

Patogenicidad bacteriana en maíz (Zea mays)

Bacterial Pathogenicity IN CORN

Rocío Pérez-y-Terrón

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

rociperez33@hotmail.com

Julio César Carmona Díaz

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

julio.cesarcd@hotmail.com

Jorge Alejandro Cebada Ruíz

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

jcebadac@yahoo.com.mx

José Antonio Munive Hernández

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

munive68@yahoo.com.mx

Resumen

El maíz es un grano de consumo mundial para alimento tanto humano como animal. México se encuentra en el séptimo lugar de la producción, China y Estados Unidos son los principales consumidores. Zea mays pertenece a la familia de las gramíneas y tiene producción anual. La planta se puede ver afectada por plagas principalmente de diferentes especies de insectos. Puede también desarrollar enfermedad debida a hongos y virus, así como a bacterias patógenas. Dentro de estas la causada por organismos del género Pantoea. P. stewartii se sabe que tiene genes como cps que codifican para la producción de exopolisacarido sterwatan controlada por un mecanismo de quórum sensing, y hrp para el sistema de secreción tipo III involucrados en la patogenicidad de la bacteria. En la descripción del genoma de P. ananatis se identifica posibles determinantes de patogenicidad

como para el EPS ananatan; no contiene sistemas de secreción II y III pero si el IV, los cuales pueden estar relacionados con su patogenicidad. Hemos aislado *P. ananatis* de cultivos de maíz y amplificado secuencias para *cps* y *hrp*. Se ha probado la patogenicidad en plántulas de maíz y frijol observándose las lesiones de mancha blanca, clorosis y zonas necróticas de las hojas.

Palabras clave: *Zea mays*, patogenicidad, *Pantoea*.

Abstract

Corn is a grain world for both human consumption and animal feed. Mexico is in the seventh place of production, China and the U.S. are the main consumers. *Zea mays* belongs to the grass family and has annual production. The plant can be affected by pests mainly of different species of insects. It can also develop due to disease fungi and viruses, as well as pathogenic bacteria. Within these caused by organisms of the genus *Pantoea*. *P. stewartii* is known to have such *cps* genes encoding exopolysaccharide production sterwatan controlled by quorum sensing mechanism, and *hrp* for type III secretion system involved in pathogenicity of the bacteria. In the description of the genome of *P. ananatis* possible pathogenicity determinants to identify the EPS ananatan; contains no secretion systems II and III but the IV, which may be linked to pathogenicity. We have isolated *P. ananatis* of corn and amplified sequences and *hrp cps*. Have been tested for pathogenicity in maize and bean seedlings observed white spot lesions, chlorosis and necrotic areas of leaves.

Key words: *Zea mays*, pathogenicity, *Pantoea*.

Fecha recepción: Julio 2011

Fecha aceptación: Noviembre 2011

Introducción

El maíz es un cultivo muy remoto, sugiriéndose que tiene una antigüedad de unos 7000 años, aunque su origen no es muy claro. Los hallazgos más antiguos de esta planta se han encontrado en el altiplano de México, por lo que se refiere a esta región como el punto de irradiación. Este cereal fue uno de los principales productos de subsistencia de

generaciones de indígenas. Hoy en día su cultivo está muy extendido por todo el resto de países y en especial en toda Europa y EEUU donde ocupa una posición estratégica (Cooperativa Colonias Unidas. Agropec. Inc. LTDA. Itapúa, 2005, Salvador, 1997).

Entre los principales productos que se pueden obtener a partir del maíz se encuentran los siguientes:

Proteína y fibras: para la elaboración de alimentos balanceados.

Azúcares como: Dextrosa para botanas, panificación, bebidas, sueros, lisina, ácido cítrico y antibióticos; Jarabe de alta fructosa: como edulcorante para la elaboración de refrescos, jugos, mermeladas, dulces, postres, vinos y endulzantes de bajas calorías; y Glucosa: para la fabricación de dulces, caramelos y chicles.

Etanol: alcoholes industriales, bebidas alcohólicas y combustibles.

Aceites: comestible de uso doméstico y alimentos para bebé.

Almidón: para la elaboración de pan, atole, alimentos infantiles, cerveza, cartón corrugado y papel.

Colorante: en los procesos para la elaboración de refrescos, cerveza, licores, embutidos y panificación.

Maltodextrinas: leche en polvo, embutidos, chocolate en polvo, alimentos en polvo.

Sorbitol: para pastas de dientes y confitería (SE, 2012).

En un contexto general se sabe que las bacterias asociadas a las plantas pueden comportarse como benéficas o dañinas. Todos los vegetales tienen microbiota bien sea superficiales (epífitos) o en su interior (endófitos). Algunos son residentes y otros transitorios. Las bacterias se encuentran entre los microorganismos que colonizan a las plantas en forma sucesiva, a medida que estas maduran poblaciones grandes de bacterias se vuelven visibles en forma de agregados en como biofilms taponando los vasos de las plantas. Dependiendo del tipo bacteriano, se requieren poblaciones de aproximadamente 10^6 UFC/ ml (Unidades Formadoras de Colonia/mililitro) o mayores para que las bacterias funcionen como ya sea

como agentes de control biológico, con fines beneficiosos, o como patógenos causando enfermedades infecciosas (Vidaver et al., 2004).

Características generales

La planta del maíz (*Zea mays*) perteneciente a la familia de las gramíneas, es de porte robusto de fácil desarrollo y de producción anual. El tallo es simple, erecto, de longitud elevada (pudiendo alcanzar los 4m de altura) y sin ramificaciones. Por su aspecto recuerda al de una caña, presenta entrenudos y una médula esponjosa. El maíz es de inflorescencia monoica, con inflorescencias masculina y femenina separadas dentro de la misma planta. La inflorescencia masculina presenta una panícula (denominada espigón o penacho) de coloración amarilla que posee una elevada cantidad de polen en el orden de 20 a 25 millones de granos. En cada florecilla que compone la panícula se presentan tres estambres. Las hojas son largas, de gran tamaño, con extremos muy afilados y cortantes, lanceoladas, alternas, paralelinervas, abrazadas al tallo y muestran presencia de vellosidades en el haz. Las raíces son fasciculadas y en algunos casos sobresalen unos nudos a nivel del suelo en aquellas raíces secundarias o adventicias (Cooperativa Colonias Unidas. Agropec. Inc. LTDA, 2006).

El maíz es utilizado tanto en alimentación humana como animal, pudiendo obtenerse numerosos productos a partir de las distintas variedades botánicas cultivadas (OIEDRUS, 2007); entre las más importantes cabe destacar las siguientes:

- a) *Zea mays* L. var. *indentata* (Sturtev.) L. H. Bailey: es la variedad botánica más cultivada en el mundo; comúnmente se le conoce como maíz dentado (dent corn).
- b) *Zea mays* L. var. *indurata* (Sturtev.) L. H. Bailey: los maíces pertenecientes a esta variedad botánica, son conocidos comúnmente con el nombre de maíces cristalinos (flint corn). Sus granos son córneos y duros, vítreos y de forma redondeada o ligeramente aguzada. El color de los granos es típicamente anaranjado.
- c) *Zea mays* L. var. *saccharata* (Sturtev.) L. H. Bailey: los maíces pertenecientes a esta variedad botánica, son conocidos comúnmente como maíces dulces (sweet corn).

La semilla de maíz está contenida dentro de un fruto denominado cariósido; la capa externa que rodea este fruto corresponde al pericarpio, estructura que se sitúa por sobre la testa de la semilla. Esta última está conformada internamente por el endosperma y el embrión, el cual a su vez está constituido por la coleoriza, la radícula, la plúmula u hojas embrionarias, el coleoptilo y el escutelo o cotiledón (OIEDRUS, 2007).

La composición promedio de un cariósido de maíz perteneciente a la especie *Zea mays* L. var. *indentata* (Sturtev.) L. H. Bailey, es de un 65 a 70% de almidón, 1 a 2% de azúcares, 10 a 11% de proteína; un 4 a 5% de fibra con la mitad (2 a 2.5%) de fibra y 1 a 2% de ceniza. El porcentaje de humedad relativa es entre 12 y 13% (OIEDRUS, 2007; FAO, 2007).

Producción de maíz

El nivel de producción de maíz depende tanto de la superficie destinada a dicho cultivo, como de los rendimientos del mismo. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estima que la producción mundial de maíz 2012/13 será de 839,68 millones de toneladas y 40,7 millones de toneladas menor a lo cosechado durante los años de 2011 y 2012 (Agropanorama, 2013; FAO, 2007; SE 2012).

Los principales países productores de maíz al año son:

Estados Unidos con 272,4 millones de toneladas

China produce 200,00 millones de toneladas

Brasil 70,0 millones de toneladas

Unión Europea (27 Estados) 54,64 millones de toneladas

Argentina 28,0 millones de toneladas

Ucrania 21,0 millones de toneladas

México 20,7 millones de toneladas

(Agropanorama, 2013).

Estados Unidos es el mayor país consumidor de maíz con 261.67 millones de toneladas lo que representa el 33.9% del consumo mundial, en segundo lugar China con el 19.29%, en tercero la Unión Europea con el 8.22% y México es el cuarto lugar con el 4.14% (SIAP, 2012).

El mercado de nacional de maíz está compuesto por diversas variedades entre las que destacan el maíz blanco y el amarillo, pero también existen otras variedades como el maíz de color y el pozolero, siendo las dos primeras variedades son las que ocupan una importante participación en la producción y comercialización. (SE, 2012).

La producción en México para el periodo 2012/2013 es principalmente de maíz en grano con 17,635,417.30 Tons, con un rendimiento de 7.28 Ton/Ha; seguida de maíz forrajero con 9,605,147.84 Tons y un rendimiento de 30.86 Ton/Ha; seguida de maíz grano para semilla y maíz palomero con una producción de 24,721.94 y 472.60 Tons respectivamente (SIAP, 2013).

México es un país históricamente deficitario en la producción-consumo de maíz, debido a que la producción interna no es suficiente para abastecer la demanda requerida. El mercado de importación, acopio y comercialización está concentrado en pocas empresas, quienes lo almacenan y distribuyen, no permitiendo la entrada de nuevos competidores (SE, 2012).

Patologías causadas en el maíz

El maíz, como muchos otros cultivos es susceptible a diversas enfermedades que afectan el desarrollo de la planta y su fruto. Las enfermedades se ven favorecidas por las condiciones ambientales, el tipo de suelo, la susceptibilidad de los materiales, y cuando son enfermedades causadas por agentes virales, se afecta por condiciones que favorezcan la migración, supervivencia y establecimiento de vectores (Varón y Sarria, 2007).

Las principales enfermedades del maíz suelen ser causadas por hongos y virus, ocasionando grandes pérdidas económicas, en menor grado se presentan las enfermedades causadas por

bacterias que ocasionan relativamente menores daños y costos económicos. La mayoría de las plantas, silvestres y cultivadas tienen inmunidad innata o resistencia a muchos patógenos. Sin embargo, muchas plantas pueden hospedar fitopatógenos sin desarrollar síntomas (asintomáticas) (Vidaver et al, 2004; Infoagro, 2013).

Existen diferentes patologías en el maíz, algunas son debidas a la presencia y establecimiento de plagas como los insectos, en ellos el gusano de alambre que se presenta en suelos arenosos y ricos en materia orgánica. Estos gusanos son coleópteros del género *Conoderus* y *Melanotus*, ocasionan grave deterioro en la planta e incluso la muerte. Los gusanos grises, son larvas de clase lepidópteros pertenecientes al género *Agrotis*. La especie *Agrotis ipsilon* provoca daño a nivel del cuello de la planta produciéndoles graves heridas (Infoagro, 2013).

Los pulgones como *Rhopalosiphum padi*, se alimentan de la savia provocando una disminución del rendimiento final del cultivo. Mientras que el pulgón verde del maíz *Rhopalosiphum maidis* es transmisor de virus al extraer la savia de las plantas atacando principalmente al maíz dulce, esta última especie tampoco ocasiona graves daños debido al rápido crecimiento del maíz. La piral del maíz *Ostrinia nubilalis*, que es un gusano barrenador del tallo y desarrolla de 2 a 3 generaciones larvarias llegando a su total desarrollo alcanzando los 2 cm de longitud. Las larvas comienzan alimentándose de las hojas del maíz y acaban introduciéndose en el interior del tallo. Los tallos acaban rompiéndose y las mazorcas que han sido dañadas también (Infoagro, 2013).

Los taladros del maíz son dos plagas ocasionadas por *Sesamia nonagrioides*, un lepidóptero cuya oruga taladra los tallos del maíz produciendo numerosos daños. La oruga mide alrededor de 4 cm, pasa el invierno en el interior de las cañas de maíz donde forman las crisálidas. Las mariposas aparecen en primavera depositando los huevos sobre las vainas de las hojas; *Pyrausta nubilalis*, la oruga de este lepidóptero mide alrededor de 2 cm de longitud, cuyos daños se producen al consumir las hojas y excavar las cañas de maíz. La puesta de huevos se realiza en distintas zonas de la planta (Infoagro, 2013).

Entre algunos ejemplos de las principales enfermedades bacterianas tenemos la provocada por *Pseudomonas alboprecipitans*, se manifiesta como manchas en las hojas de color blanco

con tonos rojizos originando la podredumbre del tallo. *H. turcicum* afecta a las hojas inferiores del maíz. Las manchas son grandes de 3 a 15 cm y la hoja va tornándose de verde a parda. Sus ataques son más intensos en temperaturas de 18 a 25°C. Las hojas caen si el ataque es muy marcado. La Antranocosis se debe a la presencia de *Colletotrichum graminocolum*. Las lesiones que provoca son manchas color marrón-rojizo y se localizan en las hojas, producen arrugamiento del limbo y destrucción de la hoja (Infoagro, 2013; Varón y Sarria, 2007).

La plaga bacteriana por *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, causa rayas o manchas largas y estrechas de la hoja, con bordes marrón, las hojas son fácilmente cortadas y esto puede estar asociado a la pudrición del tallo alto. *Burkholderia andropogonis* produce rayas largas, paralelas, de color verde olivo a amarillo y lesiones de humedad (empapado), las hojas superiores pueden estar casi blancas. La marchitez de la hoja del maíz del Norte producida por *Setosphaeria turcica* da lugar a largas manchas similares a formas de ejes de color gris verdoso; pero la marchitez de la hoja producida por *Cochiobolus heterostrophus*, y la mancha de la hoja de maíz producida por *C. carbonum* causan manchas bien definidas color naranja a café. (Stack et al, 2002).

Clavibacter michiganensis sbsp. *nebrakensis* provoca síntomas parecidos a la enfermedad de Stewart, con lesiones de aspecto húmedo paralelas a las nervaduras de las hojas de color verde intenso a negro. En la infección por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, se observan manchas pequeñas en las puntas de las hojas inferiores de color verde que posteriormente se torna a café rojizo. En lesiones avanzadas se observa un halo amarillento que las rodea. *Xanthomonas translucens* se transmite en las semillas probando la raya bacteriana y *Rathayibacter tritici* ataca con la pudrición de la espiga (CIMMYT, 2013).

Pantoea stewartii provoca la enfermedad de Stewart reportada en 1897 en New York sobre maíz dulce. Actualmente no se presenta de manera importante en América del Centro y del Sur donde se originó el maíz. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* puede también transmitirse a partir de suelo, abono o tallos de maíz durante el frío invierno. El agente principal responsable de la dispersión en USA es el escarabajo *Chaetocnema pulicaria*, pero además se puede presentar en otros vectores como *Diabrotica undecimpunctata howardii* (tanto el adulto como la larva), *Chaetocnema denticulata*, la larva de *Delia platura*, *Agriotes*

mancus, *Phyllophaga* sp. y la larva de *Diabrotica longicornis*. Cuando el escarabajo migra, puede ser acarreado desde distancias considerables a través de corrientes de aire y transmitir a la bacteria (OEPP/EPPO, 2006).

El principal hospedero es el maíz dulce (*Zea mays* var. *saccharata*) el más susceptible, pero también el dentado (*Z. mays* var. *indentata*) que usualmente es más resistente, el maíz para harina y cultivares de maíz palomero (*Z. mays* var. *everta*), sorgo y mijo (Margaret et al, 2004). *P. stewartii* ha sido inoculada artificialmente en *Coix lachrymajobi*, *Setariapumila* y *Zea perennis* causando daños a la planta (OEPP/EPPO, 2006, Stack et al., 2002, Merighi M., 2003).

La bacteria también ataca otras poáceas cultivadas para forraje en Norteamérica como *Tripsicum dactiloides* y teocinte (*Zea mexicana*). Se han reportado notables excepciones de brotes esporádicos en maíz dulce reportados en Italia, Austria y México (Valle de Toluca, Oaxaca, Tabasco, Tlaxcala y Veracruz). En estos países se desconoce cómo se dispersa la enfermedad a través de un foco inicial y el subsecuente establecimiento, pero en los países donde si se presenta, muestran quizá la potencial capacidad de *P. stewartii* para adaptarse a combinaciones del vector o a la presencia de hospedero secundarios (Stack et al, 2002).

Los síntomas de la hoja rayada pueden ser confundidos con deficiencias nutricionales o sequía. Se reportó también la presencia de *Pantoea ananatis* como causante de la mancha blanca, clorosis y necrosis con pérdidas en los cultivos (Pérez-y-Terrón et al, 2009).

Patogenicidad

Existen dos grupos de genes que juegan un papel importante en la patogenicidad y virulencia de las bacterias que infectan al maíz. En el presente capítulo se hace referencia al género *Pantoea*. Uno es el de *cps*, que comprende 12 genes y que es requerido para la producción del exopolisacárido (EPS) “sterwatan”, el otro es el grupo de *hrp*, que codifica para un sistema de secreción tipo III, necesario para la patogenicidad general y la producción de las lesiones de las hojas (Cha et al, 1998).

El cluster *cps*, específicamente los de la región de *cpsD* y *cpsE* codifica para la síntesis de proteínas responsables del ensamblaje y secreción de unidades repetidas, así como su

polimerización dentro de una macromolécula de exopolisacárido (EPS) conocido como sterwatan. Este EPS bloquea el flujo libre del agua, conduciendo a la condición de marchitez. Se ha propuesto que el EPS puede funcionar para prolongar los síntomas de Wts (síntoma de empapamiento por agua) y potenciar el desarrollo bacteriano para contener el agua y los nutrientes en los espacios intercelulares (Coplin et al, 1992).

El sterwatan consiste de una unidad de aproximadamente 45MDa, con siete monosacáridos repetidos que contienen glucosa, galactosa y ácido glucurónico en una proporción 4:2:1, proporciona una barrera de protección contra los factores de defensa de la planta hospedera y contribuye parcialmente, a la inducción de los síntomas tempranos de la enfermedad (Coplin et al, 1992; Labate et al, 2007; Merigui et al, 2006).

La producción de EPS está controlada por un mecanismo de quorum sensing y es regulado por la proteína EsaI producida por *esaI*, que es la señal sintasa de la homoserina lactona (HSL) y EsaR producida por *esaR*, que es el regulador transcripcional que gobierna al locus *cps* (Coplin et al, 1992; Wang and Leadbetter, 2005; González and Keshavan, 2006; Minogue et al, 2005).

Si se muta la secuencia de *esaI*, se bloquea la producción de 3-oxohexanoil-HSL y algunas otras acil-HSL detectables; esta deficiencia suprime la producción de EPS y elimina la capacidad de *P. stewartii* de producir la enfermedad de Stewart en la planta hospedera. En tanto, cuando se da una mutación en *esaR* produce altos niveles de EPS, independientemente de la densidad celular y aún en ausencia de la señal HSL. EsaR reprime la síntesis de EPS a baja densidad celular (Von Bodman and Farrand, 1995; Von Bodman et al, 1998).

Para que el gen deje de reprimirse requiere cantidades micromolares de HSL produciendo constitutivamente el EPS, pero las cepas son menos virulentas que las de tipo silvestre. Se sugiere que el mecanismo de quorum sensing puede demorar la expresión de EPS durante los estados tempranos de la infección, haciendo que esta no interfiera con otros mecanismos de patogénesis (Von Bodman et al, 1998, Minogue et al, 2005).

El EPS es requerido para la formación de la biocapa y el rápido movimiento sistémico en la planta, las cepas deficientes en EPS crecen y se dispersan más lentamente en los tejidos

vasculares del hospedero, son menos parecidas a las cepas tipo para colonizar las plantas sistémicamente y son incapaces de causar marchitez en plantas infectadas (Merighi M., 2003).

La síntesis de la cápsula es constitutiva pero la producción de limo adicional está inducida por la disponibilidad de azúcares libres en el medio de desarrollo. En suma todo esto está involucrado en la virulencia, el EPS posiblemente realiza un mecanismo para la protección de fitoaglutininas en los conductos y la colonización del insecto vector. La mayoría de estos genes que la producen están conservados en *E. amylovora* y *E. coli* basados sobre la secuencia de homología y pruebas de complementación interespecíficas, excepto para algunos genes glucosiltransferasa que pueden considerarse diferentes en la estructura de los dos polisacáridos (Merighi M, 2003).

Los genes *ams* clonados de *E. amylovora* complementaron la mayoría de las mutantes *cps* de *P. stewartii* para la producción de limo y la virulencia en semilleros de maíz, pero el arreglo de los genes en los dos clusters se mostró ligeramente diferente (Merighi M., 2003, Sharples et al, 1990).

Los genes *hrp* son prescindibles para el desarrollo en medio mínimo, pero esenciales para la patogenicidad en hospederos susceptibles y para provocar respuesta hipersensible (HR) en hospederos incompatibles y no hospederos. La HR es una defensa rápida y localizada de la planta que involucra muerte celular programada, producción de oxígeno activo y síntesis de compuestos fenólicos y antimicrobianos alrededor del sitio de infección. Durante infecciones naturales, la reacción usualmente no es visible debido a que están involucradas pocas células hospederas y bacterianas, pero bajo condiciones experimentales con inóculos altos (>10⁷/ml), se causará un colapso celular masivo y una necrosis confluyente que se verá a simple vista. Esta reacción tiene el efecto neto de restringir la multiplicación del patógeno y el posterior progreso de la enfermedad (Merighi M, 2003; Merighi et al, 2001).

Las proteínas *hrp/hrc* secretadas por los sistemas TTS (Sistema de Secreción Tipo III), han sido nombradas Hops (por proteínas externas *Hrp*), en paralelo a la designación de las proteínas externas Yops de *Yersinia*. Al menos cuatro clases de Hops recorren el aparato de secreción: Harpins, pilinas *Hrp*, proteínas translocadoras y proteínas efectoras. Las tres

primeras están definidas colectivamente como proteínas ayudadoras por su presunto o demostrado papel en auxiliar la translocación/secreción de otros sustratos de los sistemas TTS (Frederick et al, 2001).

Las harpins son proteínas hidrofílicas, ricas en glicina, libres de cisteína y estables al calor, que son capaces de provocar una HR cuando son infiltradas a alta concentración dentro del apoplasto. Ellas viajan a través del aparato TTS pero son liberadas dentro de los espacios apoplásticos, más que ser inyectadas dentro de las células hospederas. Las harpins han sido descritas en *E. amylovora* (harpin Ea o HrpN y HrpW), en otras erwinias, en todos los patovares de *P. syringae* estudiados y en *R. solanacearum*, pero no existe similitud en la secuencia entre las proteínas HrpN, HrpW, HrpZ y PopA1 (Frederick et al, 2001; Merighi et al, 2006).

Cada bacteria fitopatógena responde de manera un tanto diferente a las señales externas y condiciones de desarrollo, como en las señales necesarias para inducir la expresión de los genes *hrp* en *P. stewartii*, *Pseudomonas syringae* o *Erwinia amylovora* (Merighi et al, 2001). La regulación de *hrpS* es llevada a cabo por reguladores tanto específicos como globales, por lo que puede ser “afinada” según las condiciones de cada nicho en el que se encuentre el patógeno (Merighi et al, 2001).

En la especie *Pantoea ananatis* se ha reportado la secuencia del genoma en de la cepa LMG20103 patógena de *Eucalyptus*. El genoma consiste de un cromosoma único con un tamaño de 4.69 millones de nucleótidos y un contenido de G+C de 53.69% y un total de 4,27 genes que codifican para proteínas. Se ha revelado la presencia de 433 genes que codifican para proteínas los cuales demostraron experimentalmente jugar un papel en la enfermedad (Maayer et al, 2010).

Se reportó también la ausencia de los sistemas de secreción tipos II y III, los cuales juegan un papel importante en la enfermedad tanto en bacterias patógenas de animales como de plantas; pero tres copias del sistema de secreción tipo IV, descrito recientemente como factor de patogenicidad y donde la putativa proteína efectora secretada vía estos sistemas de secreción, se adquiere a través de transferencia horizontal. Se identificaron algunos posibles determinantes de patogenicidad como el exopolisacárido anatan demostrándose

que juega un papel en la enfermedad de cebolla y piña (Maayer et al, 2010). La secuencia de la cepa de *P. ananatis* PA13 consta de 4.87 Mb tiene 55 pseudogenes, 7 operones rRNA y 83 tRNAs, así como un plásmido de 281,754 bp (Choi et al, 2012).

Reportamos con anterioridad la identificación mediante 16S rDNA de *P. ananatis* aislada de plantas de maíz con daño severo (Pérez-y-Terrón et al, 2009). Las muestras fueron obtenidas de hojas, tallo y suelo adherido a la raíz, de plantas de maíz de los Estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz en México, identificándose 32 cepas.

Por otro lado, hemos utilizado oligonucleótidos iniciadores CPSL1 / CPSR2c descritos por Coplin et al en 2002 amplificando al 50% de las cepas identificadas, mediante PCR al fragmento de 1100 bp descrito. Estos oligonucleótidos están dirigidos hacia los genes del cluster cps, específicamente los de la región de cpsD y cpsE que codifica para la síntesis de proteínas responsables del ensamblaje y secreción de unidades repetidas, así como su polimerización dentro de una macromolécula de exopolisacárido (EPS) conocido como sterwatan.

Identificación y pruebas de patogenicidad

La utilización de los oligonucleótidos HRP1d/ HRP3c designados para amplificar un fragmento de 900 bp del marco de lectura abierto del gen hrpS, nos reportó 37.5 % de las cepas con dicho fragmento, y algunas de las cuales también habían amplificado con los oligonucleótidos para cps. El gen hrpS, utilizando los primer hrp1d y hrp2c, son internos al marco de lectura abierto para hrpS. El producto obtenido de esta amplificación fue de 900 bp, codifica para un potenciador transcripcional similar a NtrC que es requerido para la expresión de genes de secreción hrp (respuesta de hipersensibilidad y patogenicidad) y el efector wts (Coplin et al, 2002). Las cepas que presentaron el fragmento amplificado (55.5 %) dieron positiva la respuesta de hipersensibilidad en tabaco.

La utilización de los oligonucleótidos ES1G1/ ES1G2c y ES1G2c/ES16 amplifican mediante la PCR, fragmentos de 920 y 290 bp respectivamente en todas las cepas de *P. stewartii* (Coplin et al, 2002). En nuestros ensayos, (16.6 %), también nos muestran ambas

amplificaciones, pero (62.5%), sólo muestran la amplificación para el fragmento de 920 bp, esto resultaría inconsistente con el reporte de que las regiones cromosomales ITS que codifican para el rRNA varían considerablemente en especies relacionadas (Coplin et al, 2002). Sin embargo, también reportan que *P. ananatis* amplifica también el fragmento de 290 bp y otras bandas inespecíficas para ambos juegos de oligonucleótidos.

Al realizar la inoculación en plántulas de maíz de 17 días de crecimiento, para la determinación de patogenicidad se utilizaron cepas identificadas como *Pantoea*. Todas estas cepas fueron capaces de provocar un daño visible al ser inoculadas en plántulas a una dosis de 1×10^6 UFC en el desarrollo de las plantas de maíz. Se vio drásticamente reducido el tamaño de la raíz principal y el tamaño y cantidad de raíces secundarias, mostrando ausencia de éstas en algunas plantas. Los tallos fueron también reducidos en su tamaño así como las hojas, además de que algunas plantas carecían de ambos. Se pudo observar que las plantas con mayor deterioro, también presentaban mayor turbidez en el medio de cultivo, sugiriendo un aumento en la población bacteriana.

Al realizar estas pruebas con 5 de nuestras cepas identificadas como *P. ananatis* en plántulas de frijol *Phaseolus vulgaris* (réplicas de 5) obtuvimos resultados semejantes a los presentados en maíz, donde el total de las cepas provocó daño a las plántulas.

Conclusiones

La búsqueda de especies de *Pantoea* de suelo, tallos y hojas de plantas de maíz visualmente dañadas en cultivos de los Estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz de México nos permitió detectar la presencia de *Pantoea ananatis*.

El ensayo de patogenicidad con plántulas de maíz, mostró un daño severo con las cepas, aisladas de tres diferentes parcelas.

Se determinó e identificó una secuencia parcial putativa para el locus *cpsD* de *P. ananatis*.

Se amplificaron los genes para *hrpS*.

Este trabajo fue realizado en parte con recursos otorgados por Promep.

Bibliografía

- Cha, Ch., Gao, P., Chen, Y., Shaw, P.D. & Farrand, S. K. (1998). Production of acil-homoserine lactone quorum sensing signails by gram-negative plant-associated bacteria. *MPMI*. 11(11), 119-1129.
- Coplin, D.L., Majerzack, D.R., Zhang, Y. X., Kim, W.S., Jock, S., & Geider, K. (2002). Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Plant Disease* 86(3), 304 – 311.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2007). Perfiles de países de la FAO. [Documento en PDF]. Recuperado de <http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?lang=es>
- González J.E. & Keshavan N.D. (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiology and Molecular Biology*. 70(4), 859-875.
- Salvador R.J. (1997). Maize. The encyclopedia of México: History, Culture and Society.
- Secretaría de Economía (2012). Dirección general de industrias básicas maíz-tortilla: Situación actual y factores de competencia local Análisis de la Cadena de valor Secretaría de economía. [Documento en PDF]. Recuperado de http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/20120411_analisis_cadena_valor_maiz-tortilla.pdf
- Sharples, G. J., & Lloyd, R. G. (1990). A novel repeat DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 18, 6503-6508.
- Varón de Agudelo, F. & Sarra V. A. (2007). Enfermedades del maíz y su manejo. Colombia: Produmedios.
- Von Bodman, S. & Farrand S. K. (1995). Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-Acylhomoserine lactone autoinducer. *Journal of Bacteriology*. 177, 500-5008.