Mexico. *Phytopathology* 100: S119.

Suparyono, and Pataky, J. K. 1989. Influence of resistance and growth stage at the time of inoculation on Stewart's wilt and Goss's wilt development and sweet corn hybrid yield. *Plant Dis.* 73: 339-345.

Thomson, J. R. 1979. *Introducción a la tecnología de semillas.* Acribia. España. 301 p.

Yusuf, C. S., Makate, N., and Jacob, R. 2014 Effect of seed size on germination and early growth of maize (*Zea mays*). *International Journal of Scientific and Research Publications* 4: 1-3.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados sugieren que el estriado clorótico y marchitez del maíz en Montecillo, Estado de México no es causado por *Pantoea stewartii* como se había reportado, lo cual implica que *P. stewartii* continuará en la lista de patógenos en la norma cuarentenaria emitida por la DGSV. Las características fisiológicas, bioquímicas y el análisis de la secuencia del 16S rDNA confirmaron la presencia de *Pantoea agglomerans*, siendo este trabajo el primer reporte de *P. agglomerans* asociado al estriado clorótico y marchitez del maíz en Montecillo, Estado de México.

Los resultados relacionados a la epidemiología de *P. agglomerans* mostraron incidencias de 26.13% y 26.87% en los híbridos Triunfo y 9Bx52, respectivamente. En este estudio la temperatura fue el único factor que se correlacionó significativamente con la enfermedad aunque otros reportes sugieren que la humedad y precipitación también son importantes en el desarrollo de la enfermedad. El progreso temporal de la enfermedad se ajustó al modelo monomolecular en ambos híbridos, este modelo es ideal para explicar las enfermedades monocíclicas en el que la transmisión por semilla es fundamental. El patrón espacial de la enfermedad fue agregado en Triunfo y aleatorio en 9Bx52.

La infección de *P. agglomerans* a la planta tiene un efecto negativo en la calidad física y fisiológica de la semilla. En este estudio, los valores más bajos de germinación y vigor lo presentaron las semillas provenientes de plantas con infección sistémica y no hubo diferencias significativas entre las semillas de plantas sanas y semillas de plantas con infección no sistémica.

Dado que es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo y los altos índices de transmisión por semilla, se quiere más investigación para diferenciar entre cepas benéficas y patogénicas, así como generar estrategias de control.