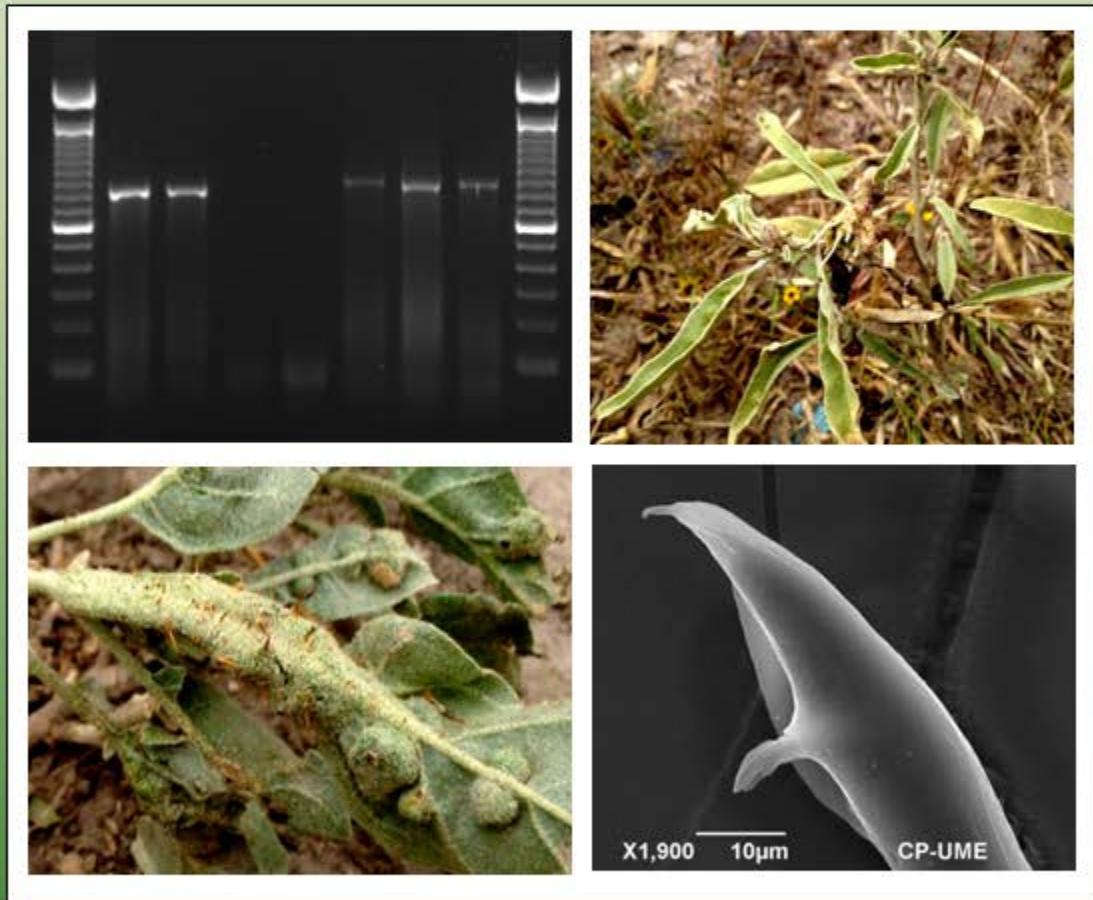


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual



Órgano Internacional de Difusión de la
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained *in vitro*

Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*

Sergio Ramírez-Rojas*, Felipe de Jesús Osuna-Canizalez, Faustino García-Pérez, Jaime Canul-Ku y Alejandro Palacios-Talavera Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. km 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana. C.P. 62780, Col Centro Zacatepec, Morelos, Tel. 734 3430230 ext. 108 y 139; **Jesús Hernández-Romano**, Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR). Blvd. Cuauhnahuac #566, C.P. 62550, Col. Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos, México; **Katya Ornelas-Ocampo** y **Patricia Landa-Salgado**, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, CP 56230 México. *Correspondencia: sergioinifap@yahoo.com.mx.

Recibido: 23 de Noviembre, 2016. **Aceptado:** 28 de Marzo, 2016.

Ramírez-Rojas S, Osuna-Canizalez FJ, García-Pérez F, Canul-Ku J, Palacios-Talavera A, Hernández-Romano J, Ornelas-Ocampo K y Landa-Salgado P. 2016. Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 173-183.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1511-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1511-3)

Primera Publicación DOI: 28 de Marzo, 2016.

First DOI published: March 28th, 2016.

Resumen. En plantas ornamentales reproducidas *in vitro* en viveros del Centro de Desarrollo Tecnológico Tezoyuca perteneciente al FIRA, se detectaron síntomas de necrosamiento en hojas y tallo durante la fase de adaptación. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los agentes asociados a éstas plantas. De tejido vegetal con síntomas de necrosamiento, se obtuvieron once aislamientos bacterianos, a los que se les extrajo el ADN con el paquete correspondiente para su secuenciación. Todos los productos de PCR se secuenciaron y se analizaron con el programa Chromas Lite®. Utilizando la búsqueda de homología por BLAST se identificaron las siguientes bacterias: *Kosakonia*

Abstract. In ornamental plants propagated *in vitro* at Tezoyuca Technology Development Center, belonging to FIRA, symptoms of necrosis on leaves and stems during the adaptation stage. The objective of this study was to isolate and to identify the agents related to these plants. Eleven bacterial isolates were obtained from necrotic leaves and stems, from which ADN was extracted using a commercial PCR kit. The PCR products were sequenced and analyzed using the Chromas Lite® program. We search for homology with BLAST after which the following bacteria were identified: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cypripedii*, *Pantoea agglomerans* y *Erwinia rhapontici*. The last three bacteria are plant disease in phase of acclimation in ornamental plants get *in vitro*.

Additional key words: Potted plant, Pathogens, Molecular identification, PCR.

oryzae, *Pectobacterium cyripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cyripedii*, *Pantoea agglomerans* y *Erwinia rhapontici*: son de importancia fitosanitaria en su fase de aclimatación *in vitro*.

Palabras clave: Plantas en contenedor, patógenos, identificación molecular, PCR.

Las plantas tienen la capacidad de reproducirse sexual o asexualmente, en el primer caso hay una mayor variabilidad en la progenie, mientras que en el segundo se obtiene descendencia genéticamente igual a la madre (Corona-Nava-Esparza y Chimal-Hernández, 2006). La técnica de propagación *in vitro* es una reproducción asexual, que explota la capacidad de cada célula vegetal para generar individuos genéticamente similares. La industria de plantas ornamentales ha empleado esta técnica para multiplicar plantas con un alto grado de uniformidad y sanidad (Rout *et al.*, 2006).

Sin embargo, las plantas obtenidas por esta técnica deben pasar por una etapa de aclimatación para salir a la plantación definitiva. En esta fase, a las plántulas obtenidas *in vitro* se les remueve el agar (medio artificial de crecimiento) y se colocan en charolas con sustrato estéril y clima controlado hasta que están listas para trasplantarse en macetas. Esta etapa es considerada crítica por la tensión a la que se someten las plantas, debido a la nueva condición, en la que ya no se les proporcionan nutrientes presentes en el medio de cultivo; la tensión generada hace que las plantas sean muy susceptibles a algunas enfermedades de tipo biótico, principalmente bacterias, hongos y esporádicamente virus.

Las bacterias son organismos microscópicos cosmopolitas que pueden habitar como saprofitos, epifitos, endófitos, simbioses, parásitos y patógenos de animales, plantas y seres humanos. Algunas

Plants have the capability of reproducing sexually or asexually. In the first case, there is a greater variability in the progeny, whereas in the second case, descendants are obtained genetically equal to the mother (Corona-Nava-Esparza and Chimal-Hernández, 2006). The *in vitro* propagation technique is an asexual form of reproduction that takes advantage of the capability of peach plant cell to generate genetically similar individuals. The ornamental plant industry has used this technique to multiply plants with a high degree of uniformity and safety (Rout *et al.*, 2006).

However, the plants obtained with this technique must undergo an acclimatization stage to come out to the definitive plantation. In this phase, plantlets obtained *in vitro* have their agar (artificial growth medium) removed and are placed in trays with a sterile substrate and a controlled climate, until they are ready to be transplanted to pots. This stage is considered critical, due to the tension plants undergo, because of the new condition, in which they are not given the nutrients present in the culture medium; the tension generated makes plants very vulnerable to some biotic diseases, mainly bacteria, fungi, and sporadically, viruses.

Bacteria are cosmopolitan microscopic organisms that can live as saprophytes, epiphytes, symbionts, parasites and pathogens of animals, plants, and humans. Some bacteria can behave as saprophytes, and under some conditions, may become opportunist pathogens (Madigan *et al.*, 1997).

Potted flower-producing plants are subject to bacterial diseases frequently caused by *Pectobacterium* spp., *Xanthomonas* spp., and *Pseudomonas* spp. (Daughtrey *et al.*, 2001). Each bacteria causes different symptoms in plants, which may include rotting, foliar spots, wilting, yellowing, canker, mainly (Agrios, 2005). To identify the pathogen it is necessary to carry out

bacterias pueden comportarse como saprofitas y bajo algunas condiciones convertirse en patógenas oportunistas (Madigan *et al.*, 1997).

Las plantas productoras de flores en maceta están sujetas a enfermedades bacterianas causadas frecuentemente por *Pectobacterium* spp., *Xanthomonas* spp., y *Pseudomonas* spp. (Daughtrey *et al.*, 2001). Cada bacteria causa diferentes síntomas en las plantas; que pueden ser pudriciones, manchas foliares, marchitez, amarillamiento y canchales, principalmente (Agrios, 2005). Para identificar el patógeno es necesario realizar un aislamiento puro a partir de micelio en el caso de hongos, y algunos exudados o flujo bacteriano en el caso de bacterias.

En el estado de Morelos, la producción de ornamentales se estima en 3000 ha con un valor estimado de la producción de 1.2 mdp por ha/año. Algunas de las especies más importantes son *Euphorbia pulcherrima*, *Bougainvillea glabra*, *Spathiphyllum uxpanapense*, *Rosa* spp., *Pteridium aquilinum*, *Cedrela odorata*, *Citrus limonum*, *Tulipa* spp., *Acanthocalycium* spp., *Thrinax radiata*, *Pelargonium zonale*, *Begonia x tuberhybrida*. En el estado los municipios productores más importantes son Cuautla, Jiutepec, Cuernavaca, Yautepec, Puente de Ixtla, Emiliano Zapata, Xochitepec, Jonacatepec, Temixco y Tlaquiltenango.

El Centro de Desarrollo Tecnológico Tezoyuca, perteneciente a la oficina regional del Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura (FIRA) en Morelos, se encarga de reproducir *Anthurium andreanum*, *Syngonium podophyllum*, *Spathiphyllum uxpanapense*, *Pteridium aquilinum*, mediante la técnica *in vitro*, las que son afectadas por enfermedades en esta fase y en la de aclimatación.

Para desarrollar un método de control de enfermedades, es necesario identificar al asociado al síntoma mediante una caracterización morfológica, bioquímica y/o molecular; siendo esta última la más importante por la precisión y rapidez con que

a pure isolation from mycelia in the case of fungi, and some exudates or bacterial discharge in the case of bacteria.

In the state of Morelos, the production of ornamental plants is calculated in 3 000 ha with an estimated production value of 1.2 million pesos per ha/year. Some of the most important species are *Euphorbia pulcherrima*, *Bougainvillea glabra*, *Spathiphyllum uxpanapense*, *Rosa* spp., *Pteridium aquilinum*, *Cedrela odorata*, *Citrus limonum*, *Tulipa* spp., *Acanthocalycium* spp., *Thrinax radiata*, *Pelargonium zonale*, *Begonia x tuberhybrida*. In the state, the municipal areas with the most important production are Cuautla, Jiutepec, Cuernavaca, Yautepec, Puente de Ixtla, Emiliano Zapata, Xochitepec, Jonacatepec, Temixco, and Tlaquiltenango.

The Tezoyuca Technology Development Center, which belongs to the regional *Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura* (FIRA) office in Morelos, is responsible for reproducing *Anthurium andreanum*, *Syngonium podophyllum*, *Spathiphyllum uxpanapense*, *Pteridium aquilinum* with the *in vitro* technique, which are affected by diseases in this phase and in the phase of acclimatization.

To develop a disease control method, it is necessary to identify the causal agent of the symptom by a morphological, biochemical and/or molecular characterization, the latter being the most important due to the accuracy and speed with which is it carried out. The main objective of this investigation was to identify bacteria related to the necrosis of leaves and stems in ornamental plants produced *in vitro* during the phase of adaptation by molecular methods.

In *Syngonium podophyllum*, *Philodendron* spp., *Orchidaceae* spp., *Pteridium aquilinum*, and *Spathiphyllum uxpanapense* plants reproduced *in vitro* in FIRA in the state of Morelos, with

se realiza. El objetivo principal de éste trabajo fue identificar bacterias asociadas a la necrosis de hojas y tallos en plantas ornamentales producidas *in vitro* durante la fase de adaptación por métodos moleculares.

En las plantas de *Syngonium podophyllum*, *Philodendron* spp., *Orchidaceae* spp., *Pteridium aquilinum* y *Spathiphyllum uxpanapense* reproducidas *in vitro* en el FIRA del estado de Morelos, con síntomas de necrosamiento durante la fase de aclimatación, se trasladaron en bolsas estériles de plástico al laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Zacatepec, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, donde se procesaron para realizar el diagnóstico de los agentes etiológicos de la enfermedad.

Aislamiento de cepas bacterianas de plantas ornamentales enfermas

De cada planta enferma, se tomó una muestra de 0.1 g de la base de tallos o de hojas con alguna mancha necrótica. Se lavaron con agua de la llave y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 2 % por 1 min y se enjuagaron con agua destilada por 2 min removiendo el agua excedente con papel absorbente estéril. Cada muestra se colocó en una caja Petri con agar papa dextrosa (PDA), las muestras así tratadas se incubaron a 25 °C por 48 h. Las bacterias crecidas en este medio se re-aislaron tomando masa bacteriana con un asa de siembra y se depositaron en cajas Petri con medio NBY con nistatina a 28 °C por 48 h. Los cultivos puros se guardaron en una solución de glicerol-agua destilada 80 %, a -80 °C.

Obtención de ADN bacteriano y amplificación con PCR

De las colonias bacterianas obtenidas de las

symptoms of blackening during the phase of acclimatization, were transported in sterile plastic bags to the Plant Pathology laboratory of the Zacatepec experimental field, which belongs to the National Forestry, Agricultural and Livestock Research Center, and where they were processed to carry out the diagnosis of the etiologic agents of the disease.

Isolation of bacterial strains from diseased ornamental plants

From every diseased plant, a 0.1 g sample was taken from the base of the stem or leaves with some necrotic spot. They were washed with tap water and disinfected with a 2 % sodium hypochlorite solution for 2 min, removing the excess water with sterile absorbent paper. Each sample was placed in a Petri dish with potato dextrose agar (PDA), and the samples treated in this way were incubated at 25 °C for 48 h. The bacteria grown in this medium were re-isolated, taking bacterial mass with an inoculating loop and placed in Petri dishes with an NBY medium with nystatin at 28 °C for 48 h. Pure cultures were kept in an 80 % glycerol-distilled water solution at -80 °C.

Obtaining bacterial DNA and amplification with PCR

Of the bacterial colonies obtained from the ornamental plants developed and isolated in a solid NBY-N medium for 48 h at ambient temperature (25-28 °C), a sample of bacterial mass was taken using the inoculating loop and moved into a 2 mL test tube with NBY liquid medium. The tubes were incubated while shaking for 12 h at ambient temperature. At the end of the incubation period, 1 mL of the suspension obtained was taken and centrifuged in Eppendorf tubes at 13 000 rpm for

plantas ornamentales desarrolladas crecidas y aisladas en medio sólido NBY-N por 48 h a temperatura ambiente (25-28 °C), se tomó una muestra de masa bacteriana con el asa de siembra y se transfirió a un tubo con 2 mL de medio líquido NBY. Los tubos se incubaron en agitación por 12 h a temperatura ambiente. Al término del período de incubación, se tomó 1 mL de la suspensión obtenida, la cual se centrifugó en tubos Eppendorf a 13 000 rpm durante 1 min. Posteriormente, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en agua destilada estéril para la extracción de ADN. La extracción se realizó con un paquete de PCR (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega®, Cat. A1120) siguiendo el protocolo del fabricante. La extracción e integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa a 1 %.

Los iniciadores de la reacción de PCR fueron rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') y fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') para la amplificación de un fragmento del gen 16S rDNA (Weisburg *et al.*, 1991), el DNA genómico se usó como templado. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne® PHC-3), en un volumen final de 25 µL, los cuales contenían buffer 1 X, 200 µM de dNTP's, 1,5 µM de MgCl₂, 0,4 µM de cada oligonucleótido, 1 U de enzima GoTaq (Promega, Cat. M8295) y 1 µg de DNA genómico. El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s y 72 °C 15 s, y un paso final de 72 °C por 5 min. El análisis de la PCR se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa a 1.2 % a 80 V por 35 min, utilizando 5 µL de cada muestra. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y observado en un transiluminador.

Secuenciación de las cepas bacterianas

Todas las reacciones de PCR dispuestas para se-

1 min. Later, the supernatant was poured out and the pellet was resuspended in sterile distilled water for DNA extraction. The extraction was carried out with a PCR (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega®, Cat. A1120) package, following the factory protocol. The DNA extraction and integrity was verified in a 1 % agarose gel.

The initiators of the PCR reaction were rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') y fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') for the amplification of a fragment of gene 16S rDNA (Weisburg *et al.*, 1991); the genomic DNA was used as a template. The reaction took place in a thermocycler (Techne® PHC-3), in a final volume of 25 µL, which contained buffer 1 X, 200 µM of dNTP's, 1,5 µM de MgCl₂, 0,4 µM of each oligonucleotide, 1 U of GoTaq enzyme (Promega, Cat. M8295) and 1 µg of genomic DNA. The PCR program consisted of an initial denaturation stage at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, and 72 °C 15 s, as well as a final step of 72 °C for 5 min. The analysis of PCR was carried out by electrophoresis in agarose gel at 1.2 % a 80 V for 35 min, using 5 µL of each sample. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and observed in a transilluminator.

Sequencing the bacterial strains

LI the PCR reactions for sequencing were treated with DNA Clean & Concentrator™-25 Kit by Zymo (Cat. D4033). Afterwards, The DNA was quantified in a nanodrop (Epoch, BioTek). The sequencing reaction consisted of 10 ng of DNA for every 100 pb, 1 µL of oligo (10 pmol), in a final volume of 16 µL. Sequencing was carried out in the UNAM Biotechnology Institute, using Perkin equipment (Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730), with the method Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el

cuenciación se trataron con DNA Clean & Concentrator™-25 Kit de Zymo (Cat. D4033). Posteriormente, se cuantificó el DNA en un nanodrop (Epoch, BioTek). La reacción de secuenciación consistió en 10 ng de DNA por cada 100 pb, 1 µL de oligo (10 pmol), en un volumen final de 16 µL. La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, con el equipo Perkin (Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730), mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite® y posteriormente, con BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). De los valores cuantitativos observados, sólo se consideraron los de mayor identidad (Cuadro 1).

De las plantas ornamentales muestreadas y con síntomas de necrosis en hojas y tallos, se obtuvieron 12 aislamientos bacterianos, la mayoría de los cuales se caracterizaron por tener color blanco o crema y solo una mostró pigmentos de color rojo. Después de secuenciarlas (Figura 1) se identificaron ocho especies: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cyprapedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cyprapedii*, *Pantoea agglomerans* y *Erwinia rhapontici* (Cuadro 1).

Las especies bacterianas identificadas fueron: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cyprapedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Erwinia rhapontici*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea agglomerans* y *Pectobacterium cyprapedii*. La mayoría de los géneros identificados excepto *Burkholderia*, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, que comprende varios géneros de bacterias patógenas importantes de humanos, animales y plantas (Hauben *et al.*, 1998; Young y Park, 2007).

programa Chromas Lite® y posteriormente, con BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Of the quantitative values observed, only those with the greatest identity were considered (Table 1).

Out of the ornamental plants sampled and with symptoms of necrosis on stems and leaves, 12 bacterial isolations were obtained, most of which were characterized by having a white or creamy color, and only one showed a red pigment. After sequencing them (Figure 1), eight species were identified: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cyprapedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cyprapedii*, *Pantoea agglomerans*, and *Erwinia rhapontici* (Table 1).

The bacterial species identified were: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cyprapedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Erwinia rhapontici*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea agglomerans*, and *Pectobacterium cyprapedii*. Most of the genera identified, except for *Burkholderia*, belong to the Enterobacteriaceae family, which comprises several genera of important pathogenic human, animal, and plant bacteria (Hauben *et al.*, 1998; Young and Park, 2007). On the other hand, *Burkholderia* belongs to the *Burkholderiaceae* family. This genus is known for its adaptability to diverse habitats such as freshwater sediments and plant, animal, and human tissues. It is also used to promote plant growth, the biocontrol of plant pathogens, phytoremediation, and xenobiotic degradation (Paganin *et al.*, 2011).

K. oryzae, synonymous with *Enterobacter guangdongense*, *Enterobacter oryzae* (UniProt Taxonomy, 2014), has also been reported as a bacteria that fixates nitrogen in roots of rice plants (Peng *et al.*, 2009), and so far it has not been reported

Cuadro 1. Resultados de la identificación molecular de las bacterias aisladas en plantas ornamentales producidas *in vitro* en fase de aclimatación.

Table 1. Results of the molecular identification of the bacteria isolated in ornamental plants produced *in vitro* in the phase of acclimatization.

Planta de la que se aisló	No. Accesoión	Descripción	Máxima identidad (%)
Singonio	KF479042.1	<i>Kosakonia oryzae</i> strain P-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
Orquídea	KF479042.1	<i>Kosakonia oryzae</i> , strain P-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
Cuna de moisés var. Maunaloa	FJ823047.1	<i>Pectobacterium cypripedii</i> strain gx-104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
Filodendro	JQ659926.1	<i>Burkholderia tropica</i> strain R8-139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Cuna de moisés	KF528829.1	<i>Serratia marcescens</i> strain JASM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
Cuna de moisés var. Chopan	JX215555.1	<i>Erwinia rhapontici</i> strain ARB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Cuna de moisés var. Chopan	JQ917111.1	<i>Pantoea dispersa</i> strain B-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Helecho Boston	JF430157.1	<i>Pectobacterium cypripedii</i> strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
Helecho Boston	HM582877.1	<i>Pantoea agglomerans</i> strain AR PSBH2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
Helecho Boston	JF430157.1	<i>Pectobacterium cypripedii</i> strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
Helecho Boston	JQ659926.1	<i>Burkholderia tropica</i> strain R8-139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100

Por otra parte, *Burkholderia* pertenece a la familia *Burkholderiaceae*. Este género es conocido por su adaptabilidad a diversos hábitats tales como sedimentos de agua fresca, tejidos de plantas, animales y seres humanos. También se usa para promover el crecimiento de plantas, biocontrol de patógenos de plantas, fitorremediación y degradación xenobiótica (Paganin *et al.*, 2011).

K. oryzae con sinónimos *Enterobacter guangdongense*, *Enterobacter oryzae* (UniProt Taxonomy, 2014), se ha reportado como una bacteria que fija nitrógeno en las raíces de arroz (Peng *et al.*, 2009), y por el momento no se tiene reportada como fitopatógena. En este mismo sentido, la bacteria *Burkholderia tropica*, también es considerada

as phytopathogenic. In this same sense, the bacteria *Burkholderia tropica* is also considered nitrogen fixating, with important agro-biotechnological applications such as antifungal activity for the biocontrol of phytopathogenic fungi of agricultural interest (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013).

P. cypripedii, the previous name for which was *Erwinia cypripedii* (UniProt Taxonomy, 2014), produces the disease called orchid brown rot (Plantwise, 2014); it is a bacteria that affects plants such as the papaya tree (*Carica papaya*) and different types of orchids, such as the lady slipper or Venus's slipper (*Paphiopedilum*), the orchid var. Luna (*Phalaenopsis amabilis*), and others (Plantwise, 2014). It causes dark brown foliar spots,

fijadora de nitrógeno, con importantes aplicaciones agro biotecnológicas como la actividad antifúngica para el biocontrol de hongos fitopatógenos de interés agrícola (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013).

P. cyripedii, cuyo nombre anterior era *Erwinia cyripedii* (UniProt Taxonomy, 2014), produce la enfermedad llamada podredumbre café de las orquídeas (Plantwise, 2014), es una bacteria que afecta plantas como el papayo (*Carica papaya*) y diferentes tipos de orquídeas, como la zapatilla de dama o sandalia de Venus (*Paphiopedilum*), y la orquídea var. Luna (*Phalaenopsis amabilis*) entre otras (Plantwise, 2014). En la que causa manchas foliares de color café oscuro, amarillamientos de hojas, decoloración de tallos, y la muerte de la planta. En el caso de las orquídeas, la enfermedad comienza a manifestarse en forma de pequeñas lesiones húmedas, de color café con aspecto grasiento y ligeramente hundidas (Plantwise, 2014).

También se identificaron dos géneros de *Pantoea*: *P. dispersa* y *P. agglomerans*. La primera tiene potencial para usarse como control biológico contra otras bacterias como *Xanthomonas albilineans*, la cual produce escaldadura foliar en caña de azúcar (Zhang y Birch, 1997); o contra algunos hongos como *Fusarium* o *Macrophomina*, cuando la bacteria se somete a los tratamientos adecuados (Gohel *et al.*, 2004), además actúa como bioestimuladora del crecimiento vegetal (Fernández *et al.*, 2008). Mientras que *P. agglomerans*, es más conocida por infectar a varios géneros de plantas como *Alocasia cucullata*, en la cual produce manchas necróticas sobre las hojas y sus márgenes. Las manchas aparecen inicialmente como lesiones irregulares que se agrandan para formar áreas necróticas (Romeiro *et al.*, 2006). En maíz y sorgo causa tizón en la hoja y síntomas de marchitez vascular (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007). En cápsulas de algodón infectadas, las fibras no maduran completamente y el tejido de la semilla muestra una colo-

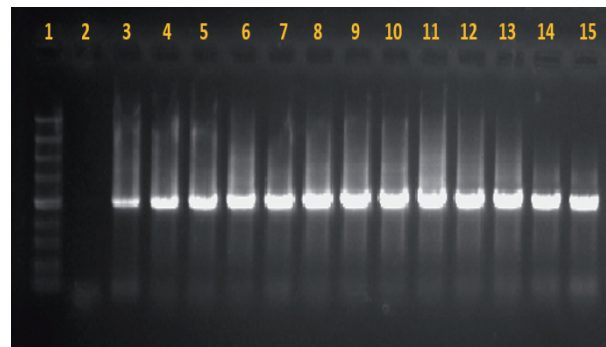


Figura 1. Fragmento amplificado de 1,500 pb del gen 16S con los oligos rP2 y fD1 con PCR. **1.** Marcador de peso molecular #SM1373 (Fermentas); **2.** Control negativo (reacción de PCR con agua destilada estéril); **3.** Control positivo (templado del genoma de *Clavibacter* sp.); **4.** *K. oryzae*; **5.** *K. oryzae*; **6.** *P. cyripedii*; **7.** *B. tropica*; **8.** *S. marcescens*; **9.** *E. rhapontici/Pantoea dispersa*; **10.** *P. dispersa*; **11.** *P. cyripedii*; **12.** *P. agglomerans/P. cyripedii*; **13.** *P. cyripedii*; **14.** *B. tropica*; **15.** *B. tropica*.

Figure 1. Amplifies fragment of 1,500 pb of the gene 16S with the oligos rP2 and with PCR. **1.** Molecular weight marker #SM1373 (Fermentas); **2.** Negative control (reaction of PCR with sterile distilled water); **3.** Positive control (genomic DNA from *Clavibacter* sp.); **4.** *K. oryzae*; **5.** *K. oryzae*; **6.** *P. cyripedii*; **7.** *B. tropica*; **8.** *S. marcescens*; **9.** *E. rhapontici/Pantoea dispersa*; **10.** *P. dispersa*; **11.** *P. cyripedii*; **12.** *P. agglomerans/P. cyripedii*; **13.** *P. cyripedii*; **14.** *B. tropica*; **15.** *B. tropica*.

the yellowing of leaves, the bleaching of stems, and the death of the plant. In the case of orchids, the disease begins presenting itself as small moist, greasy-looking, brown, and slightly sunken lesions (Plantwise, 2014).

Two genres of *Pantoea* were also identified: *P. dispersa* and *P. agglomerans*. The former has the potential to be used as a biological control against other bacteria such as *Xanthomonas albilineans*, which produces foliar scalding in sugar cane (Zhang and Birch, 1997) or against some fungi such as *Fusarium* or *Macrophomina*, when the bacteria is placed under the proper treatments (Gohel *et al.*, 2004); it also acts as a biostimulant of plant growth (Fernández *et al.*, 2008). *P. agglomerans*, on the other hand, is better known for infecting several

ración marrón (Ren *et al.*, 2008). En arroz causa tizón foliar y pudrición del tallo (Lee *et al.* 2010). En el nogal (*Carya* o *Juglans*) provoca la caída prematura del fruto (Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, las dos bacterias pueden comportarse como patógenas de humanos (Cruz *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2003; Holden *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2007).

En este mismo contexto, *Serratia marcescens*, otra bacteria identificada en el presente trabajo, se caracteriza por su pigmentación de color rojo debido a la prodigiosina, un pigmento de color rojo brillante que producen ciertas cepas de *Serratia* (Gerber, 1975). Anteriormente, se consideraba solo como un patógeno oportunista que causa enfermedades en los seres humanos, como cistitis (Liu *et al.*, 2004), conjuntivitis (Hume y Willox, 2004), queratitis (Schaefer *et al.*, 2001), meningitis (Zaidi *et al.*, 1989) y neumonía (Carlson *et al.*, 1977; Khan *et al.*, 1997), entre otras. Sin embargo, recientemente algunos informes muestran que esta bacteria puede provocar la enfermedad de la vid amarilla en cucurbitáceas, donde coloniza el floema de las plantas y les produce un aspecto amarillento y marchitamiento del follaje (Wick *et al.*, 2001; Bruton *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2012).

Finalmente, aunque no se observó una diferenciación al 100 % de confiabilidad, de acuerdo a la identificación molecular entre *Erwinia rhapontici* y *Pantoea dispersa*, se considera que es necesario completar más pruebas para su correcta identificación. Debido a que mientras *P. dispersa* no se considera un fitopatógeno, *E. rhapontici* si lo es, ya que causa la coloración rosa en la cubierta de algunas semillas (Schroeder *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003a; Wise *et al.*, 2008) así como la pudrición de la corona en otras plantas (Huang *et al.*, 2003b).

CONCLUSIONES

Se detectaron ocho bacterias asociadas a plantas ornamentales enfermas en fase de aclimatación

plant genres such as *Alocasia cucullata*, in which it produces necrotic spots on leaves and their edges. The spots appear initially as irregular lesions that grow to form necrotic areas (Romeiro *et al.*, 2006). In maize and sorghum, it causes smut and symptoms of vascular wilting (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007). In infected cotton capsules, fibers do not mature completely and the seed tissue shows a brown coloring (Ren *et al.*, 2008). In rice, it causes leaf smut and stem rotting (Lee *et al.* 2010). In walnut trees (*Carya* or *Juglans*), it causes the premature falling of the fruit (Yang *et al.*, 2011). However, the bacteria can behave as pathogens for humans (Cruz *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2003; Holden *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2007).

In this same context, *Serratia marcescens*, another bacteria identified in this study, presents a characteristically red color due to prodigiosin, a bright red pigment produced by certain strains of *Serratia* (Gerber, 1975). It used to be considered an opportunist pathogen that causes diseases in humans, such as cystitis (Liu *et al.*, 2004), conjunctivitis (Hume and Willox, 2004), keratitis (Schaefer *et al.*, 2001), meningitis (Zaidi *et al.*, 1989), pneumonia (Carlson *et al.*, 1977; Khan *et al.*, 1997), and others. However, some reports show that this bacterium can cause yellow vine disease in cucurbits, in which it colonizes the phloem of plants, producing a yellow color and wilting of leaves (Wick *et al.*, 2001; Bruton *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2012).

Finally, although no differences were observed with 100 % reliability, according to the molecular identification between *Erwinia rhapontici* and *Pantoea dispersa*, further tests are considered necessary for its correct identification. Because *P. dispersa* is not considered a phytopathogen, *E. rhapontici* is, since it produces a pink color in the coating of some seeds (Schroeder *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003a; Wise *et al.*, 2008), as well as the rotting of the corona in other plants (Huang *et al.*, 2003b).

in vitro: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cypripedii*, *Pantoea agglomerans* y *Erwinia rhapontici*. Las tres últimas representan un riesgo fitosanitario.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth ed. Elsevier Aca. Press. 948 p.
- Bruton, B. D., F. Mitchell, J. Fletcher, S. D. Pair, A. Wayadande, U. Melcher, J. Brady, B. Bextine, and T. W. Popham. 2003. *Serratia marcescens*, a phloem-colonizing, squash bug-transmitted bacterium: Causal agent of cucurbit yellow vine disease. Plant Dis. 87:937-944. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2003.87.8.937>
- Carlson, G. C., P. T. Dickinson P. L. Goldiner, A. D. Turnbull, and W. S. Howland. 1977. *Serratia marcescens* pneumonia. Arch. Surgery 112:1220-1224. <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.1977.01370100074015>
- Corona Nava-Esparza, V. y A. Chimal-Hernández. 2006. Plantas mexicanas con potencial ornamental. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), división de ciencias biológicas y de la salud. No. 60. 626 p.
- Cruz, A. T., A. C. Cazacu, and C. H. Allen. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. J Clin. Microbiol. 45:1989-1992. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00632-07>
- Daughtrey, M. L., R. L. Wick, and J. L. Peterson. 2001. Plagas y enfermedades de las plantas en maceta con flores. The American Phytopathol. Soc. 90 p.
- Fernández, A. I., M. Villaverde, J. A. Nicolás, A. García-Gómez, and J. Malo. 2008. *Pantoea dispersa*. Rhizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR). In VII Congreso SEAE Bullas (Murcia). http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/9%20P.%20FER/16%20FER%20Pantoea.pdf
- Gerber, N. N. 1975. Prodigiosin-like pigments. CRC critical reviews in microbiology, 3: 469-485.
- Gohel, V., C. Megha, P. Vyas and H. S. Chatpar. 2004. Strain improvement of chitinolytic enzyme producing isolate *Pantoea dispersa* for enhancing its biocontrol potential against fungal plant pathogens. Ann Microbiol 54:503-515.
- Hauben, L., E. R. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Syst. and Appl. Microbiol. 21:384-97. [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(98\)80048-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(98)80048-9)
- Holden, N., L. Pritchard, and I. Toth. 2009. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. FEMS Microbiol Rev 33: 689-703. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00153.x>

CONCLUSIONS

Eight bacteria were found to be related to diseased ornamental plants in the phase of *in vitro* acclimatization: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cypripedii*, *Pantoea agglomerans*, and *Erwinia rhapontici*. The three latter represent a phytosanitary hazard.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Huang, H. C., R. S. Erickson, L. J. Yanke, T. F. Hsieh, and R. A. A. Morrall. 2003a. First report of pink seed of lentil and chickpea caused by *Erwinia rhapontici* in Canada. Plant Dis. 87:1398. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2003.87.11.1398a>
- Huang, H. C., T. F. Hsieh, and R. S. Erickson. 2003b. Biology and epidemiology of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed and crown rot of plants. Plant Pathol Bull. 12:69-76. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2002.86.8.921c>
- Hume, E., and M. Willox. 2004. Aparición de *Serratia marcescens* como un patógeno de superficie ocular. Arch. Soci. Española de Oftalmol. [online]. 2004, vol.79, n.10 [citado 2014-03-24], pp. 475-481. <http://dx.doi.org/10.4321/s0365-66912004001000002>
- Khan, E. A., L. S. Wafelman, J. A. Garcia-Prats, and L. H. Taber. 1997. *Serratia marcescens* pneumonia, empyema and pneumatocele in a preterm neonate. The Pediatr Infect. Dis. J. 16:1003-1005. <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-199710000-00021>
- Lee, H. B., J. P. Hong, and S. B. Kim. 2010. First report of leaf blight caused by *Pantoea agglomerans* on rice in Korea. Plant Dis. 94:1372. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-05-10-0374>
- Liu, J. W., Y. M. Hsu, and Y. F. Huang. 2004. Independent prognostic factors for fatality in patients with urinary tract infection caused by *Serratia marcescens*. Infect. Control and Hospital Epidemiol 25:80-82. <http://dx.doi.org/10.1086/502297>
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 1997. Biología de los Microorganismos. 8a ed. Prentice Hall. Madrid, España. 1064 p. [http://dx.doi.org/10.1016/s0962-8924\(97\)83479-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0962-8924(97)83479-4)
- Morales-Valenzuela, G., H.V. Silva-Rojas, D. Ochoa-Martínez, E. Valadez-Moctezuma, B. Alarcón-Zúñiga, L. X. Zelaya-Molina, L. Córdova-Téllez, L. Mendoza-Onofre, H. Vaquera-Huerta, A. Carballo-Carballo, A. Farfán-Gómez, and G. Ávila-Quezada. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. Plant Dis. 91:1365. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-91-10-1365a>
- Paganin, P., S. Tabacchioni, and L. Chiarini. 2011. Pathogenici-

- ty and biotechnological applications of the genus *Burkholderia*. Central Europ. J. of Biol. 6:997-1005. <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-011-0072-2>
- Peng, G., W. Zhang, H. Luo, H. Xie, W. Lai, and Z. Tan. 2009. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. Internati. J. of Syst. and Evol. Microbiol. 59:1650-1655. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-59-10-2646-b>
- Plantwise, 2014. <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=21918>.
- Ren, Y. Z., Y. Q. Liu, S. L. Ding, G. Y. Li, and H. Zhang. 2008. First report of boll rot of cotton caused by *Pantoea agglomerans* in China. Plant Dis. 92:1364. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-92-9-1364b>
- Romeiro, R. S., D. Macagnan, H. L. Mendonça, and N. J. Rodrigues. 2006. Bact. spot of Chinese taro (*Alocasia cucullata*) in Brazil induced by *Pantoea agglomerans*. New Dis. Rep. 14:51. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01631.x>
- Rout, G. R., A. Mohapatra, and S. M. Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnol. Adv. 24:531-560. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.05.001>
- Schaefer, F., O. Bruttin, L. Zografos, and Y. Guex-Crosier. 2001. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. Brit. J. Ophthalmol. 85:842-847. <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.85.7.842>
- Schmid, H., S. Schubert, C. Weber, and J. R. Bogner. 2003. Isolation of a *Pantoea dispersa*-like strain from a 71-year-old woman with acute myeloid leukemia and multiple myeloma Infection 31: 66-67. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-002-3024-y>
- Schroeder, B. K., S. L. Lupien, and F. M. Dugan. 2002. First report of pink seed of pea caused by *Erwinia rhapontici* in the United States. Plant Dis. 86:188. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2002.86.2.188a>
- Sikora, E. J., B. D. Bruton, A. C. Wayadande, and J. Fletcher. 2012. First Report of the yellow vine disease caused by *Serratia marcescens* in watermelon and yellow squash in Alabama. Plant Dis. 96:761. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-09-11-0739-pdn>
- Tenorio-Salgado, S., R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, J. Caballero-Mellado, and E. Pérez-Rueda. 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. Bioengineered 4:236-243. <http://dx.doi.org/10.4161/bioe.23808>
- UniProt Taxonomy. 2014. Disponible en línea: <http://www.uniprot.org/taxonomy>
- Wick R. L., J. Lerner, S. D. Pair, J. Fletcher, F. Mitchell, and B.D. Bruton. 2001. Detection of cucurbit yellow vine disease in squash and pumpkin in Massachusetts. Plant Dis. 85:1031. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2001.85.9.1031c>
- Wise, K. A., Y. F. Zhao, C. A. and Bradley. 2008. First Report of Pink Seed of Pea Caused by *Erwinia rhapontici* in North Dakota. Plant Dis. 92:315. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-92-2-0315a>
- Yang, K. Q., W. W. Qu, X. Liu, H. X. Liu, and L. Q. Hou. 2011. First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. Plant Dis. 95:773. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-01-11-0060>
- Young, J. M., and D. C. Park. 2007. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial atpD, carA, and recA as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. Syst. and Appl. Microbiol. 30:343-354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2007.03.002>
- Zaidi, M., J. Sifuentes, M. Bobadilla, D. Moncada, and D. L. S. Ponce. 1989. Epidemic of *Serratia marcescens* bacteremia and meningitis in a neonatal unit in Mexico City. P. 14-20 In: Infection control and hospital epidemiology: The official J. of the Soc. of Hosp. Epidemiol. of America. <http://dx.doi.org/10.1086/645909>
- Zhang, L., and R. G. Birch. 1997. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. J. of Appl. Microbiol. 82:448-54. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00135.x>