

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**  
**AGROPECUARIAS**



**ESTUDIO DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANDA EN**  
**NARDO DEL ESTADO DE MORELOS**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**LUIS ANGEL RIVERA LÓPEZ**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan Jal.

Abril 2011



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

*Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología*

COORD-BIO-132/2010.

C. LUIS ANGEL RIVERA LÓPEZ  
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **"ESTUDIO DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANDA EN NARDO DEL ESTADO DE MORELOS "**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Ai mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la **Dr. Gabriel Rincón Enríquez** y como asesor a la **Dr. Liberato Portillo Martínez** y a la **Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar**.


Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"  
Las Agujas Nextipac, Zapopan, Jal., 21 de octubre del 2010.



DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN




M.C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: **"ESTUDIO DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANDA EN NARDO DEL ESTADO DE MORELOS"** que realizó el pasante **Luis Ángel Rivera López** con número de código **302322811** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

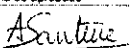

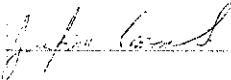
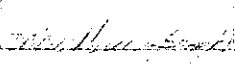
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

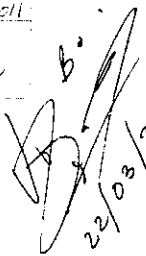
Atentamente  
 Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal, 17 de marzo del 2011

  
 Dr. Gabriel Rincón Enríquez  
 Director del trabajo,

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar  
 Asesores

  
 Dr. Liberato Portillo Martínez

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Anne Marguerite Hélène Santerre		17/03/2011
Dra. Patricia Castro Felix		17/03/2011
Dra. Josefina Casas Solís		17/03/2011
Supl. MC. Dolores Mariana Barragan Reynaga		22/03/2011

  
 B.  
 22/03/2011

El trabajo de esta tesis forma parte del proyecto intitulado:

**“Uso del axihuitl o hierba de agua (*Eupatorium spp.*) para control de enfermedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) y cultivos ornamentales en agricultura protegida”**

Financiado por el Fondo Mixto (FOMIX) del Estado de Morelos – CONACyT (Convocatoria 2009-01). Clave de Proyecto 120296.

La parte experimental de esta investigación se desarrolló en el laboratorio de la unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Rincón Enríquez, director de esta tesis, por su constante apoyo y por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo de investigación. También por su paciencia, confianza y por sus sabios consejos que me han despertado el gusto por la ciencia y me han hecho aprender a valorar el trabajo científico.

A la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones por sus valiosas aportaciones que marcaron el rumbo de esta investigación. Además, por sus consejos que me han permitido entender la esencia de la investigación y a tomar una decisión sobre mi preparación profesional.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) en especial a la Unidad de Biotecnología Vegetal por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A la Universidad de Guadalajara y a todos mis profesores de la licenciatura, por haberme formado en el campo de la Biología.

Al Dr. Liberato Portillo Martínez, por su apoyo incondicional, confianza y amistad. Al mismo tiempo por ser uno de los pilares de mi formación profesional.

A la Dra. Anne Marguerite Hélele Santerre por su apoyo durante mi formación profesional y enseñarme con su ejemplo el gusto por la ciencia. También por sus observaciones que enriquecieron el escrito de esta tesis.

A la Dra. Patricia Castro Félix por los conocimientos transmitidos durante mi formación profesional y por mejorar el escrito de este trabajo.

A la Dra. Josefina Casas Solís por haber aceptado ser parte de la revisión de este trabajo.

A todos ustedes gracias.

## *D.F.D.º C.A.J.C.R.S.A*

*A mi Dios*

*Por haberme puesto en este camino en el que cada día descubro las cosas que tú creaste y por darme la gracia de concluir ésta etapa de mi vida rodeado de las personas que más quiero en el mundo, mi familia.*

*A mis padres*

*María de los Ángeles López Mateos y Cefetino Rivera Casillas, quienes han estado al pendiente de mí en cada momento de mi vida y han sabido alentarme a seguir adelante, enseñándome el camino que debo seguir y otorgándome todo lo necesario para alcanzar mi objetivo final. También por su ejemplo de vida, su cariño y apoyo incondicional que siempre me han brindado. "Los quiero con todo mi corazón" muchas gracias por esta oportunidad.*

*A mi hermano*

*Juan Manuel Rivera López quien simplemente es mi mejor amigo y compañero, puedes contar conmigo siempre.*

*A mis Abuelos paternos*

*María de Jesús Casillas Olvera y Matías Rivera Amezcua quienes me cuidaron de pequeño y ahora lo hacen desde el cielo. ¡Siempre los llevaré en mi pensamiento!*

*A mis abuelos maternos*

*María Luisa Mateos Lemus y Fusbio López Maestro, por darme la mejor Mama del mundo.*

*A la Familia Rivera Casillas*

*A mis tías y tíos Trinidad, Chuy, Rosy, Lola, Vicente, Sergio. A mis primas y primos Alex, Chuy, Lola, Güero y Lalo. ¡Los quiero mucho familia!*

*A Beatriz Guardado Fierros*

*Por tu cariño y apoyo en los momentos difíciles, gracias por cerrar conmigo una etapa de mi vida ¡JQM!*

## PRINCIPALES ABREVIATURAS

AC	Análisis de Conglomerados
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Acido desoxirribonucleico
BV	Clave correspondiente al cepario del Laboratorio de Biotecnología Vegetal
CEL	Medio para revelar actividad de celulasas
DDI	Días Después de la Inoculación
DO	Densidad Óptica
ITS	Espacio transcrito Intergenico del ARN ribosomal 16S-23S
KA	Medio King A
KB	Medio King B
LB	Medio Luria-Bertani
M9	Medio mínimo (Miler, 1972)
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa



- PEL Medio para revelar actividad de pectinasas
- PGA Acido poligalacturónico
- RFLP Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción

	<b>INDICE</b>	<b>PAGINA</b>
1	<b>RESUMEN</b>	1
2.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
3.	<b>MARCO TEORICO</b>	3
3.1	IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN LAS PLANTAS	3
3.2	LA PUDRICIÓN BLANDA EN LAS PLANTAS	4
3.2.1	Pudrición blanda causada por hongos	5
3.2.2	Las fitóbacterias como agentes causales de la pudrición blanda	5
3.3	PRINCIPALES MECANISMOS DE PATOGENICIDAD EN FITOBACTERIAS	6
3.3.1	Sustancias químicas que causan la pudrición blanda	6
3.3.2	Enzimas	6
3.3.3	Toxinas	7
3.3.4	Polisacáridos de la membrana	8
3.4	DEGRADACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA PARED CELULAR	8
3.4.1	Componentes de la pared celular	9
3.5	RESPUESTA DE LAS PLANTAS CONTRA PATOGENOS	11
3.5.1	Defensa estructural	12
3.5.2	Defensa bioquímica	12
3.6	TRIANGULO DE PATOGENICIDAD	13
3.7	EI CULTIVO DE ORNAMENTALES EN EL ESTADO DE MORELOS	14
3.7.1	Aspectos reproductivos, económicos y daños ocasionados por problemas fitosanitarios en cultivos ornamentales	13
3.7.2	El cultivo de nardo en el Estado de Morelos	14
3.8	EL NARDO ( <i>Polianthes tuberosa</i> )	15
3.8.1	Identificación y caracterización de patógenos en cultivos ornamentales de México	17

3.8.2	Patógenos en el cultivo de nardo del Estado de Morelos	18
3.9	TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FITÓPATOGENAS	19
4.	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	23
5	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	24
6.	<b>HIPÓTESIS</b>	25
7.	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	26
7.1	<b>Objetivos particulares</b>	26
8.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	27
8.1	ÁREA DE ESTUDIO	28
8.1.2	Toma de muestras	28
8.2	DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS	28
8.2.1	Aislamiento de bacterias fitopatógenas a partir de bulbos de nardo con pudrición blanda	28
8.2.2	Siembra, interpretación de cajas y aislamiento	28
8.3	CRIOCONSERVACIÓN DE CEPAS	29
8.4	CEPAS BACTERIANAS	29
8.5	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS	30
8.5.1	Tinción de Gram y prueba de Ryu	30
8.5.2	Pruebas de producción de pectinasas PEL y celulasas CEL	30
8.5.3	Curvas de crecimiento	31
8.5.4	Crecimiento en medio King A y King B	31
8.5.5	Crecimiento a 42°C	31
8.6	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	31
8.6.1	Extracción del ADN genómico	31
8.6.2	ITS (16S-23S) PCR	32
8.6.3	Purificación del ADN amplificado por PCR	33
8.6.4	ITS-RFLP (Restriction fragment length polymorphis)	33
8.7	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	33
8.7.1	Patogenicidad en diferentes hospederos	33

8.7.2	Patogenicidad en bulbos de nardo	34
9.	<b>RESULTADOS</b>	35
9.1	TOMA DE MUESTRAS	35
9.2	DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS	36
9.2.1	Aislamiento de bacterias a partir de bulbos de nardo con pudrición blanda	36
9.3	CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS	37
9.3.1	Tinción de Gram y prueba de Ryu	37
9.3.2	Pruebas de pectinasas (PEL) y celulasas (CEL)	38
9.3.3	Morfología colonial de las cepas seleccionadas	41
9.3.4	Curvas de crecimiento	41
9.3.5	Crecimiento en medio King A y King B	43
9.4	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	45
9.4.1	Extracción del ADN genómico	45
9.4.2	Amplificación de la región ITS 16S-23S	46
9.4.3	Análisis estadístico con base en los datos ITS 16S-23S	47
9.4.4	ITS-RFLP (Restriction fragment length polymorphis)	48
9.4.5	Análisis estadístico con base en los datos ITS 16S-23S RFLP ( <i>Cfol</i> )	50
9.5	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	52
9.5.1	Pruebas de patogenicidad en arabidopsis	52
9.5.2	Pruebas de patogenicidad en violeta africana	57
9.5.3	Pruebas de patogenicidad en lechuga romana	60
9.6	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD EN BULBOS DE NARDO	63
10.	<b>DISCUSIÓN</b>	71
11.	<b>CONCLUSIONES</b>	79
12.	<b>PERSPECTIVAS</b>	80
13.	<b>LITERATURA CITADA</b>	81
14.	<b>APENDICE 1</b>	90

## INDICE DE FIGURAS

## PAGINA

Figura 1.	Esquema de la lámina media y pared celular primaria y secundaria.	9
Figura 2.	Flores de nardo ( <i>Polianthes tuberosa</i> ) cultivadas en parcelas de Emiliano Zapata, Morelos.	15
Figura 3.	Parcela de nardo en plena producción, Emiliano Zapata, Morelos.	16
Figura 4.	Esquema representativo de un operón de rRNA donde se muestran los espacios intergénicos 16S-23, así como los primers G1 y L1 utilizados para su amplificación por PCR. (Tomado de Jensen <i>et al.</i> , 1993).	22
Figura 5.	Curvas de crecimiento de las cepas <i>E. chrysanthemi</i> , BV145, BV152 y BV157 en medio LB.	42
Figura 6.	Curvas de crecimiento de las cepas <i>E. chrysanthemi</i> , BV145, BV152 y BV157 en medio M9+PGA 0.2%.	42
Figura 7.	ITS-PCR 16S-23S de las cepas testigo y aisladas de nardo.	46
Figura 8.	Análisis de componentes principales de cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S (76% de variación total explicada).	47

Figura 9.	Análisis de conglomerados mediante el método del promedio de grupo de cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S.	48
Figura 10.	Digestión del ITS con la enzima <i>RsaI</i> para las cepas testigo y aislamientos de nardo.	49
Figura 11.	Digestión del ITS con la enzima <i>CfoI</i> para las cepas testigo y aislamiento de nardo.	50
Figura 12.	Análisis de componentes principales de cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S RFLP ( <i>CfoI</i> ) (65% de variación total explicada).	51
Figura 13.	Análisis de conglomerados mediante el método del promedio de grupo de cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S RFLP ( <i>CfoI</i> ).	51
Figura 14.	Escala de medición para evaluar el desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de las cepas BV145, BV152 y BV157 en hojas de arábidopsis.	53
Figura 15.	Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de la cepa BV145 en hojas de arábidopsis 11 DDI.	54
Figura 16.	Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de la cepa BV152 en hojas de arábidopsis, 11 DDI.	54
Figura 17.	Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de la cepa BV157 en hojas de arábidopsis 11 DDI.	55

Figura 18.	Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de la cepa <i>Erwinia chrysanthemi</i> en hojas de arabisopsis 11 DDI.	56
Figura 19.	Desarrollo de los síntomas provocados por <i>outF</i> 11 DDI.	56
Figura 20.	Escala de medición para evaluar el desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de las cepas BV145, BV152 y BV157 en hojas de violeta africana.	57
Figura 21.	Desarrollo de los síntomas provocados por la cepa BV157 en hojas de violeta africana.	58
Figura 22.	Desarrollo de los síntomas provocados por la cepa <i>outF</i> en hojas de violeta africana.	59
Figura 23.	Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda provocados por <i>E. chrysanthemi</i> en hojas de violeta africana.	59
Figura 24.	Sitio de inoculación de bacterias a partir de colonias sobre hojas de lechuga romana.	60
Figura 25.	Síntomas de pudrición blanda provocados por la cepa BV157 en hojas de lechuga romana 2 DDI.	61
Figura 26.	Desarrollo de los síntomas provocados por la cepa BV157 en hojas de lechuga romana bajo dos perspectivas de la hoja, haz (izquierda) envés (derecha).	61

Figura 27.	Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda en hojas de lechuga romana provocados por la cepa BV157 8 DDI.	62
Figura 28.	Bulbos de nardo infectados con las cepas seleccionadas (BV145, BV152, BV157).	63
Figura 29.	Síntomas de pudrición en bulbos de nardo provocados por la cepa BV157 5 DDI.	64
Figura 30.	Síntomas de pudrición en bulbos de nardo provocados por la cepa BV157 en la parte contraria al lugar del inóculo 10 DDI.	65
Figura 31.	Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda en bulbos de nardo provocados por la cepa BV157 15 DDI.	65
Figura 32.	Desarrollo de la pudrición blanda en bulbos de nardo provocada por la cepa BV157 20 DDI.	66
Figura 33.	Síntomas iniciales de pudrición blanda en bulbos de nardo provocados por <i>E. chrysanthemi</i> 5 DDI.	67
Figura 34.	Desarrollo de los síntomas provocados por <i>E. chrysanthemi</i> en bulbos de nardo en la zona de inoculación 10 DDI.	67
Figura 35.	Coloración marrón en bulbos de nardo causada por <i>E. chrysanthemi</i> en la parte posterior al lugar de la infección 15 DDI.	68



- Figura 36. Pudrición blanda extendida sobre todo la superficie del bulbo, provocada por *E. chrysanthemi* 20 DDI. 69
- Figura 37. Bulbo de nardo inoculado con Buffer fosfato, utilizado como testigo negativo. 69
- Figura 38. Comparación de los síntomas de pudrición blanda en bulbos de nardo provocados por las cepas BV157 y *E. chrysanthemi*. 70

## INDICE DE CUADROS

	<b>PAGINA</b>
Cuadro 1. Cepas bacterianas de referencia utilizadas en este estudio.	29
Cuadro 2. Cepas aisladas a partir de bulbos de nardo enfermos provenientes del municipio de Emiliano Zapata, Morelos.	36
Cuadro 3. Resultados de la tinción de Gram y Prueba de Ryu de las cepas cultivadas en medio M9+PGA 0.2 %.	37
Cuadro 4. Pruebas de producción de pectinasas (PEL) y celulasas (CEL) a partir de medio rico (LB).	39
Cuadro 5. Pruebas de producción de pectinasas (PEL) y celulasas (CEL) a partir de medio mínimo M9+PGA 0.2 % durante 48 h de crecimiento.	40
Cuadro 6. Morfología de las colonias bacterianas seleccionadas en medio LB.	41
Cuadro 7. Características morfológicas de las cepas bacterianas en los medios King A y King B.	44
Cuadro 8. Características de pureza del ADN utilizado en este estudio.	45

# ESTUDIO DEL AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN BLANDA EN NARDO DEL ESTADO DE MORELOS

## 1. RESUMEN

El Estado de Morelos, ocupa el primer lugar en la producción de flor de nardo (*Polianthes tuberosa*). Sin embargo, en los últimos años se ha presentado una disminución hasta en un 50 % en el rendimiento del cultivo a consecuencia del daño provocado por *Scyphophorus acupunctatus* (picudo negro) y la presencia de una enfermedad de tipo bacteriano, que afectó al bulbo de nardo provocándole pudrición blanda, que se caracterizó por la presencia de manchas acuosas y la maceración del tejido. Teniendo en cuenta estos antecedentes la hipótesis de esta investigación fue que la pudrición blanda que se presenta en los bulbos de nardo en la región productora del Estado de Morelos se debía a la presencia de bacterias que producen pectinasas y celulasas que degradan los componentes de la pared celular, pertenecientes al género *Erwinia* (*Dikeya*). A partir de bulbos de nardo enfermos colectados en las zonas productoras del Municipio de Emiliano Zapata, Morelos se aisló la cepa BV157 cuyas colonias fueron verde-azuladas planas de borde dentado lisas y con un fuerte olor a uvas jóvenes, capaz de provocar pudrición blanda en bulbos de *Polianthes tuberosa* (nardo) y hojas de *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis), *Saintpaulia ionantha* (violeta africana) y *Lactuca sativa* (lechuga romana) a una temperatura entre 28-30°C y humedad relativa de 100 %. Los análisis bioquímicos, morfológicos y moleculares utilizados para la identificación, permiten afirmar que la cepa aislada (BV157) no pertenece al género *Erwinia*; sin embargo debido a las características observadas en el estudio probablemente BV157 pertenece a la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Con el objetivo de verificar esta hipótesis se propone secuenciar el 16S de esta cepa con el fin de hacer un análisis bioinformático.

## 2. INTRODUCCIÓN

La vida del hombre está íntimamente unida a su ambiente, en especial a los vegetales. El conocimiento y utilización total del mundo vegetal es una meta llena de recompensas intelectuales y materiales que a lo largo del tiempo el hombre ha utilizando en su beneficio. Las plantas, siempre han sido importantes para el bienestar de los pueblos, no sólo como alimento sino también como parte de su cultura (Frits, 1981). En México la floricultura representa una excelente fuente de ingresos para la economía nacional, toma lugar en los siguientes estados: Baja California Norte, Chiapas, Colima, Distrito Federal, Jalisco, Estado de México, Morelos, Puebla, Veracruz, Yucatán, Michoacán y Guerrero.

De acuerdo con los reportes del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos (CESVMOR, 2009) el estado tiene las condiciones de clima y suelo adecuados para el cultivo de ornamentales. De esta manera se ha convertido en el principal productor de plantas de ornato del país, lo que le representa una fuente de captación de recursos económicos. El nardo (*Polianthes tuberosa*) es una de las plantas ornamentales más cultivadas para aprovechar su flor, por sus características y perfume.

La vara de San José (nardo) como se le conoce popularmente, es una geófito de la familia Agavaceae, es originaria de México y en la actualidad se ha difundido en Centroamérica, toda Europa y Asia (Longoni *et al.*, 2002). La forma convencional de propagación del nardo es asexual, mediante bulbos que se generan de bulbillos laterales, conformando generalmente un grupo con individuos estrechamente unidos (Longoni *et al.*, 2002). Cuando los bulbos plantados tienen más de 8 cm de perímetro, las plantas llegan a floración.

De acuerdo con la SAGARPA (2010) el cultivo de nardo es una de las actividades agrícolas que deja más derrama económica, esto al considerar que por cada hectárea se alcanzan rendimientos anuales de hasta 4500 gruesas de flores de corte, con precio promedio de 100 pesos por gruesa. En los últimos años la rentabilidad del cultivo se ha visto amenazada por problemas fitosanitarios, que

son provocados por el picudo negro. Su daño en el cultivo se debe a que la mayor parte de su ciclo biológico se desarrolla dentro de los tejidos vegetales de la planta, cuando las hembras ovipositan dentro de los bulbos. Cada planta, tiene una infestación de 4-36 adultos (Gonzaga, 2008), esto ocasiona la pudrición y muerte del nardo cuando es muy joven, asimismo favorece la entrada de plagas secundarias y de microorganismos patógenos.

Actualmente importantes cultivos comerciales a nivel mundial, presentan pérdidas millonarias de hasta un 60 % de la producción total a causa de enfermedades infecciosas provocadas por fitopatógenos. En lo que corresponde a la pudrición de bulbos de nardo, en el Estado de Morelos el conocimiento que se tiene en relación al diagnóstico de esta enfermedad es escaso, se carece de estudios de etiología y de estimación de pérdidas causadas por estos patógenos, por lo que urge se identifiquen plenamente los agentes causales de la pudrición en esta planta ornamental. Esto permitirá generar una estrategia de control biológico innovadora, la cual pueda solucionar los problemas fitosanitarios actuales, además de lograr reducir la contaminación ambiental por el uso de agroquímicos. Por lo que el objetivo de esta investigación fue caracterizar e identificar el agente causal de la pudrición blanda del cultivo de nardo en el Estado de Morelos.

### **3. MARCO TEORICO**

#### **3.1. IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN LAS PLANTAS**

Las enfermedades infecciosas de las plantas son muy importantes para el hombre, por que causan problemas y disminuyen la producción de alimentos; debido a ello pueden marcar la diferencia entre una vida normal y una vida acosada por hambre en el caso de las personas que viven en regiones donde los alimentos son escasos.

Por otra parte, estas enfermedades, afectan el medio ambiente al provocar la desaparición de especies muy susceptibles a cierta infección y con ello causar un desequilibrio en el ecosistema. En general, a lo largo de la historia y hasta nuestros días las enfermedades de las plantas pueden propiciar desnutrición, inanición, emigración y muerte de personas y animales (Agríos, 1998). El monto de las pérdidas es variable en cada región, depende de ciertos factores como son: la especie de vegetal afectada, los productos que se obtienen de ella, el agente causal, las condiciones ambientales de la región y finalmente las medidas de control. Estos problemas, han llevado a la creación de una industria dedicada a la elaboración de productos químicos y maquinaria necesaria para el combate de enfermedades en plantas.

### 3.2. LA PUDRICIÓN BLANDA EN LAS PLANTAS

La pudrición blanda es un síntoma que se puede presentar en todos los órganos de la planta, dependiendo del patógeno que lo cause y de las condiciones del ambiente; éste se encuentra en raíces, tallos y hojas. La enfermedad se caracteriza por la maceración del tejido parenquimatoso que termina en la desintegración del tejido dañado que en ocasiones produce un color blanco o pardo. En la pudrición blanda se presenta un olor desagradable que frecuentemente es causado por organismos secundarios. Según Ephinstone (1987), puede iniciarse en lenticelas o heridas y propagarse rápidamente a todas las partes de la planta, sin embargo en un ambiente seco, el deterioro se puede reducir a pequeñas partes secas, oscuras y hundidas. La cual es causada por numerosas especies de hongos y bacterias, que son capaces de provocar el síntoma mediante una serie de elementos químicos y mecánicos.

### 3.2.1 Pudrición blanda causada por hongos

La pudrición blanda incitada por hongos se produce cuando estos se adhiere a la superficie del huésped con la ayuda de apresorios formados por el micelio, de ese modo penetra la cutícula por presión mecánica (Tariq y Jeffries, 1987). Provocando la desintegración de la pared celular, lo cual facilita el desarrollo progresivo sobre la superficie del tejido afectado causando así la pudrición blanda. La disolución de la pared celular se realiza a través de enzimas pécticas entre las que se encuentran las isoenzimas endopoligalacturonasas responsables de la hidrólisis del ácido poligalacturónico (Favaron *et al.*, 1992). También enzimas como las lipolíticas contribuyen a la penetración.

### 3.2.2 Las fitóbacterias como agentes causales de la pudrición blanda

Con relación a las bacterias, el reconocimiento de las mismas como agentes causales de enfermedades en plantas comenzó desde hace alrededor de 100 años. En una década (1877-1887) T. J. Burrell y J. C. Arthur en Estados Unidos, trabajaron con tizón violento o fogón de las pomáceas; J. H. Walker en Holanda, estudió el amarillamiento del Jacinto y Savastano en Italia, describió el mal negro de la vid (Agrios, 1998).

Las bacterias afectan a las plantas, debido a que durante su desarrollo evolutivo adquirieron la capacidad de aprovechar las sustancias que se encuentran en el interior de la célula vegetal, entran en el apoplasto y desde esta localización provocan serios daños en numerosas plantas cultivadas (Llama, 2002). Estas, son lo suficientemente pequeñas como para entrar en forma pasiva a través de estomas y otras aperturas naturales, pero no todas son capaces de ingresar de esta forma, por lo que es necesario contar con mecanismos para vencer las barreras de la planta. La mayoría de las bacterias responsables de causar problemas en plantas son Gram (-); por ejemplo *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae*.

### 3.3. PRINCIPALES MECANISMOS DE PATOGENICIDAD EN FITOBACTERIAS

Los componentes de las células vegetales, no siempre se encuentran de forma disponible para las bacterias, por lo que deben ser transformados en unidades más simples para que éstas los puedan absorber y asimilar. Además, para que una bacteria infecte una planta tiene que tener la capacidad de secretar compuesto químicos que degraden los componentes de la pared celular de su hospedero (Agrios, 1998).

#### 3.3.1. Sustancias químicas que causan la pudrición blanda

Los principales grupos de sustancias que secretan los patógenos en las plantas ya sea directa o indirectamente, incluyen enzimas, toxinas y polisacáridos; probablemente en este orden de importancia participan en el desarrollo de las pudriciones blandas (Collmer y Keen, 1986).

#### 3.3.2 Enzimas

Las enzimas, son moléculas de naturaleza proteica que catalizan todas las reacciones de una célula viva, por lo que para cada reacción dentro de la célula existe una enzima (Gaitán, 2007). Las bacterias fitopatógenas, tienen la capacidad de secretar enzimas de manera innata durante toda su existencia o al entrar en contacto con un sustrato, estas desintegran los componentes estructurales de las células vegetales degradando las sustancias nutritivas e inertes y afectando directamente el protoplasto interfiriendo con sus sistemas funcionales.

*E. chrysanthemi* 3937, es una enterobacteria capaz de provocar pudrición blanda en numerosos cultivos comerciales (Perombelo y Kelman, 1980) mediante la secreción de enzimas pectolíticas responsables de la degradación de la pared celular de las células vegetales. La cepa *E. chrysanthemi* por lo menos secreta siete pectato liasas (enzimas pectolíticas), dos pectina metil esterases, una



poligalacturonasa, además de transeliminadas (pectina liasas) celulasas proteasas y una fosfolipasa (Collmer y Keen, 1986). La mayoría de la pectinasas y celulasas se secretan al medio externo a través de un sistema de secreción tipo II.

Esta bacteria tiene la capacidad de modular su maquinaria pectolítica a través de complejos sistemas de regulación que le permiten el perfeccionamiento de la expresión génica. Por ejemplo los genes responsables de la producción de pectinasas se expresan en cistrones independientes y su transcripción se favorece por las condiciones ambientales, tales como la presencia de pectina, los extractos de la planta, la fase estacionaria de crecimiento, bajas temperaturas, el oxígeno o un limitante de hierro entre otros factores ambientales (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996).

### 3.3.3 Toxinas

Las toxinas, actúan directamente sobre los protoplastos vivos de su hospedante y ocasionan daños considerables o incluso pueden destruir a las células de una planta. Algunas de ellas actúan como venenos protoplásmicos generales que afectan muchas especies vegetales. Estas actúan en su hospedante afectando la permeabilidad de su membrana celular o al inactivar o inhibir a las enzimas e interrumpir sus reacciones enzimáticas. Algunas enzimas actúan como antimetabolitos que propician la deficiencia de un factor esencial para el desarrollo normal.

Las toxinas son metabolitos secundarios, mayoritariamente péptidos pequeños. Entre estas toxinas se encuentra la siringomicina, la coronatina, la faseolotoxina, la tabtoxina y la tentoxina (Gross, 1991).

La tentoxina es un tetrapéptido cíclico que se une e inactiva a una proteína (factor de acoplamiento del cloroplasto) que interviene en la transferencia de energía en los cloroplastos y también inhibe la fotofosforilación del ADP en ATP. La

inactivación de la proteína y la inhibición de la fotofosforilación son más marcadas en especies vegetales susceptibles a la clorosis después de tratarlas con la tentoxina que en especies no sensibles a esta toxina. En especies sensibles, la tentoxina interfiere con el desarrollo normal del cloroplasto y causa clorosis al interferir con la síntesis de clorofila, pero no se sabe si estos efectos sólo están relacionados al proceso de unión de la tentoxina a la proteína de acoplamiento del cloroplasto (Walton, 1996). Un efecto adicional, pero que al parecer no tiene relación, que muestra la tentoxina sobre las plantas sensibles es que inhibe la actividad de las polifenoloxidasas, enzimas que intervienen en diferentes mecanismos de resistencia de las plantas. Ambos efectos de esta toxina influyen sobre la planta hospedante con cambios que le causan clorosis, e inhibición de sus mecanismos de resistencia tienden a aumentar la virulencia del patógeno (Hutchison *et al.*, 1995). Sin embargo, aún se desconoce el sitio molecular de acción de la tentoxina, así como el mecanismo exacto mediante el cual produce estos efectos.

#### 3.3.4 Polisacáridos de la membrana

Otros elementos celulares que intervienen en la patogenicidad de las bacterias son los polisacáridos de la membrana externa, los cuales generan una serie de enfermedades al inhibir las señales activadoras de defensa de la planta y al bloquear los tejidos de conducción (Denny, 1995).

#### 3.4 DEGRADACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

El primer contacto que tiene una bacteria con la planta se da en su superficie, la cual está constituida por una cutícula que presenta una impregnación de cera. Las paredes de las células epidérmicas contienen también proteínas y lignina. Por su parte los tejidos parenquimatosos constan de celulosa, hemicelulosa y pectinas, las cuales constituyen la mayor parte de la lámina media (Figura 1). En concordancia con Agrios (1998) la desintegración total de los tejidos de una planta

inicia con la degradación de cada uno de los componentes de la pared celular, mediante la acción de enzimas secretadas por las bacterias.

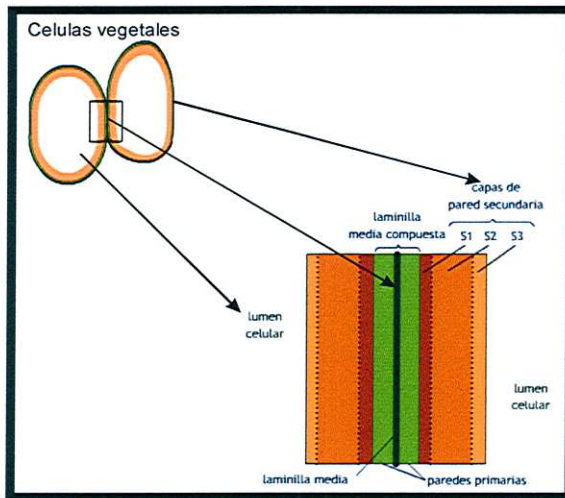


Figura 1. Esquema de la lámina media y la pared celular primaria y secundaria (tomado de [www.biologia.edu.ar/botánica](http://www.biologia.edu.ar/botánica)).

### 3.4.1 Componentes de la pared celular

La **cutina** es el principal componente de la cubierta cuticular. Se encuentra formada por ceras mezcladas con pectina y celulosa. Algunas bacterias como *Streptomyces scabies* (Agrios, 1998) producen cutinasas, enzimas capaces de degradar esta cubierta. Las cutinasas son enterasas que rompen los enlaces éster que forman las moléculas de cutina liberando monómeros derivados de los ácidos grasos del polímero de cutina.

Las **sustancias pecticas** son el componente principal de la lamina media, que mantiene en su sitio a las células de los tejidos vegetales, también son parte de la pared celular primaria en donde forman un gel amorfo que rodea los espacios entre las microfibrillas de celulosa. Las sustancias pecticas son polisacáridos de

ácido galacturónico entremezclados con un número mucho menor de moléculas de ramnosa y otros azúcares.

Las enzimas conocidas como pectinasas o enzimas pectolíticas degradan las sustancias pecticas, al cortar las cadenas pectínicas liberando porciones más pequeñas de ellas que contienen una o varias moléculas de ácido galacturónico (Collmer *et al.*, 1982).

Las pectina metil esterasas cortan pequeñas ramificaciones de las cadenas pectínicas sin afectar la longitud, pero alteran su solubilidad e influyen sobre la velocidad a la que son atacadas por ellas. Las pectinasas separan las cadenas pecticas y liberan porciones más pequeñas de ellas que contienen una o varias moléculas de ácido poligalacturónico. Por su parte las poligalacturonasas rompen las cadenas pectínicas al añadir una molécula de agua e hidrolizan el enlace entre dos moléculas de ácido galacturónico; otras las pectina-liasas o transeliminadas rompen las cadenas eliminando una molécula de agua del enlace y rompiéndolo liberando productos que poseen un doble enlace insaturado. Cada una de estas enzimas existe en tipos que pueden romper las cadenas pectínicas en varios puntos al azar (endopectinasas) y liberar cadenas más cortas o que rompen sólo el enlace terminal (exopectinasas) de las cadenas y liberan unidades separadas de ácido galacturónico (Collmer *et al.*, 1982).

Los patógenos parecen producir en todo momento pequeñas cantidades de enzimas pectolíticas cuya secreción es estimulada por la presencia de polímeros de ácido galacturónico. Se ha demostrado que estas enzimas participan en el desarrollo de la pudrición blanda de los tejidos vegetales, al provocar la degradación de las sustancias pecticas y debilitar las paredes celulares, lo cual produce la maceración de tejidos y facilita la entrada del patógeno al apoplasto y al interior de la célula vegetal.

La **celulosa** es un polisacárido formado por cadenas de moléculas de glucosa unidas a través de puentes de hidrogeno. En todas las plantas, la celulosa forma parte de la estructura básica de las paredes celulares. Su proporción en los tejidos vegetales es variada.

La degradación de la celulosa se realiza mediante celulasas. Existen tres tipos de estas enzimas; la celulasa  $C_1$  que rompe los enlaces transversales formados entre las cadenas. Una segunda celulasa es la  $C_2$  que rompe la cadena en unidades más cortas, que después son atacadas por un tercer grupo de celulasas conocidas como  $C_x$  que las degradan hasta el disacárido celobiosa. Por último, la celobiosa es degradada por la enzima  $\beta$ -glucosidasa, a glucosa (Gaitán, 2007).

Las celulasas, se producen en etapas tardías de la infección; no solo son secretadas por las bacterias que inician la enfermedad, sino que también por bacterias saprofitas, por lo que no se consideran importantes en el inicio de la enfermedad.

**Hemicelulosa**, es una mezcla de polímeros de polisacáridos, cuya proporción y composición varía entre los tejidos de las plantas, la especie y el desarrollo de la misma. La hemicelulosa forma parte de la lámina media, la pared celular primaria y secundaria donde es uno de los principales componentes. Los polímeros de hemicelulosa incluyen xiloglucano, glucomananos, arabinogalactanos entre otros monómeros (Taiz y Zeiger, 1991).

La hemicelulosa es degradada por hemicelulasas. Dependiendo del monómero en el cual actúa la enzima en particular se denominan xilasa, galactasa, glucanasa etc.

### 3.5 RESPUESTA DE LAS PLANTAS CONTRA PATOGENOS

En la naturaleza las plantas están expuestas a un gran número de organismos patógenos, en general contrarrestan su ataque por barreras físicas estructurales

que impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, o por medio de reacciones bioquímicas, que tienen lugar en las células y tejidos los cuales producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo. La respuesta de defensa, varía de acuerdo con el tipo de órgano especie de planta y las condiciones ambientales en las que es atacada (Tam *et al.*, 1999).

### 3.5.1 Defensa estructural

Algunas estructuras de defensa se encuentran ya en las plantas antes de que el patógeno entre en contacto con ellas. Esas estructuras incluyen la cantidad y la calidad de la cera y de la cutícula que cubren a las células epidérmicas, la estructura de las paredes celulares, el tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas y por último, la presencia en la planta de tejidos protegidos por paredes celulares gruesas que obstaculizan el avance del patógeno (Agrios, 1998).

### 3.5.2 Defensa bioquímica

La segunda línea de defensa en las plantas y probablemente la más efectiva, es la producción de sustancias inhibitorias ante el ataque de ciertos patógenos.

#### Péptidos antimicrobianos de plantas

Los péptidos antimicrobianos, son parte del sistema de defensa de las plantas su actividad es incrementada una vez que el microorganismo se pone en contacto con la planta. Por lo general los péptidos están constituidos por proteínas de bajo peso molecular, las cuales desestabilizan la membrana de la bacteria. Comúnmente se encuentran rodeando los tejidos vegetales formando una barrera antimicrobiana (Llama, 2002).

## Estrés oxidativo

Es un mecanismo que la planta acciona una vez que interacciona con un patógeno, las células vegetales sufren un choque oxidativo produciendo oxígeno activo que afectan directamente al patógeno y a la vez inducen una respuesta sistémica en los tejidos adyacentes al lugar de la infección, esto provoca el reforzamiento de la pared celular y evita la proliferación y diseminación del patógeno al resto de la planta (Doke, 1993).

## Respuesta de hipersensibilidad

Aunque las bacterias del género *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Ralstonia* tienen un gran número de hospederos, presentan especificidad en sus huéspedes y producen respuesta de hipersensibilidad en los no huéspedes. Esta respuesta, es dirigida por genes que codifican para un sistema de secreción de tipo III, el cual produce proteínas intracelulares y extracelulares que originan la apoptosis de las células vegetales al entrar en contacto con el patógeno. Como consecuencia de la muerte celular, se produce una lesión en el lugar donde se encuentra el patógeno (Levine *et al.*, 1994).

## 3.6 TRIÁNGULO DE PATOGENICIDAD

Sólo porque la planta es susceptible a alguna enfermedad no significa que se va a enfermar. Para que una enfermedad pueda ocurrir, se tienen que dar conjuntamente tres factores: 1) la planta debe ser susceptible a la enfermedad, 2) el patógeno que causa la enfermedad debe estar presente para que pueda infectar a la planta y 3) el medio ambiente debe ser propicio para el desarrollo de la enfermedad. Si alguno de estos componentes no está presente en este "triángulo de la enfermedad" entonces ésta no va a ocurrir (Martínez, 2009).

### 3.7 EL CULTIVO DE ORNAMENTALES DEL ESTADO DE MORELOS

#### 3.7.1 Aspectos productivos, económicos y daños ocasionados por problemas fitosanitarios en cultivos ornamentales

El sistema producto de ornamentales en México, cuenta con una diversidad de formas con volúmenes de producción de entre 1,235.9 y 6'052,938.5 ton con un valor de \$ 37'026,916 pesos y \$ 70'879,909 pesos para las producciones en vivero y flor de corte, respectivamente (SAGARPA, 2010), lo que indica un alto valor de remuneración por superficie de producción.

La producción de flores de corte (rosa, gladiolo, nardo), es a cielo abierto, por lo que no requiere de procesamiento, sólo el manejo de empaque para su transporte a lugares cercanos o distantes, ya que su comercialización es local, nacional y de exportación. Sin embargo, en los últimos años su comercialización se ha visto afectada, por problemas fitosanitarios. Respecto a este problema se encontró la presencia de la roya del gladiolo *Uromyces transversalis* en Morelos, por lo cual la Dirección General de Sanidad Vegetal, declaró acciones emergentes para su control (CESVMOR, 2009). Esta enfermedad, afectó principalmente el follaje del cultivo, lo que ocasionó serios daños económicos a la producción y demeritó la calidad de la flor para su comercialización.

En 2005 se programó y ejecutó la campaña de caracterización fitosanitaria de ornamentales, con un presupuesto del 6.25 % del total, otorgado por la SAGARPA para combatir problemas fitosanitarios en el centro del país, aproximadamente se destinaron un total de \$ 3' 750, 000 pesos como respuesta a una necesidad de los productores ante esta problemática. Sin embargo, aunque estos programas lograron identificar fitopatógenos en gladiolo, no arrojaron datos sobre los agentes causales de la pudrición en el cultivo de nardo.

#### 3.7.2 El cultivo de nardo del Estado de Morelos



El nardo, es una de las plantas ornamentales más cultivadas para aprovechar su flor por sus características y perfume. Morelos es el principal productor de esta flor ornamental a nivel nacional, ya que tiene las condiciones de clima y suelo que favorecen su cultivo y por consecuencia tiene la mayor superficie cultivada respecto a otros estados. Se cultiva en los municipios de Tepalcingo, Puente de Ixtla, Mazatepec, Cuautla, Yautepec, Temixco, Coatlan del Río, Emiliano Zapata, entre otros (CESVMOR, 2009).

### 3.8 EL NARDO (*Polianthes tuberosa*)

El nardo es una geófito de la familia de las Agaváceas, con varias especies de alto valor ornamental e industrial. Es originario de México y se encuentra distribuido en toda Centroamérica, Europa y Asia (Longoni *et al.*, 2002).

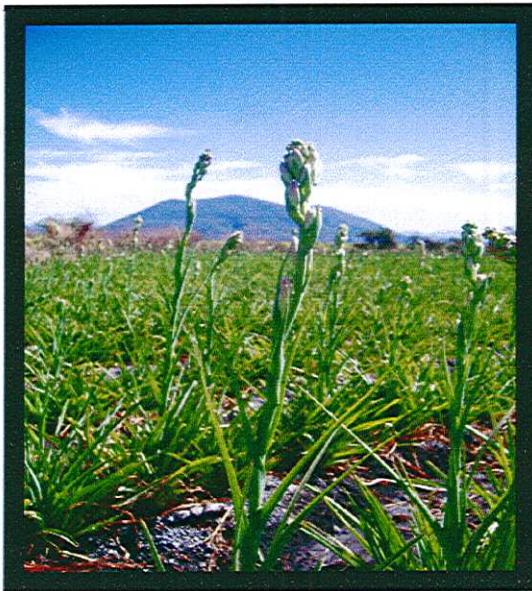


Figura 2. Flores de nardo (*Polianthes tuberosa*) cultivadas en parcelas de Emiliano Zapata, Morelos.

Las flores son hermosas y perfumadas, presentan tallos modificados en forma de tubérculos; su desarrollo es de día largo, por tal razón su plantación se realiza en primavera (Figura 2). La floración se produce entre finales y principio del otoño en el hemisferio sur y en los meses de septiembre y octubre en el hemisferio norte. Regularmente la vara de nardo alcanza el metro de altura, su espiga suele durar más de 40 d en disposición de ser cortada y las flores se recogen por la mañana, procurando cortarlas desde la base y sin hojas, ya que éstas deben mantenerse para completar el ciclo de multiplicación de nuevos bulbos, que por regla general se extraen del suelo a la llegada de la estación fría. El cultivo de nardo se realiza en suelos bien drenados y ricos en materia orgánica, con menor proporción de arcilla y arena (Figura 3).



Figura 3. Parcela de nardo en plena producción, Emiliano Zapata, Morelos.

El cultivo de nardo, es uno de los diez cultivos que deja más derrama económica en Morelos, esto al considerar que por cada hectárea se alcanzan rendimientos anuales por hasta 4,500 gruesas de flores de corte, con precio promedio de \$100 pesos por gruesa (SAGARPA, 2010). Para el año 2006 se obtuvo un valor de producción de \$ 6'885,000 pesos, generando de acuerdo con el diagnóstico estatal de la Fundación Produce un total de 824,066 empleos (CESVMOR, 2009). La demanda del nardo es muy importante, muchos de los productos del estado son comercializados nacional e internacionalmente, considerando que existen diversas fuentes proveedoras de estos productos, se infiere una competencia permanente y una necesidad de innovación, fortalecimiento y consolidación (CESVMOR, 2009).

En los últimos años la rentabilidad del cultivo de nardo se ha visto amenazada por problemas fitosanitarios, inducidos por insectos y enfermedades de tipo bacteriano, que tienen que ser combatidos con tratamientos de control convencionales, cuyos costos afectan la producción total (CESVMOR, 2009). De acuerdo con la Fundación Produce Morelos, desde el año 2006, la producción de nardo en Morelos se vio afectada hasta en un 50 %, por la presencia de picudo negro.

### 3.8.1 Identificación y caracterización de patógenos en cultivos ornamentales de México

A nivel nacional, existe poca información acerca de la fitopatogénesis de las principales enfermedades que atacan los cultivos ornamentales. Entre los estudios de este tipo se encuentran los siguientes: en el Estado de México, Sartí (1994) citado por García *et al.* (2005) identificó a *Puccinia horiana* como el causante de la roya blanca. Presumiblemente esta enfermedad se introdujo al país a través de importaciones de material de propagación o esquejes, debido a la falta de control en la movilización de material vegetativo y de flores. Esta enfermedad, se encuentra en varios estados de la República.

También García *et al.* (2003) determinaron la fitopatogénesis responsable de la marchitez en crisantemo en la zona de Villa Guerrero Estado de México. Las plantas presentaban síntomas de marchitez consistentes en flacidez de hojas y necrosis de tallo basal. Para identificar el agente causal de la enfermedad, realizaron siembras de tejido enfermo en cajas de Petri con medio papa-dextrosa agar, obtuvieron colonias de dos hongos los cuales purificaron, analizaron e identificaron, encontraron a *Fusarium* sp. y *Mucor* sp. como agentes causales de la marchitez.

Por su parte Gabino *et al.* (2004), en cercanías de Comitan Chiapas, Veracruz y Puebla estudiaron bacterias asociadas a la hoja de la orquídea *Lycaste aromatica* que exhibían manchas necróticas. Los géneros aislados y caracterizados por pruebas bioquímicas fueron *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Bacillus*; estudios posteriores mostraron que ninguno de los organismos aislados fue patógeno para esta especie ornamental. Villanueva y Sánchez (2005) diagnosticaron a *Alternaria chrysanthemi* como el agente causal del Tizón foliar de crisantemo en el Estado de Yucatán. Aquino y Vázquez (2008) reportaron que los rendimientos en la producción del cultivo de clavel de la zona florícola del Estado de México, se vieron afectados por la enfermedad conocida regionalmente como "dormilona" causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, con una incidencia de 28 y 42 % del total del área de siembra.

### 3.8.2 Patógenos en el cultivo de nardo del Estado de Morelos

En lo que respecta a la identificación de microorganismos patógenos y plagas en el cultivo de nardo del Estado de Morelos, el laboratorio de Agrobiagnóstico FITOLAB (2008) encontró en partes aéreas de planta la presencia de ácaros de la familia Tetranychidae, el más común es la especie *Tetrany chusurticae*. En las flores se encontró la presencia de trips *Frankliniella occidentalis*, además del picudo negro, coleóptero de la familia Curculionidae. Asociado a raíces con síntomas de agallas, se identificó al nemátodo *Meloidogyne incognita*, así como

también identificaron a *Fusarium* sp., como el causante de la pudrición de bulbos, marchitez y muerte de las planta. En las pudriciones del ápice de las inflorescencias, encontraron al hongo *Alternaria* sp., el cual está asociado con las enfermedades conocidas como tizones.

Por otra parte, aun no se han reportado estudios sobre bacterias que provoquen pudrición en el cultivo de nardo.

Sin embargo, estudios de patogénesis en el cultivo de *Agave tequilana* que al igual que el nardo pertenece a la familia de las Agaváceas, el picudo negro representa un serio problema en su rentabilidad cuando la larva del insecto barrena la parte central del maguey y causa su pudrición, por lo que se considera un medio natural para la entrada de bacterias. Sobre esto Rodríguez-Garay *et. al.* (2004), señala la hipótesis de que el picudo del agave pudiera ser un vector natural que introduce a la bacteria *Erwinia* sp. a la planta. Asimismo, otros autores como Fucikovsky (2004) indica que en los tejidos enrojecidos cercanos a las galerías causadas por las larvas de los picudos se han detectado bacterias fitopatógenas, por lo que se piensa que los picudos al entrar a los tejidos de la piña del agave, tienen en sus cuerpos bacterias que pueden introducir a la planta. Por otra parte Solis *et al.* (1999) proponen que el picudo negro es atraído por las pudriciones de la planta.

La sintomatología que presentan las plantas de nardo cuando son atacadas por el picudo negro, se relaciona con pudrición blanda, por lo que se piensa que al entrar el insecto en los tejidos de la planta favorece la colonización de bacterias fitopatógenas y oportunistas las cuales en su conjunto causan la enfermedad.

### 3.9 TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FITOBACTERIAS

Para el diagnóstico y detección de patógenos normalmente se utilizan técnicas microbiológicas clásicas que pueden ser tardadas. Sin embargo, hoy en día se

han desarrollado técnicas inmunológicas, genético-moleculares y de hibridación de ácidos nucleídos que permiten tener resultados confiables en poco tiempo.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR (de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), es una técnica que permite sintetizar *in vitro* un segmento específico de ADN, a través de ciclos térmicos repetidos. La síntesis de ADN se efectúa mediante iniciadores, los cuales se hibridan con segmentos de ADN de cuya secuencia complementaria delimita los límites del fragmento a sintetizar. La PCR es una técnica que posee innumerables aplicaciones entre las cuales destaca el diagnóstico específico de patógenos (Bej *et al.*, 1991).

### Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una serie de técnicas que funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma, se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997). Se usan para el mapeo genético, como el primer paso para encontrar la posición e identidad de un gen, en estudios de genética humana, vegetal, animal y microbiana. Los marcadores moleculares permiten evidenciar polimorfismos en la secuencia del ADN entre dos individuos.

### RFLPs

Los RFLPs (de sus siglas en inglés polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) fue el primer marcador de ADN utilizado por biólogos poblacionales (Parker *et al.*, 1998). Este marcador evidencia diferencias específicas del ADN que fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las endonucleasas (de origen bacteriano), reconoce y corta solamente una secuencia específica en el ADN, siempre y cuando éstas no estén protegidas

(metiladas). Por consiguiente cualquier ADN que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLPs al comparar dos o más genomas (Valadez y Kahl, 2000). Para amplificar los RFLPs se puede utilizar la PCR.

## RFLP-PCR

Los RFLPs son causados por mutaciones del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que genera una ganancia o pérdida de sitios de restricción, detectados a través de diferencias en el tamaño de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico total o un segmento específico amplificado por PCR. Con el producto amplificado se realiza una digestión con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes de la digestión son separados por electroforesis, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o con poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (Karl *et al.*, 1992).

Los RFLPs generalmente se han utilizado para construir mapas genéticos, para la clonación de genes y para ayudar a resolver problemas taxonómicos o filogenéticos.

## ITS (Espacio Transcrito Intergénico del ARN ribosomal 16S-23S)

Para realizar la identificación molecular de algunas fitobacterias del género *Erwinia* mediante la técnica RFLP-PCR, se ha utilizado el Espacio Transcrito Intergenico (de sus siglas en inglés ITS) del ARN ribosomal 16S-23S (Jensep *et al.*, 1993). Los ITS consisten en espacios que se encuentran entre los genes ribosomales 16S-23S cuyas secuencias presentan un alto grado de variación a nivel de género y especies en procariontes (Barry *et al.*, 1991). El método más rápido y certero para visualizar el polimorfismo de estas regiones intergénicas es llevar a cabo la amplificación de los segmentos mediante PCR, con los iniciadores G1 y L1 que

son seleccionados por su unión a secuencias altamente conservadas de los genes 16S y 23S (Figura 4).

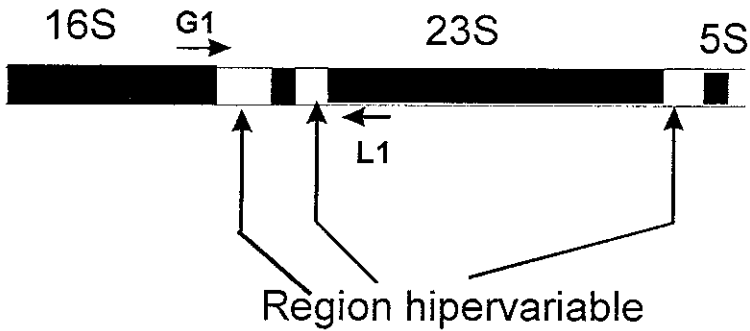


Figura 4. Esquema representativo de un operón de rRNA, donde se muestran los espacios intergénicos 16S-23 (ITS), así como los cebadores G1 y L1 utilizados para su amplificación por PCR (Tomado de Jensen *et al.*, 1993).

Los espaciadores ITS1 e ITS2 presentan elevadas tasas de sustitución. Consistentes en repeticiones en *tandem* que se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica (Hills y Dixon, 1991).



#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A partir de la década de los noventa, la producción de nardo se vio afectada por problemas fitosanitarios causados principalmente por insectos y microorganismos cuyos síntomas son pudrición de bulbos y marchitez de hojas. Esta situación, representa grandes pérdidas económicas para los productores de nardo, quienes emplean más del 50 % de sus ganancias en tratar de contrarrestar esta problemática.

## 5. JUSTIFICACIÓN

En México, la floricultura representa una importante fuente de ingresos a nivel nacional; de acuerdo con los reportes de la CESVEMOR (2009). El Estado de Morelos cuenta con las condiciones de clima y suelo adecuadas para el cultivo de nardo, por lo que es uno de los principales productores del país. El cultivo de nardo, es una de las actividades agrícolas que deja más derrama económica para quienes se dedican a esta actividad; según la SAGARPA (2010) por cada hectárea cultivada se alcanzan rendimientos anuales hasta de 4500 gruesas de flores de corte con precio promedio de \$ 100 pesos por gruesa. Sin embargo, hoy en día los rendimientos del cultivo han disminuido debido al mal manejo de problemas fitosanitarios, entre los que se encuentra la pudrición de bulbos, cuyo agente causal no se ha diagnosticado en su totalidad. El laboratorio de diagnóstico fitosanitario FITOLAB (2008) determinó a *Fusarium* sp., como el agente causal de la pudrición de bulbos de nardo; sin embargo, los síntomas de pudrición también están asociados con bacterias fitopatógenas y hasta hoy no existen estudios que lo comprueben. Por lo que en esta investigación se aislaron y caracterizaron bacterias a partir de la pudrición de bulbos de nardo de la zona productora del Estado de Morelos y con estos resultados se determinó el agente causal, con el fin de planear una estrategia de control biológico innovadora, la cual pueda solucionar los problemas fitosanitarios a los que se enfrenta este importante cultivo.

## 6. HIPÓTESIS

La pudrición blanda que se presenta en los bulbos de nardo en la región productora del Estado de Morelos se debe a la presencia de bacterias que producen pectinasas y celulasas que degradan los componentes de la pared celular, pertenecientes al género *Erwinia* (Dikeya).

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Aislar y caracterizar bacterias fitopatógenas a partir de la pudrición de bulbos de nardo (*P. tuberosa*) de la región productora del Estado de Morelos.

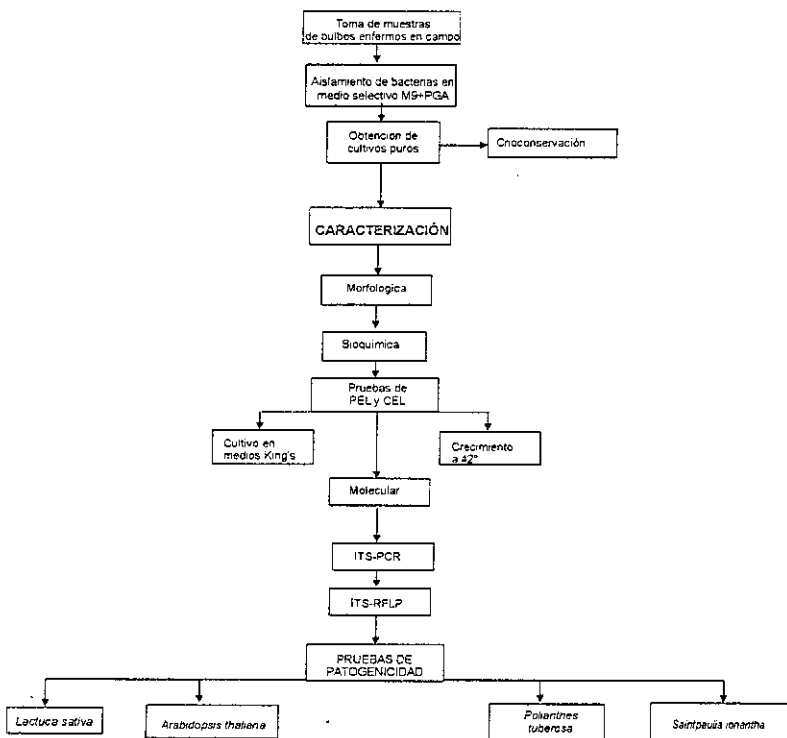
### **7.1. Objetivos particulares**

- Aislar bacterias fitopatógenas asociadas a la pudrición de bulbos de nardo.
- Caracterizar morfológicamente, bioquímicamente y con pruebas de patogenicidad las bacterias aisladas a partir de la pudrición de bulbos de nardo.
- Determinar molecularmente la presencia de *Erwinia* sp. mediante ITS e ITS-RFLP.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de bulbos de nardo enfermos colectados en las zonas productoras del Municipio de Emiliano Zapata, Morelos, se aislaron bacterias potenciales causantes de pudrición blanda. A las cepas aisladas se les realizó la prueba de pectinasas (PEL) y celulasas (CEL). Las positivas a estas pruebas fueron caracterizadas morfológica, bioquímica y molecularmente, mediante las técnicas de ITS-PCR e ITS-RFLP propuestas por (Jensen *et al.*, 1993). Para probar su patogenicidad fueron inoculadas en bulbos de nardo y en hojas de arabisopsis, violeta africana y lechuga romana.

La metodología general seguida para alcanzar el objetivo general planteado se presenta en el esquema siguiente:



## 8.1. ÁREA DE ESTUDIO

El área de muestreo de este estudio se realizó en parcelas del municipio de Emiliano Zapata, en el Estado de Morelos, ubicado entre los paralelos 18° 45' y 18° 53' de latitud norte, los meridianos 99° 09' y 99° 13' de longitud oeste; altitud entre 1000 y 1700m. Colinda al norte con los municipios de Cuernavaca y Jiutepec; al oeste con los municipios de Yautepec y Tlatizapan; al sur con Xochitepec; al oeste con Temixco. Ocupa el 1.4 % de la superficie del estado (INEGI, 2010).

### 8.1.2 Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en parcelas de nardo en plena producción con problemas de pudrición de bulbo y los muestreos fueron al azar en dichas parcelas.

## 8.2 DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS

### 8.2.1 Aislamiento de bacterias fitopatógenas a partir de bulbos de nardo con pudrición blanda

Se tomaron quince bulbos de nardo con síntomas aparentes de pudrición blanda. Los bulbos fueron enjuagados en agua destilada estéril durante 15 min, para remover los restos de suelo y seleccionar los lugares de análisis. Se colocó 1 g de tejido de la zona de avance de la enfermedad en microtubos con 1 mL de agua destilada estéril, los tubos se mantuvieron en reposo durante 15 min, posteriormente fueron agitados vigorosamente con un vortex hasta disgregar los tejidos y se realizaron diluciones 1:10 iniciando desde la dilución  $10^{-1}$  hasta la dilución  $10^{-8}$ .

### 8.2.2 Siembra, interpretación de cajas y aislamiento.

De las diluciones se tomaron 100  $\mu$ L que fueron sembrados en placas con medio mínimo M9 (Miller *et al.* 1972) (apéndice 1) adicionado con ácido poligalacturónico

al 0.2 % (PGA) como fuente de carbono (componente estructural de la pared celular de las células vegetales). Las cajas sembradas fueron incubadas a 30°C durante 72 h; las colonias crecidas fueron diferenciadas con base en su morfología y aisladas en medio rico Luria-Bertani (LB), se incubaron a 30°C durante 24 h.

### 8.3 CRIOCONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas aisladas fueron crioconservadas a -80°C en glicerol al 50 % (v/v). A cada una se le asignó una clave (BV) seguida de un número correspondiente al cepario del la Unidad de Biotecnología Vegetal, del Centro de Investigación y Asistencia y en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

### 8.4 CEPAS BACTERIANAS

Para las pruebas bioquímicas, moleculares y pruebas de patogenicidad se utilizarón cepas testigo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas bacterianas de referencia utilizadas en este estudio

CEPA	FENOTIPO	REFERENCIA
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	Silvestre	Dickey (1981)
<i>Erwinia carotovora</i> Ecc71	Silvestre	Jones (1901)
<i>outF</i>	Mutante del sistema de secreción tipo II	Douet <i>et al.</i> (2009)
<i>Pseudomonas sinringae</i> <i>pv phaseolicola</i> 1448	Silvestre	Joardar <i>et al.</i> (2005)
<i>Eschericia coli</i> MG1655	Silvestre	Cepa de laboratorio CIATEJ
<i>Bacillus subtilis</i>	Silvestre	Cepa de laboratorio CIATEJ

**Nota** El nombre actual de la bacteria es *Dickeya dadantii*, en esta tesis se referirá como *E. chrysanthemi*.

## 8.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS

### 8.5.1 Tinción de Gram y prueba de Ryu

A las cepas aisladas se les realizó la tinción de Gram, y la prueba de Ryu de acuerdo a Fucikovsky (2000). Se utilizaron como testigos *B. subtilis* (Gram positiva) y *E. chrysanthemi* (Gram negativa).

### 8.5.2 Pruebas de producción de pectinasas PEL y celulasas CEL

Las cepas aisladas, fueron sometidas a la prueba de pectinasas PEL y celulasas CEL para determinar su capacidad de secretar enzimas peptolíticas que son indispensables en el desarrollo de los síntomas de pudrición blanda, al ser capaces de hidrolizar los componentes de la lamina media y las paredes celulares de los vegetales, lo que permite la entrada de la bacteria al interior de estas.

Se prepararon placas con medio PEL y CEL (apéndice 1), previamente las cepas aisladas fueron cultivadas durante 48 h en medio M9 adicionado con ácido poligalacturónico 0.2 % (PGA) y en medio rico (LB) por 24 h. Del cultivo saturado proveniente de ambos medios, se tomo 1 mL en tubos microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante de cada cepa se recuperó en tubos nuevos, 60 µL se colocaron en placas con medio PEL y CEL, que fueron incubadas a 30°C durante 24 h. Los resultados de la prueba se visualizaron después de revelar las placas, en el caso del medio PEL fueron reveladas con una solución de acetato de cobre al 7.5 % durante 2 h y un enjuague con NaCl 1N. Para revelar las placas con medio CEL se utilizó una solución de rojo Congo 0.2 % durante 20 min, NaCl 1N por 15 min y HCl 1N por 5 min (Ching-Hsing, 1989). Los resultados de la prueba fueron observados 24 h después del revelado. Este mismo procedimiento se realizó con colonias sobre medio solido.



### 8.5.3 Curvas de crecimiento

Para determinar las etapas de crecimiento de las cepas seleccionadas estas fueron cultivadas en medio LB y M9+PGA 0.2 % durante toda la noche. A partir del cultivo saturado proveniente de ambos medios se tomó una alícuota y se ajustó a una densidad óptica de 0.1 en un espectrofotómetro (Eppendor Bio photometer ®), esta medición se tomó como el punto hora cero a partir de este, cada hora se tomo la lectura de la  $DO_{600}$  del cultivo durante 8 h, finalmente se realizó una medición después de 24 h.

### 8.5.3 Crecimiento en medio King A y King B

Las cepas positivas a las pruebas de PEL fueron crecidas en medio KB (King *et al.* 1954) para demostrar la producción de pioverdina y fluoresceína, también se crecieron en agar KA (King *et al.* 1954) para la observar la formación de pocianina.

### 8.5.4 Crecimiento a 42°C

Para determinar la respuesta de crecimiento a 42°C, las cepas seleccionadas junto con *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas sinringae* y *Eschericia* fueron crecidas en medio rico (LB), medio KA y medio KB (King *et al.* 1954) incubándose a 42°C durante 24 h.

## 8.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

### 8.6.1. Extracción del ADN genómico

El ADN de las cepas bacterianas aisladas del nardo así como de *Erwinia chrysanthemi* 3937, *Erwinia carotovora* Ecc71 y *Eschericia coli* MG1655 se extrajó de acuerdo al protocolo propuesto por Rong y Jiang (2006).

Al ADN extraído se le determinó concentración y pureza, con una lectura espectrofotométrica a la longitud de onda 260/280 nm y 260/230 (Eppendor Bio photometer®). Una relación óptima de absorbancia 260/280 nm de la muestra de ADN es de 1.8 a 2.0, valores más bajos indican contaminación con proteínas. Los valores óptimos de absorbancia 260/230 nm de la muestra de ADN se encuentran entre 2.0 a 2.2, si los valores son inferiores indican la presencia de contaminantes como ácido etilendiaminotetraacético y fenol (Boom *et al.*, 2009).

#### 8.6.2 ITS (16S-23S) PCR

Las cepas fueron caracterizadas a nivel molecular, mediante el marcador ITS 16S-23S, con las técnicas de ITS-PCR e ITS –RFLP. Como controles se utilizó ADN de las cepas *Erwinia chrysanthemi* 3937, *Erwinia carotovora* Ecc71 y *Eschericia coli* MG1655. Para la amplificación de la región ITS 16S-23 se emplearon los cebadores G1 (GAAGTCGTAACAAGG) y L1 (CAAGGCATCCACCGT) descritos por Jensen *et al.* (1993). La amplificación del ADN se desarrolló en una reacción de 25  $\mu$ L conteniendo 0.5  $\mu$ M de cada cebador, 0.2 mM dNTP, 1X de amortiguador 10X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Taq polimerasa 2.5 U y 10 ng de ADN molde (concentraciones propuestas por Invitrogen®). La PCR se llevó a cabo con un programa que consistió en desnaturalización inicial de 94°C durante 1 min, seguido de 25 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C 7 min y 72°C por 2 min, con una extensión final de 72°C durante 2 min, en un termociclador (Techine®, TC-412). Una alícuota de 10  $\mu$ L de la reacción fue analizada por electroforesis en un gel de agarosa a 1.2 % a 90 V por 90 min en buffer TBE. Se utilizó el marcador molecular 1 Kb plus Invitrogen®. El gel se tiñó con bromuro de etidio y fue fotografiado en un transiluminador Gel Doc XR (Invitrogen®). Los tamaños de las bandas fueron analizados con el programa Quantity one (Invitrogen®) y comparados con el esquema propuesto por Toth *et al.* (2001). Los datos fueron analizados mediante las técnicas estadísticas de Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Conglomerados mediante el método de promedio de grupo (AC).

### 8.6.3 Purificación del ADN amplificado por PCR

La reacción de PCR de cada cepa fue purificada con el kit comercial Wizard® (Promega®).

### 8.6.4 ITS-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

A los productos obtenidos en la PCR de cada aislamiento se les realizaron digestiones independientes con las enzimas de restricción *Rsal* y *CfoI* (*Hha* I) (Roche®). La reacción se realizó en un volumen de 200 µL y consistió en 10 ng del DNA obtenido en la PCR de cada aislamiento, 1 X de amortiguador 10X, 2 U por cada enzima y 92 µL de H<sub>2</sub>O, el volumen total se dividió en tubos con 25 µL. Los tubos con la mezcla se colocaron en baño maria a 37°C durante 2 h. La inactivación de las enzimas se realizó a 65°C durante 15 min. Posteriormente, para comprobar los patrones de bandas generados por las enzimas de restricción, una alícuota de 10 µL fue analizada en un gel de agarosa al 2% a 90 V por 90 min en amortiguador TAE. Se utilizó el marcador molecular 1 Kb plus (Invitrogen®). El gel se tiñó con bromuro de etidio en agitación. Después de 10 min se enjuagó con agua corriente por 5 min. Los geles se fotografiaron en un transiluminador Gel Doc XR (Invitrogen®). Los tamaños de las bandas generadas por las enzimas fueron analizados en el programa Quantity one (Invitrogen®) y comparados con el esquema propuesto por Toth *et al.* (2001). Los datos obtenidos con la digestión de la enzima *CfoI* fueron analizados mediante las técnicas estadísticas de ACP y AC.

## 8.7 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

### 8.7.1 Patogenicidad en diferentes hospederos

La patogenicidad de algunas cepas fue probada en seis hojas de lechuga romana, en hojas de ocho plantas jóvenes de violeta africana y en 15 plantas de *Arabidopsis*. Como control positivo se utilizó la bacteria *E. chrysanthemi*, el control

negativo se inoculó con el mutante *outF*. El inóculo se obtuvo de un cultivo saturado en medio rico (LB) durante 48 h a 30°C, las colonias cultivadas en las placas fueron resuspendidas en 1 mL de buffer fosfato 50 mM pH 7. El inóculo se colocó sobre una hoja a la cual se le realizó una herida con una aguja estéril. Las hojas de violeta africana y arabidopsis se inocularon con una suspensión  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL ajustada en un espectrofotómetro (Eppendor Bio-photometer®). Las hojas de lechuga romana se inocularon con colonias completas que fueron depositadas directamente sobre una herida provocada por un palillo estéril. Posteriormente las plantas infectadas fueron colocadas en una cámara húmeda a 26-28 °C y 100 % humedad relativa. Las plantas se observaron diariamente por 15 d comparándose con los controles. Para realizar la medición de los síntomas se tomó la escala propuesta por Rincón-Enríquez *et al.* (2008).

#### 8.7.2 Patogenicidad en bulbos de nardo.

Se usaron seis bulbos de nardo sanos para cada cepa, los cuales fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 15 min, seguidos de tres enjuagues con agua destilada estéril durante 5 min. A los bulbos se le ocasiono una pequeña herida en su parte central mediante un bisturí estéril. El inóculo se obtuvo como se describe en las pruebas de patogenicidad para diferentes hospederos. Sobre la herida central de nardo se inocularon con una solución bacteriana  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL ajustada en un espectrofotómetro (Eppendor Bio photometer®). El lugar del inóculo fue cubierto con parafilm. Posteriormente fueron colocados en cajas de Petri con una base de papel filtro húmeda asimismo cada caja se colocó dentro de un recipiente de plástico el cual funcionó como cámara húmeda, se mantuvo a una temperatura de 28-30°C y 100 % humedad relativa. Como testigo positivo se utilizó *E. chrysanthemi*, como testigo negativo se utilizó buffer fosfato, ambos se mantuvieron bajo las mismas condiciones. El desarrollo de los síntomas se observó durante 20 d. La bacteria fue reaislada en medio LB a partir de tejido cercano a las áreas infectadas para confirmar los postulados de Koch (Fucikovsky 2000).

## 9. RESULTADOS

A partir de bulbos de nardo con síntomas de pudrición blanda colectados en el municipio de Emiliano Zapata Morelos, se aislaron catorce cepas bacterianas sobre placas de medio M9 adicionado con PGA 0.2 %. Seis de estas cepas resultaron positivas a la reacción de Gram. De acuerdo a las pruebas de PEL y CEL solo cinco de las catorce cepas aisladas inicialmente (BV145, BV149, BV152, BV151 y BV157) tienen la capacidad de producir enzimas pectolíticas y celulasas que son necesarias para provocar pudrición blanda en plantas. Estas cepas, fueron seleccionadas para caracterizarlas morfológica, molecular y con pruebas de patogenicidad. Por otro lado las cepas BV149, BV151 y BV157 crecieron en medio KB produciendo fluorescencia bajo luz UV, además de presentar una coloración azul verdosa en medio KA y crecer a 42°C. El análisis molecular utilizando ITS-PCR e ITS-RFLP mostró que ninguna de las cepas aisladas pertenece al género *Erwinia* (*Dikeya*) y por otro lado que las cepas BV149, BV151 y BV157 es la misma bacteria. Las pruebas de patogenicidad en hojas de arábido, violeta africana, lechuga romana y bulbos de nardo evidenciaron la patogenicidad de la cepa BV157 y la incapacidad de BV145 y BV152 de provocar síntomas de pudrición blanda.

### 9.1 TOMA DE MUESTRAS

De los muestreos realizados en parcelas del municipio de Emiliano Zapata, Morelos se obtuvieron un total de 30 bulbos de nardo con pudrición blanda causada por bacterias. Los síntomas observados en campo fueron bulbos con zonas acuosas, maceración y colapso de tejido infectado de color café oscuro.

## 9.2 DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS

### 9.2.1 Aislamiento de bacterias a partir de bulbos de nardo con pudrición blanda

De las 30 muestras colectadas de bulbos, en una parte (quince) de ellas se aislaron colonias bacterianas en medio mínimo M9 (Miller *et al.*, 1972) (apéndice 1) adicionado 0.2 % de PGA como fuente de carbono. Un total, de catorce colonias de morfología constante tuvieron crecimiento en este medio, posteriormente fueron reaislada varias veces hasta lograr su purificación sobre placas de medio LB. Finalmente se purificaron catorce cepas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cepas aisladas a partir de bulbos de nardo enfermos provenientes del municipio de Emiliano Zapata, Morelos.

CEPAS AISLADAS EN MEDIO M9	LOCALIDAD
BV144	Emiliano Zapata
BV145	Emiliano Zapata
BV146	Emiliano Zapata
BV147	Emiliano Zapata
BV148	Emiliano Zapata
BV149	Emiliano Zapata
BV150	Emiliano Zapata
BV151	Emiliano Zapata
BV152	Emiliano Zapata
BV153	Emiliano Zapata
BV154	Emiliano Zapata
BV155	Emiliano Zapata
BV156	Emiliano Zapata
BV157	Emiliano Zapata

BV: Clave correspondiente al cepario del Laboratorio de Biotecnología Vegetal CIATEJ.

### 9.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

#### 9.3.1 Tinción de Gram y prueba de Ryu

La prueba de Gram realizada a las catorce cepas aisladas de bulbos enfermos y cultivadas en medio M9+PGA 0.2 % mostró que seis de ellas eran Gram (+) mientras que 8 resultaron ser Gram (-). Los resultados de la tinción de Gram fueron confirmados con la prueba de Ryu que permite diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante la aplicación de una solución de KOH 3 % que actúa produciendo la lisis de la bacteria (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la tinción de Gram y prueba de Ryu de las cepas cultivadas en medio M9+PGA 0.2 %.

Cepa	Tinción de Gram	Prueba de Ryu
BV144	+	+
BV145	+	+
BV146	-	-
BV147	-	-
BV148	-	-
BV149	-	-
BV150	+	+
BV151	-	-
BV152	-	-
BV153	+	+
BV154	+	+
BV155	+	+
BV156	-	-
BV157	-	-

+ = Positiva - = Negativa

### 9.3.2 Pruebas de pectinasas PEL y celulasas CEL

#### Crecimiento a partir de medio rico (LB)

Como se observa en el Cuadro 4, los sobrenadantes de un cultivo de toda la noche de las cepas BV145, BV149, BV152, BV151 y BV157 cultivadas en medio LB presentaron un halo de actividad CEL con diferente diámetro similar al que generó el testigo positivo *E. chrysanthemi* por lo que se consideraron positivas a esta prueba (producción de celulasas). Ninguna de las cepas crecidas bajo estas condiciones fue positiva para la prueba PEL.

Las pruebas PEL y CEL que se realizaron a partir de colonias completas generaron los mismos resultados.



Cuadro 4. Pruebas de producción de pectinasas PEL y celulasas CEL a partir de medio rico (LB)

CEPA	Crecimiento bacteriano de toda la noche OD <sub>600</sub>	Producción de enzimas peptoliticas			
		PEL	Ø	CEL	Ø
BV144	6.28	-	-	-	-
BV145	6.84	-	-	+	1.8 cm
BV146	7.16	-	-	-	-
BV147	6.51	-	-	-	-
BV148	0.06	-	-	-	-
BV149	3.37	-	-	+	2 cm
BV150	6.86	-	-	-	-
BV151	3.90	-	-	+	2.5 cm
BV152	6.64	-	-	+	1.8 cm
BV153	2.33	-	-	-	-
BV154	2.22	-	-	-	-
BV155	6.80	-	-	-	-
BV156	6.53	-	-	-	-
BV157	4.58	-	-	+	2.5 cm
<i>E. chrysanthemi</i>	5.24	+	1.5 cm	+	1.5 cm
<i>E. coli</i> MG1655	7.37	-	-	-	-

Ø= diámetro del halo de actividad. (-) = Negativo (+) = Positivo DO<sub>600</sub> = densidad óptica a 600 nm  
Crecimiento a partir de medio M9 + PGA 0.2 %

Las cepas BV145, BV149, BV151, BV152 y BV157, presentaron un halo de actividad PEL. Para la prueba de CEL (producción celulasas) las cepas BV145, BV146, BV147, BV149, BV151, BV152, BV156, BV157 fueron positivas (Cuadro 5). Las pruebas PEL y CEL que se realizaron a partir de colonias completas generaron los mismos resultados.

Cuadro 5. Pruebas de producción de pectinasas PEL y celulasas CEL a partir, medio mínimo (M9 + PGA 2%) a las 48 h de crecimiento.

CEPA	Crecimiento bacteriano de toda la noche DO <sub>600</sub>	Producción de enzimas peptolíticas			
		PEL	Ø	CEL	Ø
BV144	4.18	-	-	-	-
BV145	3.39	+	1.5 cm	+	1.9 cm
BV146	0.72	-	-	+	2 cm
BV147	0.66	-	-	+	1.9 cm
BV148	0.4	-	-	-	-
BV149	0.60	+	2.1 cm	+	2 cm
BV150	0.29	-	-	-	-
BV151	0.36	+	1.4 cm	+	1.5 cm
BV152	0.66	+	1.4 cm	+	1.4 cm
BV153	0.24	-	-	-	-
BV154	0.14	-	-	-	-
BV155	-	-	-	-	-
BV156	1.01	-	-	+	1.8 cm
BV157	0.85	+	2 cm	+	2 cm
<i>E. chrysanthemi</i>	5.24	+	2.5 cm	+	1.5 cm
<i>E. coli</i> MG1655	7.37	-	-	-	-

Ø= diámetro del halo de actividad. (-) = Negativo (+) = Positivo DO<sub>600</sub> = densidad óptica a 600 nm

Bajo las condiciones de ambos medios de cultivo (LB y M9 PGA 0.2 %) las cepas BV145, BV149, BV151, BV152 y BV157 fueron positivas a la prueba de CEL y solo a partir de medio M9 + PGA 0.2 % fueron positivas a la prueba PEL, mientras que *E. chrysanthemi* (testigo positivo) fue positiva a las pruebas de PEL y CEL, al utilizar sobrenadantes de cultivos de toda la noche en medio LB y M9.

Tomando en cuenta estos antecedentes, las cepas BV145, BV149, BV151, BV152 y BV157, fueron seleccionadas para tipificarlas morfológicamente, molecularmente y con pruebas de patogenicidad.

### 9.3.3 Morfología colonial de las cepas seleccionadas

La morfología de las colonias se observó en placas de medio LB (Cuadro 6). Las colonias de las cepas BV149, BV151 y BV157 presentaron morfología similar. El cultivo de estas bacterias en medio líquido LB durante 24 horas a 200 rpm presentó un color verde-azulado que desapareció al mantener el cultivo en reposo.

Cuadro 6. Morfología de las colonias bacterianas seleccionadas crecidas en medio LB.

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color	Olor
BV145	Circular	Entero	Covexa	Lisa	Amarillo	Fétido
BV149	Irregular	Dentado	Plana	Lisa	Verde-azulado	Uva
BV151	Irregular	Dentado	Plana	Lisa	Verde-azulado	Uva
BV152	Circular	Entero	Covexa	Lisa	Blanco	Fétido
BV157	Irregular	Dentado	Plana	Lisa	Verde-azulado	Uva

### 9.3.4 Curvas de crecimiento

Como lo muestra la Figura 5 a partir de medio LB ninguna de las cepas seleccionadas presenta un crecimiento similar al de *E. chrysanthemi*, que llega a su etapa logarítmica a las 2 h después de haber sido inoculada. Por otro lado después de 24 h las cepas BV145, BV152 y BV157 presentan un crecimiento mayor al de *E. chrysanthemi*. La curva de crecimiento de las cepas BV149, BV151 y BV157 es similar. Por su parte en medio M9+PGA 0.2 % el crecimiento de *E. chrysanthemi* después de 24 h es diferente al de las cepas seleccionadas, en este medio también se confirma que las cepas BV149, BV151 y BV157 tienen una curva de crecimiento similar.

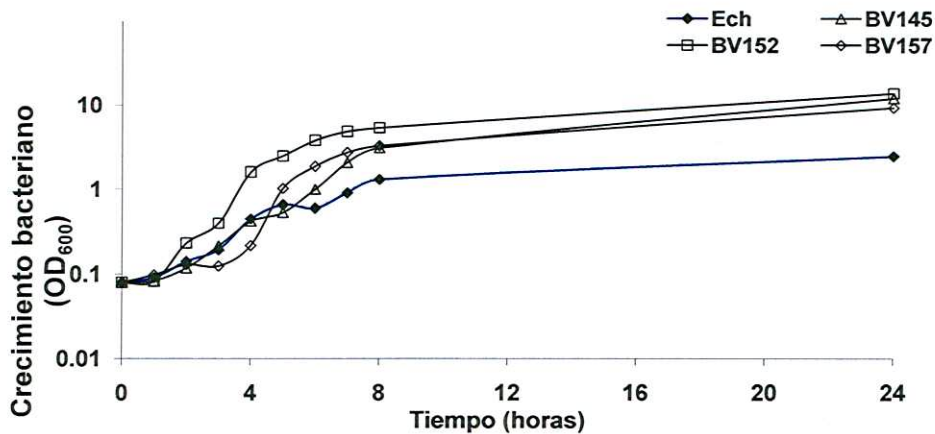


Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas *E. chrysanthemi*, BV145, BV152 y BV157 en medio LB.

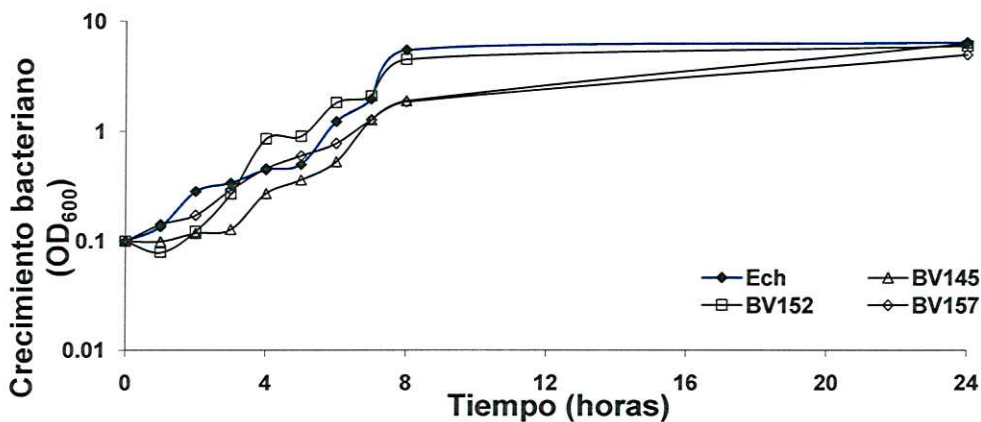


Figura 6. Curvas de crecimiento de las cepas *E. chrysanthemi*, BV145, BV152 y BV157 en medio M9+PGA 0.2%.

### 9.3.5 Crecimiento en medio King A y King B

Debido a la coloración azul-verdosa que presentaron las cepas BV149, BV151 y BV157 al crecer en medio LB, se implementó la prueba de producción de pigmentos sobre los medios King A (KA) y King B (KB) además del crecimiento a 42°C. Ambos medios fueron propuestos por King *et al.* (1954) para el aislamiento, la detección y diferenciación de especies de *Pseudomonas*.

El objetivo del cultivo de bacterias en medio KA fue para determinar la producción de piocianina, un pigmento sintetizado por especies de *Pseudomonas* bajo ciertas condiciones desfavorables de crecimiento (Abalos *et al.*, 2004). Dos de los componentes del medio KA (apéndice 1) las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de piocianina y piorrubina e inhiben la fluoresceína (King *et al.*, 1954).

Con el crecimiento de bacterias en medio KB, se determinó la producción de fluoresceína (pioverdina) un pigmento amarillo verde que presenta fluorescencia bajo luz ultravioleta en algunas cepas de *Pseudomonas*. La fluoresceína se estimula por una alta concentración de fósforo que es proporcionada por la peptona junto con el fosfato dibásico (componentes del medio), impidiendo la formación de piocianina, además el sulfato de magnesio aporta los cationes necesarios para la producción de pioverdina (King *et al.*, 1954).

Como se observa en el Cuadro 7, las cepas BV145 y BV152 no tuvieron crecimiento en ninguno de los medios King's, mientras que las cepas BV149, BV151 y BV157 crecieron en medio KA a una temperatura de 42°C produciendo una coloración azul-verdosa. Además de que fueron capaces de crecer en medio KB y producir fluorescencia bajo luz UV, ninguna de las cepas bacterianas testigo presentó una morfología similar a la de las cepas BV149, BV151 y BV157 entre las cuales existe una gran similitud.

Cuadro 7. Características morfológicas de cepas bacterianas en los medios King A y King B.

Cepa	Crecimiento en medio King A	Crecimiento en medio King B	Crecimiento 42°C
BV145	-	-	-
BV149	+	+ F	+
BV151	+	+ F	+
BV152	-	-	-
BV157	+	+ F	+
<i>E. chrysanthemi</i>	-	+	-
<i>E. coli</i> MG1655	+	+	+
<i>P. sinningae</i>	+	+ F	-

+ = Crecimiento; F = fluorescencia; - = No crecimiento.

## 9.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

### 9.4.1 Extracción del ADN genómico

La medición espectrofotométrica realizada al ADN extraído determinó que el 50 % de las cepas, tuvieron una concentración de ADN mayor a 45 ng/ $\mu$ L. De la relación 260/280 se obtuvo que la mayor parte de las cepas tuvieron valores entre 1.8 y 2.0, por lo que el ADN se extrajo en un óptimo de pureza. Respecto a la relación 260/230 se obtuvo que todos los valores de las muestras de ADN estuvieron por debajo del intervalo de 2.0-2.2 por lo que probablemente indican contaminación secundaria a causa de la presencia de algún compuesto como el fenol, el cual fue utilizado en el protocolo de extracción como se observa en el Cuadro 8 (Boom *et al.*, 2009).

Cuadro 8. Características de pureza del ADN utilizado en este estudio.

Muestra cepa	Concentración (ng/ $\mu$ L)	Relación 260/280	Relación 260/230
<i>E. coli</i>	49.9	2.07	0.66
<i>E. chrysanthemi</i>	49.4	1.91	0.25
<i>E. carotovora</i>	32.9	1.87	0.16
BV145	26.8	1.85	0.59
BV149	60.1	1.81	0.30
BV151	33.2	1.85	0.07
BV152	38.7	1.92	0.11
BV157	62.4	1.89	0.18

#### 9.4.2 Amplificación de la región ITS 16S-23S

Los tamaños de los fragmentos fueron analizados en el programa Quantity one (Invitrogen®). En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos de la amplificación de fragmentos de ADN (ITS) correspondientes a las cepas aisladas y testigos. *E. coli* MG1655 (carril 2) generó dos bandas de aproximadamente 450 y 620 pb, *E. chrysanthemi* 3937 (carril 3) presentó una banda de 450 pb y una mayor de aproximadamente 600 pb, *E. carotovora* Ecc71 (carril 4) generó dos productos de 250 y 450 pb, la cepa BV145 (carril 5) presentó una banda de 450 y una más de 530 pb, las cepas BV149, BV151, y BV157 (carriles 6, 7, 9) presentaron una sola banda de tamaño uniforme que se observa es de entre 550 pb, por último la cepa BV152 (carril 8) presentó cuatro bandas de aproximadamente 280, 400, 450 y 550 pb.



Figura 7. ITS-RFLP-PCR de cepas testigo y aisladas de nardo. Carril 1 marcador molecular 1 Kb plus Invitrogen, carril 2 *E. coli* MG1655, carril 3 *E. chrysanthemi* 3937, carril 4 *E. carotovora* Ecc71, carril 5 BV145, carril 6 BV149, carril 7 BV151, carril 8 BV152 y carril 9 BV157.



### 9.4.3 Análisis estadísticos con base en los datos ITS 16S-23S

El tamaño de los fragmentos de la amplificación de la región ITS 16S-23S de cada una de las cepas seleccionadas y testigo fue comparado mediante las técnicas ACP y AC mediante el método de promedio de grupo, con el objetivo de sintetizar la información y de esta manera determinar la similaridad existente entre las cepas analizadas y con el fin de agruparlas en conjuntos homogéneos. El ACP de las cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S (76 % de variación total explicada con los dos primeros componentes principales), mostró que las cepas BV149, BV151 y BV157 son similares, ya que todas se agrupan en un mismo punto, además, estas a su vez tienen una cercanía con *E. chrysanthemi*, asimismo la cepa *E. carotovora* y BV152 coinciden en un mismo punto, por su parte *E. coli* y BV145 tienden a separarse del resto de las cepas (Figura 8). Por otro lado el AC mediante el método de promedio de grupo se presenta de manera grafica mediante un dendograma en el cual se observa un agrupamiento similar al descrito anteriormente para el ACP (Figura 9).

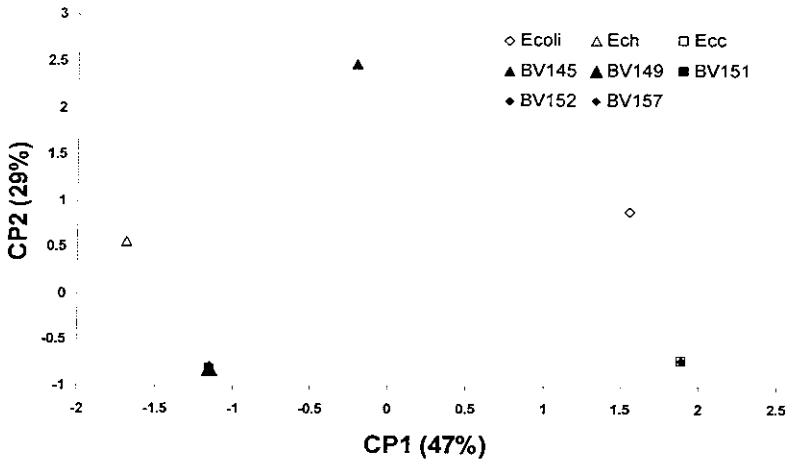


Figura 8. Análisis de componentes principales de cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S (CP1 y CP2 explican el 76% de variación total).

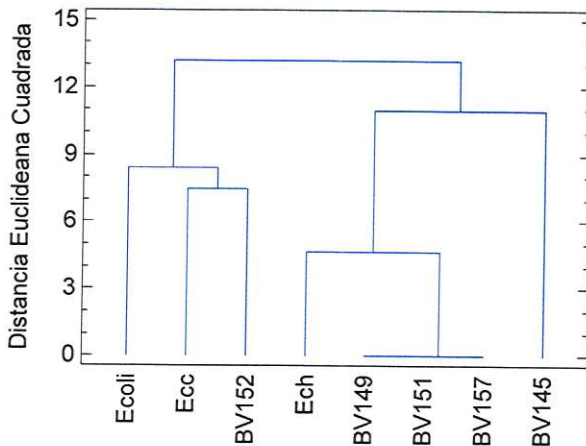


Figura 9. Análisis de conglomerados mediante el método del promedio de grupo de cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S.

#### 9.4.4 ITS-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

La enzima *RsaI* en el ADN de la cepa *E. coli* MG1655 realizó una digestión parcial del ITS 16S-23S al cortar solamente la banda de 620 pb y generar dos bandas de aproximadamente 350 y 290 pb (carril 2). Por su parte para *E. chrysanthemi* 3937 (carril 3) y *E. carotovora* (carril 4) la enzima no generó ningún patrón de restricción. Para la cepa BV145 (carril 5) la enzima digirió la banda de 530 pb y generó dos bandas de 350 y 190 pb. En las cepas BV149, BV151, BV152 y BV157 (carriles 6, 7, 8, 9) no generó patrones de restricción (Figura 10).

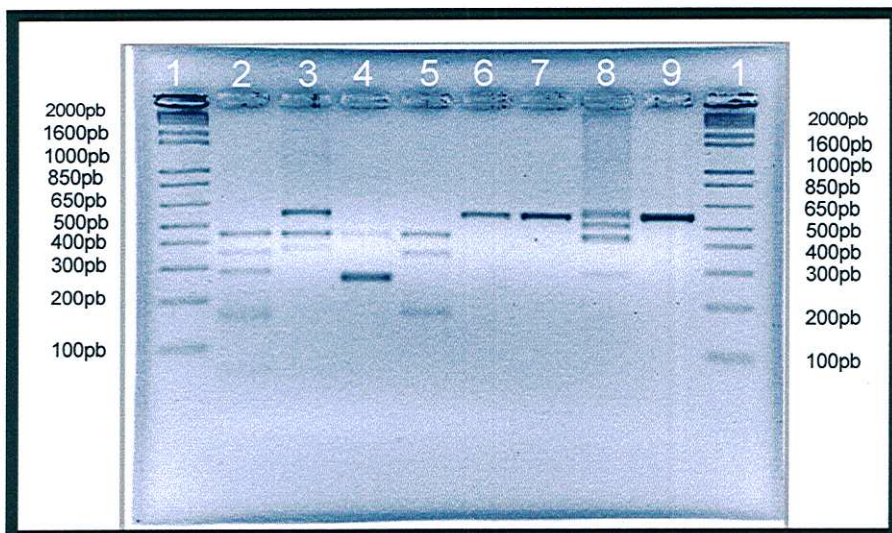


Figura 10. Digestión del ITS con la enzima *RsaI* para las cepas testigo y aislamientos de nardo. Carril 1 marcador molecular 1 Kb plus Invitrogen, carril 2 *E. coli* MG1655, carril 3 *E. chrysanthemi* 3937, carril 4 *E. carotovora* Ecc71, carril 5 BV145, carril 6 BV149, carril 7 BV151, carril 8 BV152 y carril 9 BV157.

La enzima *CfoI* realizó una digestión parcial en el ADN de la cepa *E. coli* MG1655 al cortar solamente la banda de 600 pb, generó tres bandas de aproximadamente 120, 160 y 290 pb (carril 2). En *E. chrysanthemi* 3937 la enzima solamente cortó la banda de 600 pb generando tres fragmentos de 120, 160 y 280 pb aproximadamente (carril 3). En *E. carotovora* la enzima cortó la banda de 450 pb generando tres bandas de 115 170 y 190 pb (carril 4). Por su parte en la cepa BV145 la enzima generó tres bandas de 130, 160 y 240 pb, por lo que solo cortó la banda de 530 pb (carril 5). Por otro lado la enzima también realizó una digestión parcial en la cepa BV152 (carril 8) cortando las bandas de 280 y 400 pb se generaron cuatro bandas de 80, 150, 290 y 300 pb. En las cepas BV149, BV151 y BV157 la enzima generó patrones de restricción de 80, 120, 150 y 200 pb (Figura 11).

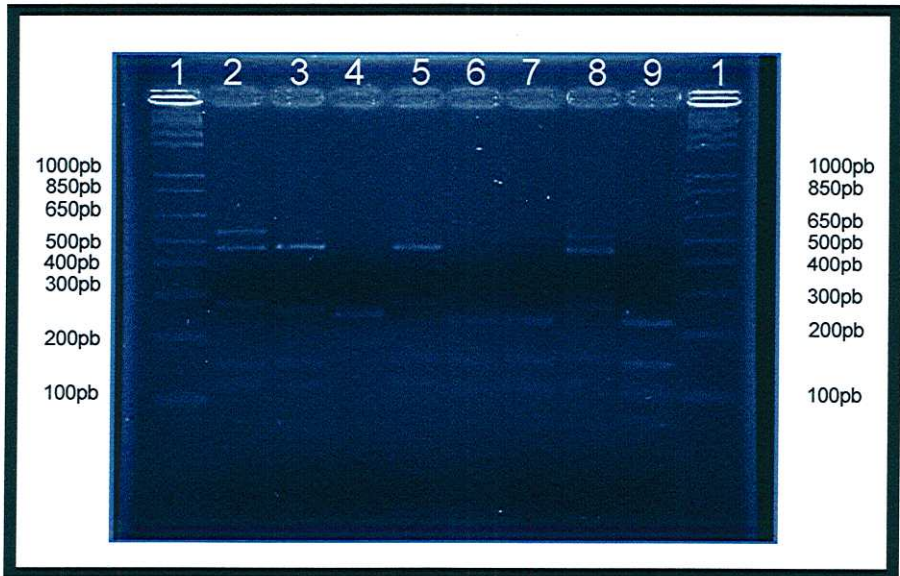


Figura 11. Digestión del ITS con la enzima *CfoI* para las cepas testigo y aisladas de nardo. Carril 1 marcador molecular 1 Kb plus Invitrogen, carril 2 *E. coli* MG1655, carril 3 *E. chrysanthemi* 3937, carril 4 *E. carotovora* Ecc71, carril 5 BV145, carril 6 BV149, carril 7 BV151, carril 8 BV152 y carril 9 BV157.

#### 9.4.5 Análisis estadísticos con base en los datos ITS 16S-23S RFLP (*CfoI*)

El ACP y AC mediante el método de promedio de grupo se realizó utilizando el mayor número de datos proporcionados por el ITS 16S-23S RFLP con la enzima *CfoI*. Los resultados del ACP (Figura 12) mostraron que las cepas BV149, BV151 y BV157 coinciden en un mismo punto de la gráfica con ello se muestra la fuerte similitud que existe entre ellas, por otra parte las demás cepas analizadas se encontraron en puntos diferentes, las cepas más cercanas al punto de las cepas antes mencionadas son *E. carotovora* y *E. chrysanthemi*. Con los resultados del AC (Figura 13) se observó que las cepas BV149, BV151 y BV157 están agrupadas en un mismo nodo y tienen una cercanía relativa con *E. carotovora* y *E. chrysanthemi*, mientras que *E. coli* y BV152 se agrupan, por su parte BV145 se aleja del resto de las cepas.

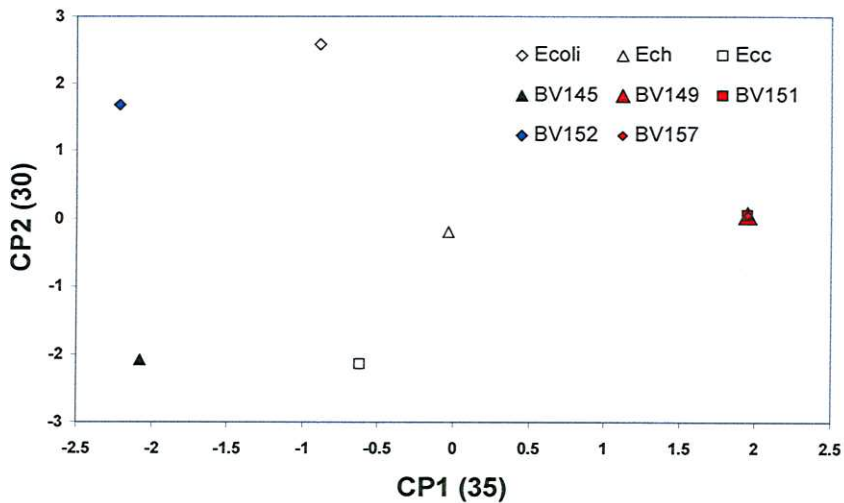


Figura 12. Análisis de componentes principales de cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S RFLP (*CfoI*) (CP1 y CP2 explican un 65 % de variación total).

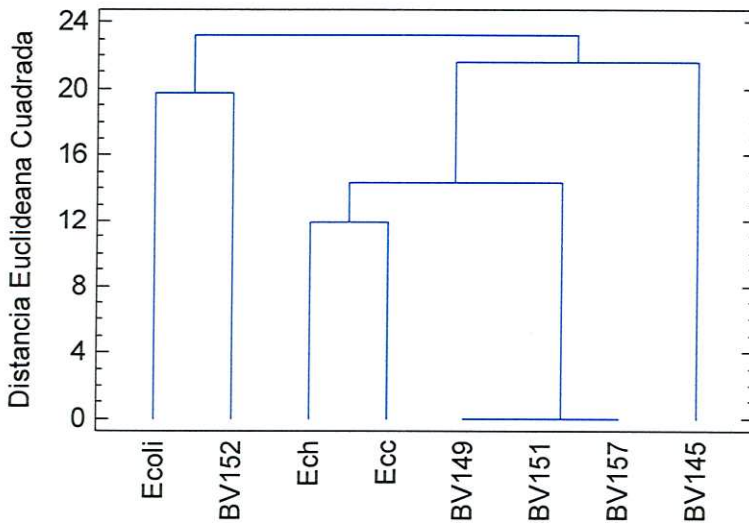


Figura 13. Análisis de conglomerados mediante el método del promedio de grupo de cepas bacterianas con base en los datos ITS 16S-23S RFLP (*CfoI*).

Los resultados obtenidos en las pruebas moleculares (ITS-PCR e ITS RFLP) y análisis estadísticos (ACP y AC) sugieren que ninguna de las bacterias aisladas a partir de las muestras de bulbos enfermos pertenece al género *Erwinia* (*Dykeya*). Por otra parte se obtiene que las cepas BV149, BV151 y BV157 son de la misma especie, lo cual también es sustentado por la caracterización bioquímica y morfológica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, para las pruebas de patogenicidad en bulbos de nardo y hojas de arábido, violeta africana y lechuga romana, se emplearon solamente las cepas BV157, BV145 y BV152, además de los testigos positivos y negativos.

## 9.5 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

### 9.5.1 Pruebas de patogenicidad en arábido

El desarrollo de los síntomas de pudrición blanda en hojas de arábido, se evaluó con base en la siguiente escala de medición: síntoma 0 sin maceración, síntoma 1 maceración en el punto de inoculación, 2 maceración sobre la nervadura central, síntoma 3 maceración sobrepasando la nervadura central, síntoma 4 maceración de la hoja entera (Figura 14). El seguimiento de los síntomas se realizó durante 11 d.

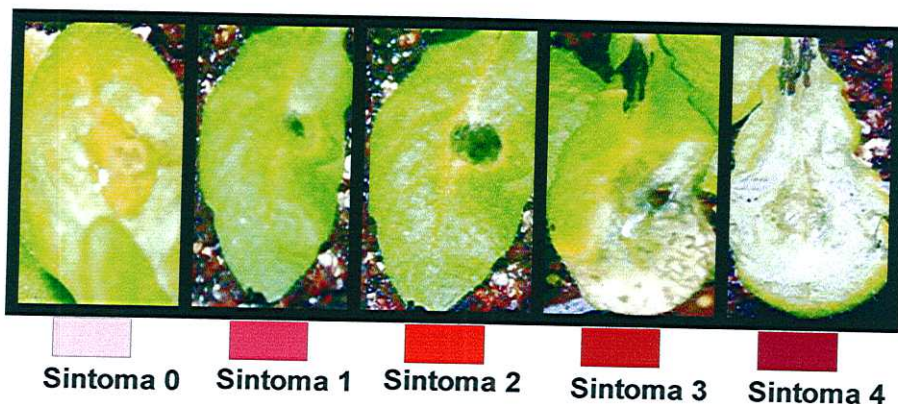


Figura 14. Escala de medición para evaluar el desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda por efecto de las cepas BV145, BV152 y BV157 en hojas de *Arabidopsis* (Tomado de Rincon-Enriquez *et al.*, 208).

Los resultados del avance de la infección en hojas de *Arabidopsis*, fueron graficados para cada una de las cepas inoculadas (BV145, BV152 y BV157) con el objetivo de mostrar la evolución de los síntomas.

A los 11 d después de la inoculación (DDI) el 40 % de las hojas infectadas con la cepa BV145 presentaron maceración sobrepasando la nervadura central (síntoma 3) mientras que en el resto (60 %) la maceración se extendió al límite de la nervadura (síntoma 2), (Figura 15). Por su parte los síntomas de pudrición en las hojas infectadas con la cepa BV152 iniciaron a partir del día 5 DDI, el 5 % de las hojas inoculadas entraron en síntoma 2, finalmente 11 DDI el 5 % de las hojas entro en síntoma 3, 5 % presentado síntoma 4 y el resto 90 % presentaron síntoma 2 (Figura 16).

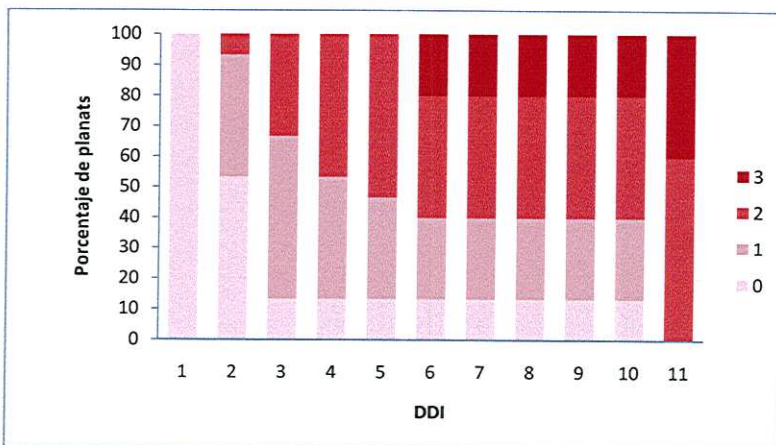


Figura 15. Desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda por efecto de la cepa BV145 en plantas de arabidopsis 11 DDI.

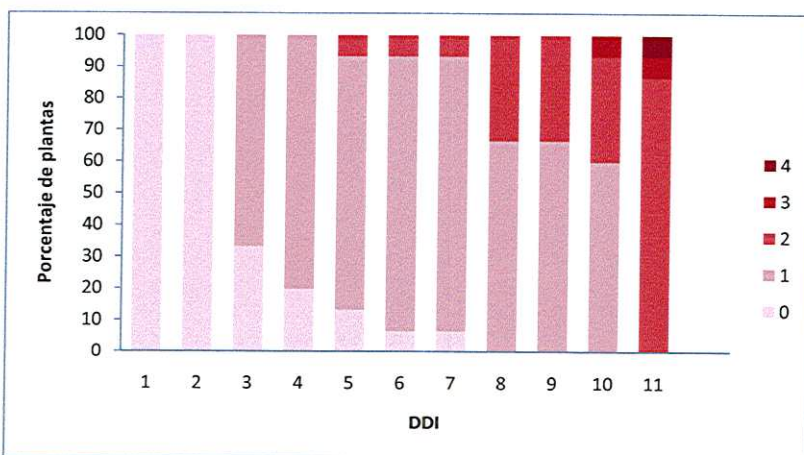


Figura 16. Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de la cepa BV152 en plantas de arabidopsis 11 DDI.

Los primeros síntomas de pudrición en las hojas infectadas con la cepa BV157 se presentaron en el día 2 DDI con la aparición de maceración en el punto de inoculación (síntoma 1) esto ocurrió en el 35 % de las hojas infectadas, 5 DDI, en el 40 % de las hojas inoculadas la pudrición blanda sobrepaso la nervadura central



(síntoma 3). Finalmente después de 11 DDI el 70 % de las hojas se maceraron completamente (síntoma 4), 10% se mantuvieron en síntoma 2 y el 20 % presentaron síntoma 3 (Figura 17).

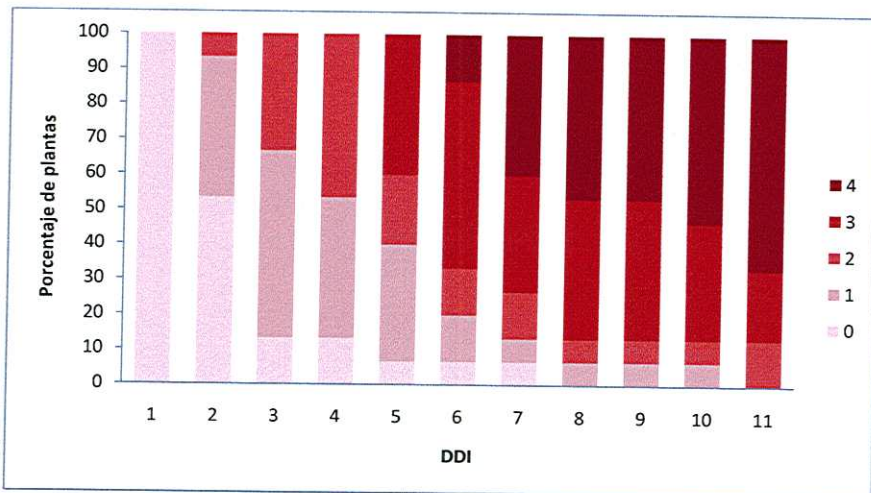


Figura 17. Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de la cepa BV157 en plantas de Arabidopsis 11 DDI.

El 5 % de las hojas inoculadas con *E. chrysanthemi* (control positivo) presentaron maceración sobre la vena central desde el día 1 DDI, a partir del segundo día, prácticamente el 40 % de las hojas tuvieron una maceración completa (síntoma 4). Para el día 7 DDI el 100 % de las hojas infectadas se maceraron (Figura 18).

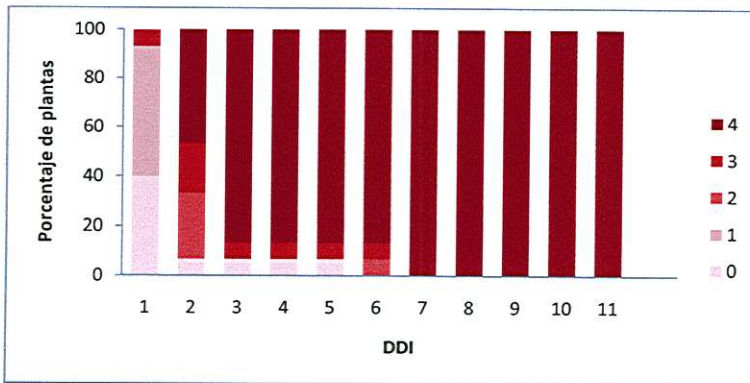


Figura 18 Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda por efecto de la cepa *E. chrysanthemi* en plantas de arabisopsis 11 DDI.

El mutante del sistema de secreción tipo II *outF* utilizado como testigo negativo fue capaz de provocar síntomas de pudrición (Figura 19) por lo que su empleo como testigo (-) no tuvo gran relevancia, el 20 % de las hojas infectadas presentaron síntoma 4 después de 13 d de la inoculación. Esto se debe a que probablemente *E. chrysanthemi* pueda utilizar una conexión alternativa a la proteína *outF* entre el regulador y el sistema de secreción tipo II. Es decir que otra proteína del sistema pueda realizar parcialmente el papel que desempeña *outF*, como ha ocurrido en *Pseudoalteromonas tunicata* donde se han observado transportadores alternativos (Evans *et al.*, 2007)

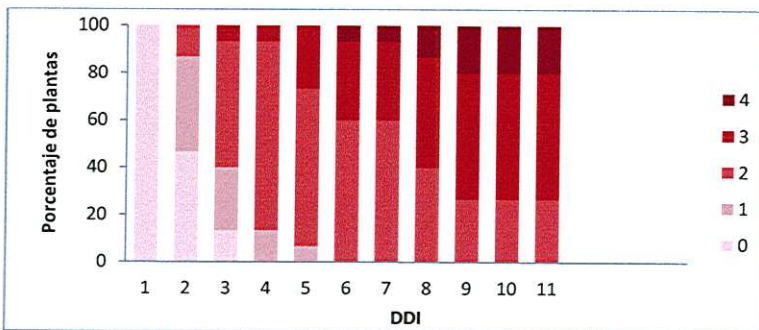


Figura 19. Desarrollo de los síntomas provocados por la cepa *outF*. Aunque se utilizó como testigo negativo el 20 % de las hojas presentaron síntoma 4 después de 11 DDI.

De las cepas aisladas apartir de bulbos de nardo, BV157 causó mayor patogenicidad en hojas de arabisopsis con respecto al porcentaje de hojas maceradas 11 DDI y considerando la maceración provocada por *E. chrysanthemi*, seguida de BV152 y BV145 que no fue capaz de provocar síntoma 4.

### 9.5.2 Pruebas de patogenicidad en violeta africana

La patogenicidad de las cepas aisladas BV145, BV152 y BV157 fue probada en hojas de violeta africana con el objetivo de determinar su capacidad para infectar hospederos diferentes del que fueron aisladas inicialmente.

El desarrollo de los síntomas en hojas de violeta africana se evaluó con base en la siguiente escala de medición: síntoma 0 sin maceración, síntoma 1 maceración en el punto de inoculación, 2 maceración sobre la nervadura central, síntoma 3 maceración sobrepasando la nervadura central, síntoma 4 maceración de la hoja entera (Figura 20). El seguimiento de los síntomas se realizó durante 13 d.



Figura 20. Escala de medición para evaluar el desarrollo de los síntomas de la pudrición blanda por efecto de las cepas BV145, BV152 y BV157 en hojas de violeta africana.

Todas las cepas aisladas y probadas (BV145, BV152 y BV157) sólo provocarán reacción de hipersensibilidad en hojas de violeta africana como lo muestra el ejemplo de la cepa BV157 (Figura 21), que necroso el tejido donde se colocó el inóculo, está respuesta fue evidente con la aparición de un síntoma tipo 2. La cepa

mutante *outF* que se utilizó como testigo negativo también provocó una respuesta similar (Figura 22). El 20 % hojas inoculadas con *E. chrysanthemi* se maceraron 2 d después de la inoculación, mientras que prácticamente después de 13 d de la infección el 95 % de las hojas infectadas se colapsaron, lo cual demuestra que esta cepa tiene una alta virulencia sobre violeta africana (Figura 23).

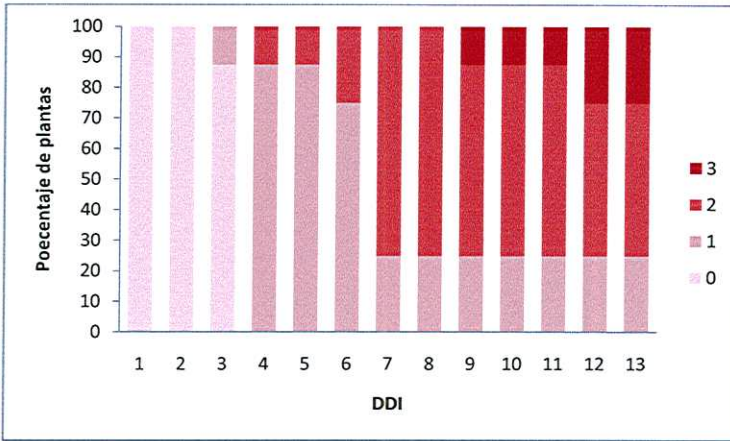


Figura 21. Desarrollo de los síntomas provocados por la cepa BV157 en hojas de violeta africana.

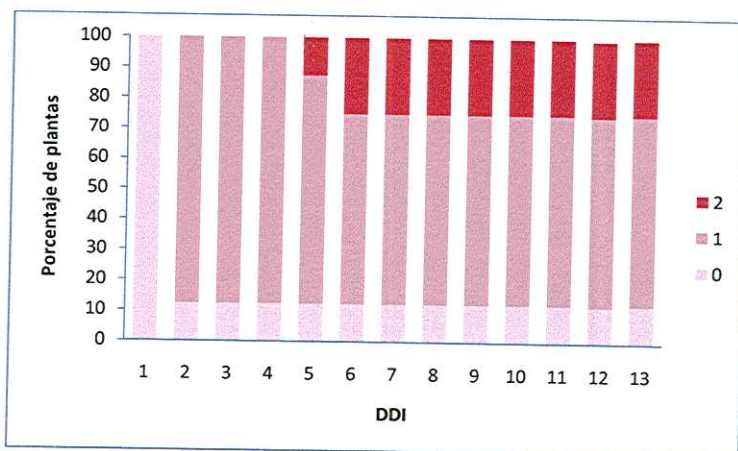


Figura 22. Desarrollo de los síntomas provocados por la cepa *outF* en hojas de violeta africana.

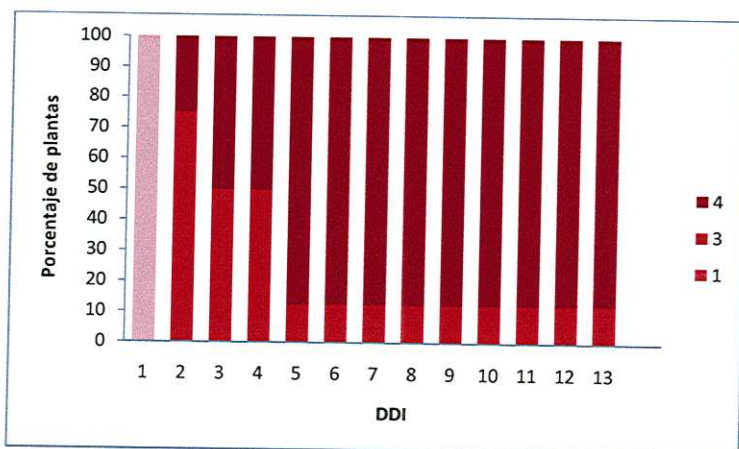


Figura 23. Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda provocados por *E. chrysanthemi* en hojas de violeta africana.

### 9.5.3 Pruebas de patogenicidad en lechuga romana

Las hojas de lechuga romana que se inocularon con colonias completas de BV145 y BV152 no presentaron lesiones. Los síntomas en las hojas infectadas con la cepa BV157 iniciaron 2 DDI como manchas acuosas de color café oscuro (Figura 25). La infección se presentó en un ambiente de alta humedad, esta condición facilitó que se extendiera rápidamente sobre toda la hoja, la cual 8 DDI adquirió un color café oscuro y un fuerte olor a uvas (Figura 27).



Figura 24. Sitio de inoculación de bacterias a partir de colonias sobre hojas de lechuga romana.

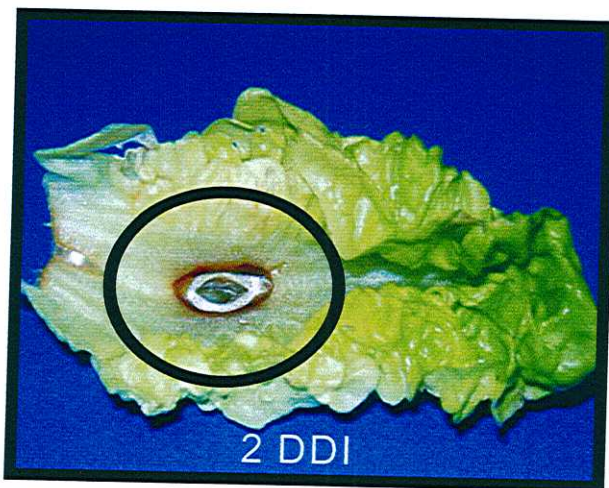


Figura 25. Síntomas de pudrición blanda provocados por la cepa BV157 en hojas de lechuga romana 2 DDI.

Como se observa en la Figura 25, los síntomas ocasionados por la cepa BV157 2 DDI afectaron el tejido circundante al sitio de infección, provocando una pudrición de tipo acuoso y con ello el aumento de la herida inicial.

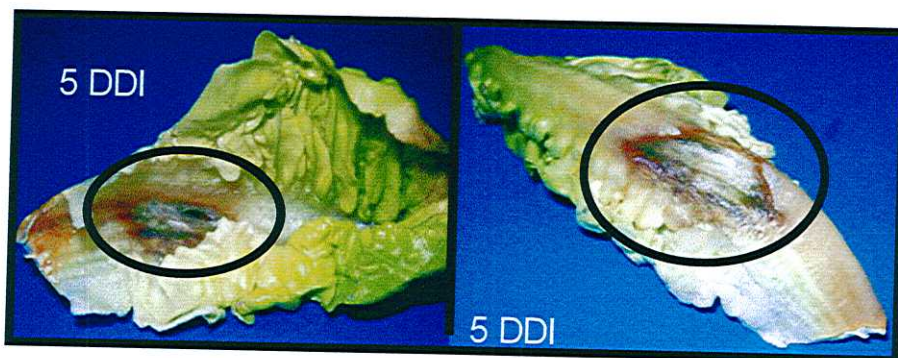


Figura 26. Desarrollo de los síntomas provocados por la cepa BV157 5 DDI bajo dos perspectivas de la hoja, haz (izquierda) y envés (derecha).

5 DDI la pudrición semi-acuosa se extendió sobre los tejidos inmediatos al sitio de inoculación, presentando zonas de color blanquecino y sitios en donde el tejido

adquirió un color negro que permitió localizar el avance de la pudrición, la cual se apreció sobre el haz y el envés de la hoja infectada (Figura 26).

8 DDI la infección se expandió sobre el borde de la hoja provocando un cambio en el color y consistencia del tejido infectado (Figura 27). Aunque la herida de la hoja aumentó su tamaño al término de 8 d, la infección no logró traspasar completamente el tejido. En cambio en el sitio donde alcanzó su máximo estadio se observó una fina capa de tejido que marcó el avance de la enfermedad.

La cepa de *E. chrysanthemi* 8 DDI no provocó síntomas de pudrición en ninguna de las seis hojas infectadas.

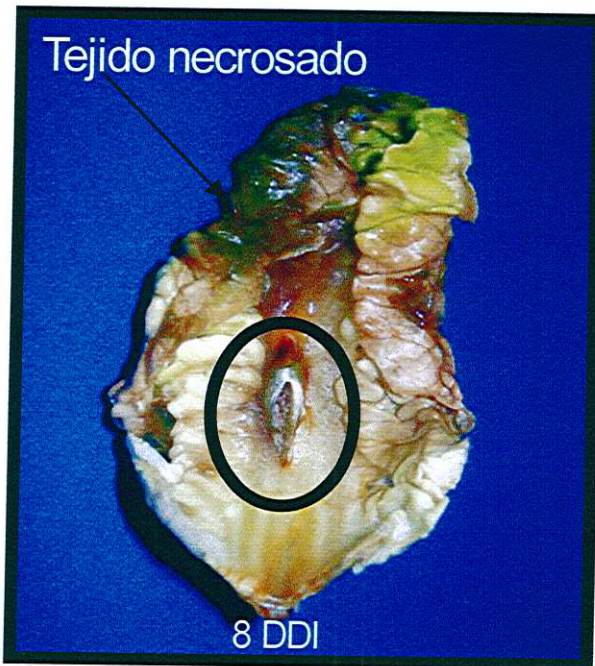


Figura 27. Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda en hojas de lechuga romana provocados por la cepa BV157 8 DDI



## 9.6 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD EN BULBOS DE NARDO

Los bulbos de nardo infectados con las cepas BV145 y BV152 no provocaron ningún síntoma de pudrición blanda 20 DDI.

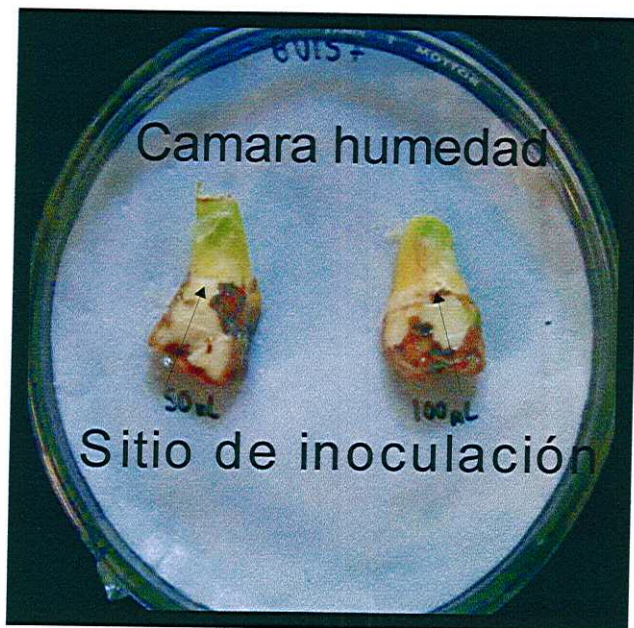


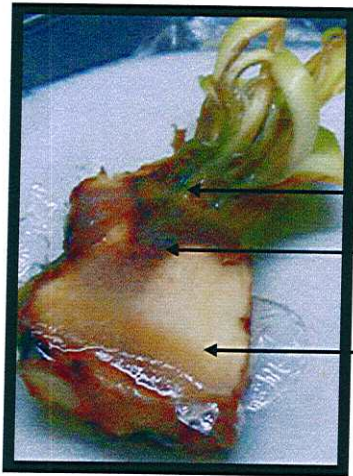
Figura 28. Bulbos de nardo infectados con las cepas seleccionadas (BV145, BV152, BV157).

5 DDI los nardos infectados con la cepa BV157 presentaron manchas acuosas en el lugar de la inoculación y en toda el área donde la solución bacteriana tuvo contacto con el tejido (Figura 29).



Figura 29. Síntomas de pudrición en bulbos de nardo provocados por la cepa BV157 5 DDI. Los síntomas se observaron con el cambio en la consistencia y color del tejido infectado.

La cubierta plástica que se colocó sobre los nardos infectados y las condiciones de humedad de las cámaras (Figura 28) crearon un microambiente que permitió a la infección avanzar sobre la parte contraria al lugar donde se inoculó lo que sugiere que la cepa BV157 probablemente tiene la capacidad de desplazamiento inter e intracelular. Esta zona del bulbo, 10 DDI presentó pudrición semi-acuosas sobre los primeros brotes de hojas, además de lugares con tejido necrosado y zonas blanquecinas que se tornaron de un color café oscuro. Con el cambio de color en el tejido se observó la intensidad de los síntomas. El tejido infectado mostró una consistencia blanda y extremadamente acuosa dando la impresión de que el tejido estuviera secretando algún compuesto a consecuencia de la podredumbre (Figura 30).



Pudrición semi-acuosa

Tejido necrosado

Desarrollo de la infección

10 DDI

Figura 30. Desarrollo de los síntomas de pudrición en bulbos de nardo provocados por la cepa BV157 en la parte contraria al lugar del inóculo 10 DDI. Se aprecian partes con tejido necrosado así como zonas blanquecinas que finalmente adquirieron un color café oscuro.

Parte anterior

Parte posterior



15 DDI

Figura 31. Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda provocados por la cepa BV157 15 DDI, en el lugar donde se colocó el inóculo (izquierda) y en la parte contraria a este (derecha).

Los síntomas de pudrición se hicieron más evidentes 15 DDI, tanto en la zona donde se colocó el inóculo como en la parte posterior (Figura 31). Se presentaron zonas de color café y tejido necrosado que adquirió un color negro similar al que adquirieron las hojas de lechuga romana conforme se desarrolló la infección en ellas. Por otra parte, prácticamente toda la superficie del nardo presentó pudrición misma que provocó que el tejido tuviera consistencia gelatinosa. También los primeros brotes de hojas se necrosaron y finalmente se colapsaron 20 DDI (Figura 32).

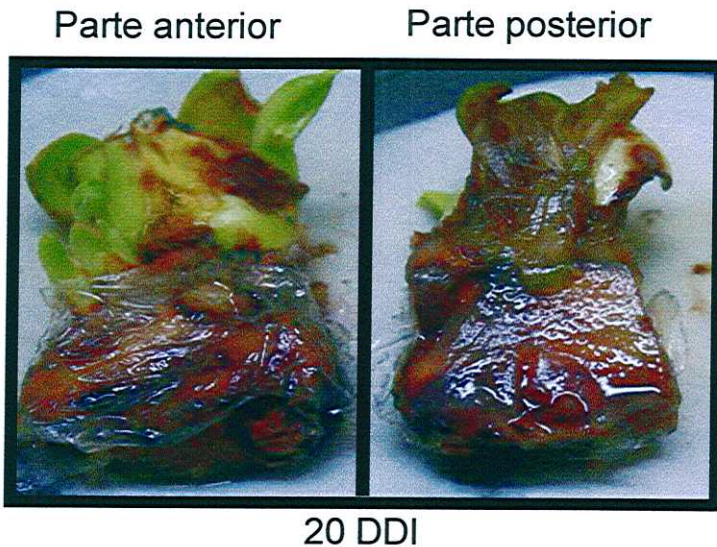
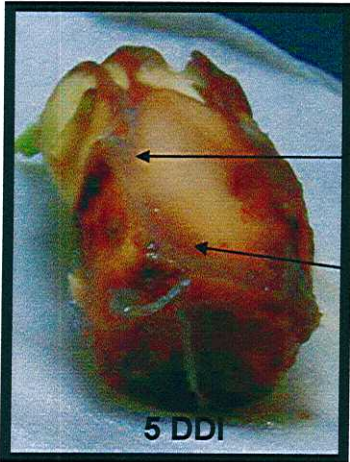


Figura 32. Desarrollo de la pudrición blanda en bulbos de nardo provocada por la cepa BV157 20 DDI. Lugar del inóculo (izquierda), parte posterior de la inoculación (derecha).

La cepa *E. chrysanthemi* 3937 provocó síntomas de pudrición 5 DDI, estos se observaron con la formación de zonas blanquecinas y la aparición de manchas semi-ocuosas sobre los bordes del nardo (Figura 33).



Formación de zonas blanquecinas

Manchas semi-acuosas

5 DDI

Figura 33. Síntomas iniciales de pudrición blanda en bulbos de nardo provocados por *E. chrysanthemi* 5 DDI.

Prácticamente, toda la zona donde se colocó la suspensión bacteriana presentó una coloración marrón 10 DDI con *E. chrysanthemi* (Figura 34).



Figura 34. Desarrollo de los síntomas de pudrición blanda en bulbos de nardo provocados por *E. chrysanthemi* en la zona de inoculación 10 DDI.

15 DDI, en la parte posterior al lugar de la inoculación observó la secreción de exudados cremosos sobre todo en los lugares con tejido más enfermo. Este síntoma es muy característico de pudrición blanda causada por *E. chrysanthemi* (Figura 35).



15 DDI

Figura 35. Coloración marrón en bulbos de nardo causada por *E. chrysanthemi* en la parte posterior al lugar de infección 15 DDI.

Después de 20 d de la inoculación, el bulbo presentó una fuerte pudrición blanda cuyos síntomas iniciales aparecieron como zonas blanquecinas y manchas semiacuosas que se tornaron de color marrón con el paso de los días. Finalmente la infección se extendió sobre toda la superficie del bulbo causando la necrosis del tejido y generando un olor desagradable (Figura 36).

Los bulbos inoculados con buffer fosfato (testigos negativos) 20 DDI permanecieron sanos (Figura 37).



20 DDI

Figura 36. Pudrición blanda expandida sobre toda la superficie del bulbo provocada por *E. chrysanthemi* 20 DDI.



Figura 37. Bulbos inoculados con buffer fosfato utilizado como testigos negativos, los cuales se mantuvieron sanos.

Al comparar, la evolución de los síntomas en los bulbos infectados con la cepa BV157 y los inoculados con *E. chrysanthemi* se observó que los síntomas de pudrición blanda fueron diferentes aunque en ambas se presentó 20 DDI. La

putridión causada por las cepas aisladas dejó el tejido infectado con consistencia más acuosa y un olor semejante al de uvas jóvenes. Por otra parte, las cepas aisladas tuvieron afinidad por infectar los primeros brotes de hojas en donde se produjo una secreción vercosa. También el avance de la infección se delimitó con el cambio de tonalidad del tejido enfermo. En contra parte *E. chrysanthemi* provocó un olor fétido en el bulbo enfermo, mientras que el tejido dañado adquirió una coloración marrón homogénea, se presentaron exudados cremosos como producto de la putridión (Figura 38).

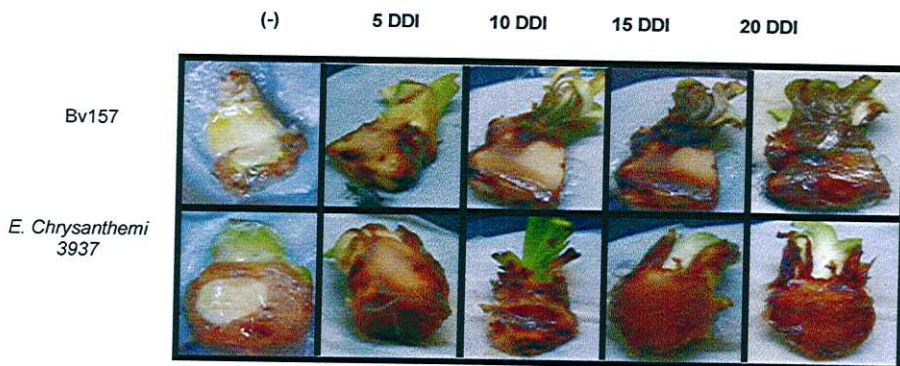


Figura 38. Comparación de los síntomas provocados por las cepa BV157 y *E. chrysanthemi*. (-) = Testigo negativo inoculado solo en el buffer de disolución de las bacterias. DDI = Días post inoculación.

20 DDI, a partir de tejido enfermo de los bulbos infectados se reaislaron las cepas *E. chrysanthemi* y BV157 sobre medio rico (LB) comprobándose con ello los postulados de Koch. Sin embargo para tener resultados más confiables sobre este reaislamiento se sugiere identificar las bacterias aisladas, una forma rápida de realizar esta caracterización es por medio de las pruebas moleculares ITS-PCR e ITS-RFLP.



## 10. DISCUSIÓN

El Estado de Morelos, ocupa el primer lugar en la producción de flor de nardo (*Polianthes tuberosa*). Sin embargo, a partir del año 2008 se presentó una disminución hasta en un 50 % en el rendimiento del cultivo a consecuencia del daño provocado por el picudo negro cuando las hembras ovipositan en los bulbos y al eclosionar las larvas se alimentan de los tejidos causando la pudrición y muerte de la planta (Hernández, 2003). Hoy en día, este problema ha sido abordado bajo diferentes líneas de investigación como lo demuestran los trabajos de Camino *et. al.* (2002) y Hernández (2003). Sin embargo, el cultivo de nardo también presenta síntomas de enfermedades bacterianas, cuya etiología no había sido estudiada hasta antes de este estudio, a pesar de que algunos autores como Rodríguez-Garay *et. al.* (2004) y Fucikovsky (2004) afirman que el picudo es vector natural de la bacteria *Erwinia* sp., una de las principales fitobacterias que han sido reportadas y cuya virulencia ha causado pérdidas millonarias en diversos cultivos (Fucikovsky y Villareal, 1991).

Teniendo en cuenta estos antecedentes la hipótesis de esta investigación fue que la pudrición blanda que se presenta en los bulbos de nardo en la región productora del Estado de Morelos se debía a la presencia de bacterias que producen pectinasas y celulasas que degradan los componentes de la pared celular, pertenecientes al género *Erwinia* (*Dikeya*).

En el presente trabajo, se aisló a partir de tejidos infectados de bulbos de nardo del municipio de Emiliano Zapata, Morelos una cepa bacteriana capaz de provocar pudrición blanda.

Inicialmente, catorce cepas fueron aisladas de bulbos enfermos al cultivarlas en medio mínimo M9 adicionado con ácido poligalacturónico (PGA) al 0.2 % (componente estructural de la pared celular de los vegetales al ser parte de las sustancias pecticas que conforman la lamina media). Con el crecimiento de las cepas en este medio se descartó el aislamiento de bacterias saprófitas y a la vez

se demostró que posiblemente las bacterias crecidas bajo estas condiciones tenían la capacidad de degradar el ácido poligalacturónico. Esto, es muy importante para el inicio de la pudrición blanda, ya que de acuerdo con Agrios (1998) la mayoría de las podredumbres inician con la degradación de cada uno de los componentes de la pared celular, mediante la acción de enzimas secretadas por las bacterias. Sin embargo, al someter las catorce cepas aisladas a la prueba de producción de enzimas pectidicas (PEL) y celulasas (CEL) necesarias para la degradación de la cutina y sustancias pecticas de la pared celular, sólo cinco de ellas fueron positivas.

Estas cepas, solo fueron positivas cuando el inoculo depositado en los medios PEL y CEL provino de un cultivo saturado en medio M9 adicionado con ácido poligalacturónico, por su parte la cepa *E. chrysanthemi* que se utilizó como testigo fue positiva al emplear inóculos provenientes de medio mínimo y medio rico. Con esto se evidencia que la secreción de pectinasas y célulasas en las cepas aisladas se estimula cuando tienen la necesidad de aprovechar un sustrato que es indispensable para su supervivencia. En cambio *E. chrysanthemi* secretó estas enzimas aún en un medio que le provee todos los nutrientes. A partir de estas pruebas bioquímicas se seleccionaron cinco cepas bacterianas (BV145, BV149, BV151, BV152 y BV157) capaces de secretar enzimas necesarias para ocasionar pudrición blanda, con el objetivo de tipificarlas morfológicamente, molecularmente y con pruebas de patogenicidad.

La cepa BV145, en medio de cultivo Luria-Bertani generó colonias blanco-amarillas convexas circulares de borde entero húmedas y brillantes. Tres de las cepas seleccionadas BV149, BV151 y BV157 presentaron colonias con una morfología similar, verde-azuladas, planas, lisas de borde dentado. Por su parte la cepa BV152 generó colonias blanco-verdosas circulares, lisas y de borde entero. Todas las cepas fueron Gram negativas, característica particular de la mayoría de las fitobacterias (Llama, 2002). Ninguna de las cepas seleccionadas presentó una morfología colonial similar a la de *E. chrysanthemi*. La morfología colonial de las

cepas BV149, BV151 y BV157 es muy similar a la que presentan algunas bacterias del género *Pseudomonas* (Holt *et al.*, 1994).

Respecto al análisis molecular, para realizar la extracción del ADN se probó el protocolo de Rong y Jiang, 2006 que propone un método rápido y simple para la extracción de ADN para bacterias Gram negativas. El método implica dos pasos importantes, en primer lugar la ruptura de las paredes de las células con un detergente y en segundo lugar, extracción, aislamiento y precipitación del DNA genómico. Este método permitió tener un ADN de buena calidad, útil para llevar a cabo reacciones de PCR.

En relación a la concentración y pureza del ADN, el 50 % de las muestras analizadas presentaron una concentración mayor a 45 ng/μL. Aunque en el Cuadro 8 se puede apreciar que no se obtuvo una concentración homogénea por lo que el método de extracción es muy variable. Con relación a la pureza en la relación 260/280 se tuvo que en el 80 % de las muestras los valores estuvieron entre 1.8 y 2.0 lo que indican que se encuentran en el rango óptimo de pureza. La calidad del ADN obtenido fue suficiente para realizar la amplificación para la técnica de RFLP.

Las condiciones de la reacción de PCR así como los cebadores empleados G1 y L1 propuestos por (Jensen *et al.* 1993) fueron ideales para la amplificación de la región ITS 16S-23S de las cepas aisladas como de los testigos. Con dicha amplificación se observó que ninguna de las cepas aisladas presentó un patrón de bandeo similar al de *E. coli* MG1655, *E. chrysanthemi* 3937, *E. carotovora* Ecc71. Por otro lado las cepas BV149, BV151, BV157 generaron un mismo patrón con una banda de 600 pb aproximadamente. De acuerdo con lo reportado por Garnier *et al.* (1991) la amplificación de la región ribosomal 16S-23S en bacterias con los cebadores G1 y L1 16S-23S produce un patrón de bandas entre 280-850 pb sobre este intervalo estuvieron todas las cepas probadas. Las bandas originadas por *E. coli* MG1655 coinciden con las reportadas en el banco de datos de Jensen *et al.* (1993) por lo que se concluye que la técnica de amplificación fue correcta.

Los resultados del ITS-PCR 16S-23S de las cepas aisladas y el análisis estadístico ACP y el AC mediante el método del promedio de grupo sugieren que aparentemente ninguna de las cepas pertenece al género *Erwinia*, además las cepas BV149, BV151, BV157 son idénticas (de acuerdo a esta técnica de análisis); el análisis estadístico agrupo esta tres cepas junto con *E. chrysanthemi*, y separa las cepas BV145 y BV152.

La enzima *RsaI* solamente realizó la digestión parcial del ITS 16S-23S de las cepas *E. coli* MG1655 y BV145 (Figura 10). Estos resultados, se explican por qué esta enzima fue propuesta por Toth *et al.* (2001) para identificar *E. carotovora subsp wasabiae*, *subsp odorifera/carotovora* y *E. cacticida* por lo que ninguna de las cepas aisladas y testigo coinciden con estas especies.

Los patrones de restricción generados con la enzima *CfoI* (Figura 11) junto con los análisis estadísticos de estos datos mediante ACP y el AC confirmaron nuevamente que ninguna de las cepas pertenece al género *Erwinia*, ya que ninguno de los patrones producidos por las cepas aisladas coinciden con *E. chrysanthemi* 3937, *E. carotovora* Ecc71, Toth *et al.* (2001). Asimismo permiten confirmar los resultados obtenidos con los datos proporcionados por el ITS-PCR 16S-23S de las cepas aisladas, estableciendo que las cepas BV149, BV151, BV157 son idénticas y probablemente la misma especie. Por otra parte el AC agrupa a las cepas BV149, BV151, BV157 junto con *E. chrysanthemi* 3937, *E. carotovora* Ecc71. Todas estas cepas establecidas dentro de un mismo grupo sugieren que el agrupamiento es debido a la capacidad que tienen ellas de provocar pudrición blanda; por otro lado las cepas BV145 y BV152 que no fueron capaces de provocar pudrición son agrupadas en otros nodos diferentes.

En base a lo anterior para las pruebas de patogenicidad en bulbos de *Polygonum tuberosum* y hojas de *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia ionantha* y *Lactuca sativa* se emplearon solamente las cepas BV157, BV152 y BV145.

Las pruebas de patogenicidad en hojas jóvenes de *Arabidopsis* mostraron 11 DDI las cepa BV157 provocó pudrición blanda en el 80 % de las hojas infectadas. Los

síntomas aparecieron como pequeñas lesiones acuosas en el lugar de la inoculación que fueron aumentando de diámetro hasta ocasionar la flacidez de la lamina foliar. Por otra parte solo el 40 % de las hojas infectadas con las cepas BV145 presentaron manchas de tipo acuoso sobre el sitio de inoculación; por su parte sólo el 5 % de la hojas infectadas con la cepa BV152 colapsaron a causa de la infección, el resto aparentemente presento reacción de hipersensibilidad. El bajo grado de infección de estas cepas podría ser originado por la presencia de poca virulencia hacia arabis. Las hojas inoculadas con *E. chrysanthemi* presentaron pudrición blanda 2 DDI como lo reportó Rincón-Enríquez (2008); estos resultados evidencian la alta virulencia de la cepa en hojas de arabis.

Por lo contrario en violeta africana *E. chrysanthemi* provocó síntomas 2 DDI, demostrando una alta virulencia. Sin embargo, ninguna de las cepas aisladas ocasionó pudrición blanda.

La patogenicidad y grado de virulencia de BV157 también quedó demostrada en hojas de lechuga romana las cuales exhibieron pudrición blanda 8 DDI. Los síntomas presentados comenzaron sobre la herida provocada a la hoja, la cual aumento de tamaño con la infección, extendiéndose rápidamente sobre toda la superficie, donde el tejido infectado se oscureció, ennegreció y finalmente se necrosó adquiriendo una consistencia aceitosa. Por su parte las cepas BV145, BV152 y *E. chrysanthemi* no causaron ningún síntoma bajo estas condiciones. Sin embargo Blancard *et al.* (2005) propone que *E. chrysanthemi* afecta más bien el tallo y raíces de la lechuga.

Las pruebas de patogenicidad en bulbos de nardo evidenciaron la patogenicidad y virulencia de la cepa BV157 y por otro lado la incapacidad de BV145 y BV152 de causar infección. Los síntomas causados por BV157 iniciaron 5 DDI como manchas de color café oscuro de aspecto húmedo sobre las lesiones producidas artificialmente. La cubierta plástica, que se colocó sobre los nardos infectados y las condiciones de alta humedad de las cámaras crearon un microambiente que permitió que la infección avanzará sobre la parte contraria al lugar de inóculo lo que sugiere que estas bacterias probablemente tienen la capacidad de

desplazamiento inter e intracelular, debido a la presencia de enzimas de alta capacidad biodegradante (López, 1994), lo cual se demostró con las pruebas de PEL y CEL. Esta zona del bulbo 10 DDI presentó pudrición semi-acuosas sobre las primeros brotes de hojas, además de lugares con tejido necrosado y zonas blanquecinas que se tomaron de un color café oscuro. Finalmente 20 DDI toda la superficie del bulbo presentó pudrición blanda dando la impresión de que el tejido tuviera consistencia gelatinosa. Una solución bacteriana de BV157 con una concentración de  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL ajustada en un espectrofotómetro (Eppendor Bio photometer®) fue la ideal para provocar pudrición sobre el bulbo. El factor ambiental fue fundamental para la expresión de los síntomas, temperaturas de 28-30°C y humedad relativa de 100 % fueron necesarias para el desarrollo de la enfermedad lo cual coincide con Fucikovsky y Villareal (1991). En las zonas productoras de Emiliano Zapata, Morelos se presentan condiciones de alta humedad y temperaturas entre 28 -30°C que son adecuados para el desarrollo de fitobacterias como las cepas BV157.

Por su parte *E. chrysanthemi* también provocó síntomas de pudrición blanda 5 DDI, que se observaron con la formación de zonas blanquecinas y manchas semiocuosas sobre el borde del bulbo. Prácticamente 20 DDI los bulbos presentaron una pudrición blanda cuyo tejido infectado adquirió color marrón presentando exudados cremosos que se distribuyeron sobre toda la superficie del bulbo síntomas característicos de esta cepa (Llama, 2002).

Al comparar las pudrición blanda causada por la cepa BV157 con la provocada por *E. chrysanthemi* se observó que ambas se presentaron 5 DDI, por lo que el grado de patogenicidad de ambas cepas es similar, mientras que los síntomas de pudrición se presentaron en forma más acuosa dentro de los tejidos infectados por la cepa BV157 que tuvo más afinidad por los primeros brotes de hojas. 20 DDI, de los bulbos infectados se reaislaron en medio LB las cepas BV157 y *E. chrysanthemi* cumpliéndose de esta forma los postulados de Koch, los cuales se comprobaron con un conteo de colonias sobre cajas de medico LB. Sin embargo,

se propone confirmar estos resultados utilizando las técnicas moleculares de ITS-PCR e ITS-RFLP.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización bioquímica, morfológica y molecular efectuada a las cepas aisladas BV145 BV152 y BV157 permiten rechazar la hipótesis planteada, porque ninguna cepa presentó la morfología y patrones de restricción del género *Erwinia*. Por otro lado *Erwinia chrysanthemi* 3937 es capaz de provocar pudrición blanda en nardo.

Probablemente las cepas BV145 y BV152 son cepas oportunistas en bulbos de nardo ya que por sí solas no fueron capaces de generar infección.

Los análisis bioquímicos, morfológicos y moleculares utilizados en este estudio para la identificación las cepas bacterianas son rápidos y efectivos, sin embargo por los antecedentes del área de estudio, estos estuvieron enfocados en la identificación del género *Erwinia* (*Dikeya*). Por lo cual fue necesario implementar pruebas adicionales para la tipificación de la cepa BV157 que fue la única entre las cepas seleccionadas capaz de provocar pudrición en bulbos de nardo. Dichas pruebas, estuvieron basadas en las características de crecimiento, morfología, olor y coloración verde-azulada que presentaron las cepas en medio LB líquido y en placa, que de acuerdo con Tsoreva y Rodríguez (2000) son propias de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Para probar esta posible hipótesis se hicieron algunas pruebas, las cuales consistieron en la producción de pirocianina en medio KA y fluoresceína en medio KB, además de su crecimiento a 42°C y pruebas de patogenicidad en lechuga romana. Para las pruebas de crecimiento en medio KA y KB se emplearon como testigos *E. chrysanthemi* 3937, *P. syringae* pv. *phaseolicola* cepa 1448 y *E. coli*. Los resultados obtenidos en estas pruebas demostraron que BV157 es capaz de crecer en medio KA y producir una coloración verde azulada lo cual sugiere la capacidad de producir pirocianina (De Luca *et al.*, 2005, Holt *et al.* 1994) ninguno de los testigos utilizados creció bajo las condiciones de este medio. Por su parte en medio KB, BV157 presentó una coloración amarillo-verdosa y produjo fluorescencia bajo luz ultravioleta, al igual que la cepa *P. pv. phaseolicola syringae* 1448. También *E. chrysanthemi* 3937 y *E.*

*coli* MG1655 crecieron bajo estas condiciones mas no produjeron fluorescencia. La cepa BV157 fue capaz de crecer en medio KA, KB y LB a una temperatura de 42°C después de 48 horas. *E. coli* MG1655 creció a 42°C en medio KB y LB. A su vez BV157 provocó pudrición blanda en hojas de lechuga romana y arabidopsis. Los resultados obtenidos en estas pruebas sugieren que probablemente la cepa BV157 pertenece a la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria es comúnmente encontrada en agua no potable y suelo. En los últimos años se ha presentado especial atención a este patógeno debido a que es una bacteria oportunista en humanos además de que presenta una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos Tesoraeva y Rodríguez (2000). Rahme *et al.* (1997), Rahme *et al.* (2000), Yorgey *et al.* (2001) y Walker *et al.* (2004) han reportado que *P. aeruginosa* es capaz de provocar síntomas de pudrición blanda en hojas de lechuga romana y arabidopsis, además de que proponen la idea que *P. aeruginosa* presenta factores de virulencia comunes en plantas y animales. De Luca *et al.* (2005) reportó que *P. aeruginosa* ha sido encontrada en suelos hortícolas proveniente del agua de riego. En la región productora de nardo del Municipio de Emiliano Zapata Morelos el principal abastecimiento de agua del cultivo son aguas residuales, por lo que se tiene que poner especial atención en este aspecto.

La secuenciación del 16S y un análisis filogenético de la cepa BV157 permitirá verificar si efectivamente esta bacteria pertenece a la especie *P. aeruginosa*. Este resultado sería de gran importancia a nivel fitopatológico debido a que con él se demostraría por primera vez que *P. aeruginosa* es capaz de provocar pudrición blanda en bulbos de *P. tuberosa*.



## 11. CONCLUSIONES

- En el Municipio de Emiliano Zapata, Morelos se aisló la cepa BV157 cuyas colonias son verde-azuladas, planas, lisas de borde dentado y con un fuerte olor a uvas jóvenes, capaz de provocar pudrición blanda en bulbos de *Polianthes tuberosa*.
- Los análisis bioquímicos, morfológicos y moleculares utilizados para la identificación, permiten afirmar que la cepa aislada no pertenece al género *Erwinia* (*Dikeya*).
- El cultivo de la cepa BV157 en los medios KA y KB, además de su crecimiento a 42° y su capacidad de provocar pudrición blanda en hojas de *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa* sugieren que probablemente BV157 pertenece a la especie *Pseudomonas aeruginosa*.
- Las pruebas de patogenicidad en bulbos de nardo infectados con la cepa *E. chrysanthemi* 3937, demuestran que es capaz de provocar pudrición blanda 20 DDI bajo las condiciones establecidas.
- La utilización del medio mínimo M9 adicionado con PGA 0.2 % como un medio selectivo así como las pruebas de pectinasas (PEL) y celulasas (CEL) permiten seleccionar bacterias potenciales capaces de provocar pudrición blanda.
- Las técnicas moleculares empleadas ITS-PCR e ITS-RFLP, son una herramienta útil para realizar la identificación de bacterias de una forma rápida y confiable, siempre y cuando se cuente con una base de datos en donde se puedan comparar los resultados obtenidos. Sin embargo, en este

estudio las pruebas de ITS-PCR e ITS-RFLP permitieron identificar que tres de las cepas seleccionadas correspondían a la misma bacteria y con esto se ahorró tiempo y trabajo al realizar las pruebas de patogenicidad.

- Las condiciones de alta humedad así como temperaturas de 28-30°C de las cámaras húmedas, fueron las ideales para el desarrollo de los síntomas de pudrición blanda provocados por la cepa *E. chrysanthemi* 3937 y BV157 en bulbos de nardo.

## 12. PERSPECTIVAS

Con el objetivo de verificar que la cepa BV157 pertenece a la especie *Pseudomonas aeruginosa*, se propone secuenciar el 16S de esta cepa con el fin de hacer un análisis bioinformático.

Para tener resultados más confiables en las plantas infectadas, se sugiere probar los postulados de Koch mediante la técnica de ITS-RFLP.

Muestreos más a fondo en las zonas productoras de nardo del Estado de Morelos permitirán ampliar el estudio sobre las fitobacterias causantes de pudrición blanda en bulbos de nardo.

### 13. LITERATURA CITADA

- Abalos, A., M. Viñas, J. Sabaté, M. A. Manresa y A. M. Solanas. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation*. 15: 249-260.
- Agrios, G. 1998. *Fitopatología*, 3ª edición. Ed. Limusa. México.p 64-98.
- Aquino, J. y G. Vázquez. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 127-137.
- Barry, T., G. Collieran, M. Glennon, L. K. Dunican y F. Gannon. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer región as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR methods applications* 1: 51-56.
- Bej, A. K., M. H. Mahbubani y R. M. Atlas. 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Biochemistry and molecular biology* 26: 301-334.
- Blancard, D., H. Lot y B. Maisonneure. 2005. *Enfermedades de la lechuga identificar, conocer y controlar*. 9ª edición. Ed. Mundi-prensa. Francia pp 287-288.
- Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen y J. van der Noordaa, 2009. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of microbiology*. 28 495-503.
- Camino, L. M., G. V. Castrejon, B. R Figuroa, L. L. Aldana y E. M. Valdés. 2002. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, (Coleoptera:Curculionidae) Attacking

*Polygonum tuberosum* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, México. Entomologist 2: 392-393.

CESVEMOR. 2009. Manual operativo de la campaña manejo fitosanitario de ornamentales/nardo. pp 1-31.

Ching-Hsing L. 1989. Analysis of pectate lyases produced by soft-rot bacteria associated with spoilage of vegetable. Microbiology p 1677-1683.

Collmer, A. y N. T. Keen. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Phytopathol 24: 384-409.

Collmer, A., D. H. Whalen, S. V. Beer y D. F. Bateman. 1982. An exo-poly-alpha-D-galacturonidase implicated in the regulation of extracellular pectate lyase production in *Erwinia chrysanthemi*. Bacteriol. 149: 626-634.

De Luca, A., S. Zamora y A. M. Folabella. 2005. Bacterias indicadoras de riesgo sanitario aportadas por el riego frente a la supresividad edáfica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNMDP. Departamento de Biología. Laboratorio de Microbiología.

Denny, T. P. 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. Phytopathology 33: 173-197.

Dickey, R. S. 1981. *Erwinia chrysanthemi*: reaction of eight plants to strains from several hosts and to strains of other *Erwinia* species. Phytopathology 71: 23-29.

Doke, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. Physiology Plant Pathology. 23: 345-357.

- Douet, V., D. Expert, F. Barras y B. Py. 2009. *Erwinia chrysanthemi* iron metabolism: the unexpected implication of the inner membrane platform within the type II secretion system. *Journal of Bacteriology* 191: 795-804.
- Ephinstone, J. G. 1987. La pudrición blanda y la pierna negra de la papa *Erwinia* sp. Bol. Información técnica Internacional de la papa. Lima Peru.
- Evans, F. F., M. J. Raflery, S. Egan y S. Kjellberg. 2007. Profiling the secretome of the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate* using amine-specific isobaric taggins. *Proteome* 6:967-975.
- Favaron, F., P. Marciano y P. Mago. 1992. Characterization of two *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonases with different abilities to elicit glycellin in soybean. *Microbiology* 23: 998-1000.
- FITOLAB,. 2008. Caracterización fitosanitaria del cultivo de nardo (*Polygonum tuberosum*) en el Estado de Morelos. En [www.fitolab.com.mx](http://www.fitolab.com.mx), consultado el 18 de septiembre de 2010.
- Frits, W. 1981. Las plantas. 2ª edición. Ed. Time-Life. Amsterdam pp. 9.
- Fucikovsky, L. 2000. Manual de prácticas de bacterias fitopatógenas. Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. p 45.
- Fucikovsky, L. 2004. *Agave tequilana* Weber var. azul y sus principales problemas fitosanitarios. En: Garindo L. E., B., Rodríguez-Garay. Avances de la investigación en el Agave tequilero, Jalisco, México, editorial Consejo Regulador del Tequila CRT pp. 148-177.

- Fucikovsky, L. y L. Villarreal. 1991. Supervivencia y dispersión de *Erwinia caratovora* subsp. *Atroseptica* y *E. caratovora* subsp. *Caratovora* en el valle de Toluca, México. *Revista Latinoamericana de la papa* 4: 52-61.
- Gabino, R., G. Castañeda y L. Fucikovsky. 2004. Identification of bacteria associated to necrotic leaf spots in plants of *Lycaste aromatic*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 338-344.
- Gaitán, D. M. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en cultivos de crisantemo. Pontificia Universidad Javeriana, trabajo de grado. Bogotá DC. 114 p.
- García, R., E. Zavaleta y M., Mora. 2003. Etiología de la marchitez del Crisantemo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 75-78.
- García, R., E. Zavaleta y R., Rojas. 2005. Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* causante de la roya blanca del crisantemo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 79-86.
- Garnier, T., B. Canard y S. T. Cole. 1991. Cloning, mapping, and molecular characterization of the rRNA operons of *Clostridium perfringens*. *Bacteriology* 173: 5431-5438.
- Gonzaga, A. 2008. Captura del Picudo negro *Scyphophorus acupunctatus* Gyellenhal (Coleóptera), en parcelas de nardo *Polianthes tuberosa*, con feromona de agregación y un cebo natural, en relación horas/días en Mazatepec Morelos. *Florida entomologist* 3: 388-340.
- Gross, D. 1991. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* 29: 247-278.

- Hernández, R. M. 2003. Ciclo de vida y conducta reproductiva de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal. (Coleoptera:Curculionidae) plaga del nardo en Morelos. Simposio Latinoamericano de Ciencias Hortícolas 8: 262-263.
- Hillis, D. M. y M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Quarterly Review of Biology 4: 411-453.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. Sneath, J. T. Staley y W. Stanley. 1994. Bergey's Manual of determination bacteriology. 9ª edición. Ed. Lippincott. Baltimore, Maryland USA. pp 93-105.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., G. Condemine, W. Nasser y Reverchon S. 1996. Regulation of pectolysis in *Erwinia Chrysanthemi*. Microbiology. 50: 213-257.
- INEGI, 2010. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Emiliano Zapata. Clave geoestadística 17008 pp 1-9.
- Jensen, M. A., J. A. Webster y N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. Microbiology 59: 945-952.
- Joardar, V., M. Lindeberg, D. J. Shneider, A. Collmer y C. R., Buell. 2005. Lineage-specific regions in *Pseudomonas syringae* pv tomato DC300. Molecular Plant Pathology 6: 53-64.
- Jones, L. R. 1901. A soft rot of carrot and other vegetables caused by *Bacillus carotovorus*. Vt Agric Exp Stn Annu Rep 13: 299-332.

- Karl, S. A., B. W. Bowen y J. C. Avise. 1992. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analysis of anonymous nuclear loci. *Genetics* 131: 163-173.
- King, E. O, M. S. Martha, K. Ward y D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein, *J. Lab. Clin. Med* 5: 44-301.
- Levine, A., L. Tenhaken, R. Dixon y R. Lamb. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Llama, M. A. 2002. Genes implicados en la adaptación de *Erwinia chrysanthemi* al microambiente de la planta. Universidad Politécnica de Madrid. Tesis doctoral. Madrid, España. 111 p.
- Longoni, P., R. K. Tasman y P. Carrizo. 2002. Perímetros de colonias de *Polygonum tuberosum* (Agavácea) como respuesta a los tamaños de bulbos plantados y las fechas de plantación. XXVII Congreso Argentino de Horticultura. Villa de Merlo San Luís, Argentina.
- López, F. M. C. 1994. Los caminos de la fitopatología. Universidad Autónoma de Chapingo. 1ª Ed. 216 p.
- Márquez, N. R. 2009. La pared celular. En [www.biologia.edu.ar/botanica](http://www.biologia.edu.ar/botanica), consultado el 12 de junio de 2010.
- Martínez, A. 2009. Enfermedades más comunes de plantas ornamentales en Georgia. En [www.caes.uga.edu](http://www.caes.uga.edu), consultado el 15 junio 2010.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N. Y. pp. 431-432.



- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton y P. A. Fuerst. 1998. What molecules with tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Perombelo, M. C. M. y A. Kelman. 1980. Ecology of the sof rot *Erwinias* *Phytopathol.* 18: 361-387.
- Rahme, L. G, M. W. Tan, L. Le, S. M. Wong, R. G. Tompkins, S. B. Calderwood y F. M. Ausubel. 1997. Use of model plants hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Microbiology* 94:13245-13250.
- Rahme, L. G., F. M. Ausbel, H. Cao, E. Drenkard, B. C. Goumnerov, G. W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M. W. Tan, J. Tsongalis, C. L. Walwndziewicz y R. G. Tompkins. 2000. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *PNAS* 16:8815-8821.
- Rincón-Enríquez, G., F. Barras y B. Py. 2008. Biogenesis of Fe/S proteins and pathogenicity: IscR plays a key role in allowing *Erwinia chrysanthemi* to adapt to hostile conditions. *Molecular Microbiology* 6: 1257-1273.
- Rodríguez-Garay, B., A. Gutiérrez-Mora, M. M. Loera-Quezada y E. P. Flores-Barrientos. 2004. La materia prima *Agave tequilana* Weber var azul. En: Garindo, L. E., B. Rodríguez-Garay. *Avances de la investigación en el agave tequilero*, pp. 3-46, Jalisco, México, Editorial Consejo Regulador del Tequila CRT, pp. 3-46.
- Rong, H. y N. Jiang. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology* 28: 55-59.
- SAGARPA, 2010. Agenda de Innovación Tecnológica. En [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)., consultado el 2 de agosto de 2009.

- Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. Bol. Sociedad. Botanica Mexicana 60:73-76.
- Solís, A., H. González, H. y Flores M. 1999. Insectos asociados con *agave tequilaza* var. Azul en cinco localidades de Jalisco, México. En: Memorias XXXIV Congreso Nacional de Entomología, Aguascalientes, Aguascalientes. pp: 455-457.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 1991. Plant and cell architecture. Plant physiology. 5:3-27.
- Tam, J. P., Y. A. Lu., J. L. Yang, K.W. Chiu.1999. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to end macrocycle and cystine knot disulfides. Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 8913-8918.
- Tariq, V. N., y P. Jeffries. 1987. Cytochemical localization of lipolytic enzyme activity during penetration of host tissue by *Sclerotinia sclerotiorum*. Physiology Molecular Plant Pathology 30:77-91.
- Toth, I., A. Arova y L. Hyman. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinia* by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. Environmental Microbiology 67: 4076-4076.
- Tsoraeva, A. and C. Rodriguez. 2000. Comparison of two cultura media for selective isolation and membrane filter enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water. Revista Latinoamericana de Microbiologia 42:149-154.
- Valadez, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas Teoría y protocolos de laboratorio). 1ª edición. Ed. Mundi-Prensa. pp 64-70.

- Villanueva, E. y M. A Sánchez. 2005. Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar del crisantemo en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 49-56.
- Walker, T. S., H. P. Bais, E. Déziel, H. P. Schweitzer, L. G. Rahme, R. Fall y J M. Vivanco. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-Plant root interactions. Pathogenicity, Biofilm formation, and Root exudation. *Plant Physiology* 134:320-331.
- Walton, J. D. 1996. Host-selective toxins: Agents of compatibility. *Plan cell.* 8: 1723-1733.
- Yogey, P. L. G. Rahme, M. W Tan y F. M. Ausubel. 2001. The role of *mucD* and alginate in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in plants, nematodes, and mice. *Molecular Microbiology* 41:1063-1076.

#### 14. APENDICE 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

<b>Medio Luria-Bertani (LB)</b>	<b>(1 L)</b>
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
Triptona	10.0 g
Agar	15.0 g
pH	7
Ajustar el pH con HCL y NaOH 1 M	

<b>Medio Miller 1972 (M9)</b>	<b>(1 L)</b>
M9 5X	200 mL
MgSO <sub>4</sub>	2 mL
CaCl <sub>2</sub>	0.1 mL
PGA concentración final 0.2%	

<b>Medio King A (KA) (King <i>et al.</i>, 1954)</b>	<b>(1 L)</b>
Bacto peptone	20.0 g
Bacto agar	15.0 g
Glycerol	10 mL
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhydrous)	10.0 g
MgCl <sub>2</sub> (anhydrous)	1.4 g
pH	7.2

<b>Medio King B (KB) (King <i>et al.</i>, 1954)</b>	<b>(1 L)</b>
Peptone protease	20.0 g
Bacto agar	15.0 g
Glycerol	15 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5 g
pH	7.2

<b>Medio CEL</b>	<b>(1 L)</b>	
Fosfato 50X		
$K_2HPO_4$	350 g	SOLUCIÓN A
$KH_2PO_4$	100 g	
pH	6.9-7.1	
Ajustar el pH con HCL y NaOH 1M		
CMC	10.0 g	SOLUCIÓN B
Agar	16.0 g	
Extracto de levadura	5.0 g	SOLUCIÓN C
Glicerol (100%)	2 mL	
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g	
$MgSO_4$	0.1g	

<b>Medio PEL</b>	<b>(1 L)</b>	
Agar	16 g	SOLUCIÓN A
Extracto de levadura	1 g	
$(NH_4)_2 SO_4$	1 g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.246 g	
Glicerol 100%	5 mL	
Buffer phosphate		
$Na_2 HPO_4$	15 g	SOLUCIÓN B
$NaH_2PO_4$	0.7 g	