

Identificación de bacterias asociadas a síntomas en follaje de ajo en dos localidades de Guanajuato

Martha Juana Navarro-León¹
Juan Carlos Raya-Pérez¹
Cesar Leobardo Aguirre-Mancilla¹
Jorge Covarrubias-Prieto¹
Luis Pérez-Moreno²
Juan Gabriel Ramírez-Pimentel^{1,§}

1 Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Roque. Carretera Celaya-Juventino Rosas km 8, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38110. Tel. 461 6115903. (martis-navarro@hotmail.com; cesar.am@roque.tecnm.mx; jorge.cp@roque.tecnm.mx).

2 Universidad de Guanajuato-División de Ciencias de la Vida-Campus Irapuato-Salamanca. Carretera Irapuato-Silao km 9, Ex Hacienda el Copal, Irapuato, Guanajuato, México. CP. 36500. luispm@uGuanajuatomx).

Autor para correspondencia: juan.rp1@roque.tecnm.mx.

Resumen

Las bacterias patógenas son responsables de grandes afectaciones en los principales cultivos, causan desde daños moderados hasta pérdida total. En plantas de ajo cultivadas durante el ciclo otoño-invierno 2016-2017 en dos localidades, Celaya e Irapuato (estado de Guanajuato, México), se detectaron síntomas de estrías amarillas en el margen de la hoja desde los dos meses después de la siembra. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los agentes causales asociados a estos síntomas. A partir de 62 muestras de follaje con manifestaciones características de la enfermedad en tres materiales de ajo, se obtuvieron 74 aislados bacterianos puros y se seleccionaron los 13 más representativos, según su morfología colonial, que fueron identificados molecularmente por amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S. Para la localidad de Celaya se identificaron las especies *Pantoea agglomerans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Erwinia persicina*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus mojavensis* y para Irapuato *Bacillus aryabattai*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *Erwinia persicina*. Estas bacterias resultaron ser de importancia fitosanitaria en la fase de desarrollo vegetativo y formación de bulbo, pues se lograron recuperar a partir de tejido dañado obtenido de plantas previamente inoculadas. Hasta donde se sabe, este es el primer reporte de la presencia de dichas bacterias relacionadas con los síntomas descritos en cultivos de ajo y con el deterioro de los bulbos durante su almacenamiento poscosecha.

Palabras clave:

Allium sativum L., bacteriosis en aj, identificación molecular, patogenicidad.



Introducción

Actualmente, aproximadamente el 90% de las plantas cultivadas a nivel mundial son propagadas por medio de semillas, las semillas se consideran la fuente más importante para la propagación de patógenos, lo que favorece infecciones primarias tempranas (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

La presencia de bacterias fitopatógenas en los cultivos y sus enfermedades asociadas reducen significativamente el rendimiento, con un gran impacto económico. Las infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y otros patógenos alteran los procesos fisiológicos de la planta incluyendo la absorción de agua y de nutrientes minerales por el sistema radical. Esto provocó las necrosis radicales causadas por oomicetos *Phytophthora* spp., algunas especies de *Fusarium* y los nemátodos *Pratylenchus* spp., la translocación del agua en el xilema y nutrientes absorbidos por raíces sanas; distorsiona la actividad meristemática por el desarrollo de chancros en troncos y ramas, promueve tumores y nodulaciones radicales (por ejemplo, antracnosis, manchas necróticas, mildius, oídios y royas) que distorsionan la absorción de radiación reduciendo la eficiencia fotosintética y la redistribución de los asimilados (ej., carbonos, fitoplasmosis, mildius, oídios, royas y virus) (Jiménez, 2017).

En la mayoría de los reportes no se hace referencia a las enfermedades causadas por bacterias, debido a que anteriormente no era común encontrarlas afectando los cultivos hortofrutícolas. No obstante, el cambio climático, representado por alteraciones en la humedad del suelo, lluvia, ha desencadenado un aumento en las poblaciones de insectos que son vectores de virus y bacterias, además de incrementar la capacidad patogénica de microorganismos que no estaban reportados (Hawkes *et al.*, 2017).

El ajo es una de las hortalizas con mayor producción mundial (FAO, 2018), su reproducción se da por selección de los bulbos con buena sanidad en campo y se utiliza un sistema de propagación vegetativa que ha causado la acumulación de virus, bacterias, nematodos y hongos en las plantas (O'Neill *et al.*, 2018).

La interacción planta-patógeno es además influenciada por componentes ambientales, incluyendo elementos abióticos del suelo, agua y aire, la microbiota del suelo, de las superficies y tejidos vegetales, así como los insectos que contribuyen a la dispersión y transmisión de los patógenos (Jiménez, 2017).

El ajo es susceptible al ataque de patógenos que causan enfermedades tanto en el follaje como en los bulbos. Las enfermedades más frecuentes en ajo son: mancha púrpura (*Alternaria porri* Ellis), podredumbre blanca (*Stromatinia cepivora* Berk.), mildiu (*Peronospora destructor* Berk.), moho gris (*Botrytis* spp.), tizón sureño (*Sclerotium rolfsii*), roya (*Puccinia alli* P.), virosis y una podredumbre blanda (bacteriosis), muy común en otros vegetales, distribuida en regiones cálidas y templadas donde se cultiva ajo y cebolla (Navarro-León *et al.*, 2019).

A la fecha no existe en México semilla comercial certificada de ajo, los productores la seleccionan a partir de su cosecha cada ciclo de producción, con un alto riesgo de reciclar microorganismos patógenos no visibles, que se transmiten por el bulbillo-semilla. El objetivo de esta investigación fue identificar bacterias patógenas asociadas a las estrías formadas en uno o en ambos bordes de la hoja y a la necrosis en punta en plantas de ajo durante la fase de desarrollo vegetativo, aplicando métodos morfológicos y moleculares.

Materiales y métodos

Material genético de ajo

Se evaluaron tres materiales de ajo de la variedad Taiwán: LPM, Tacátzcuaro Sta. Anita e Incrementos ICA.

Localización de los experimentos y ciclos de cultivo

La siembra del material biológico se realizó en dos localidades: el campo experimental del Tecnológico Nacional de México, *Campus* Roque en Celaya, Guanajuato, México (ITR), el 29 de septiembre de 2016 y en el Campo Agrícola Experimental de la División de Ciencias de la Vida del *Campus* Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato en Irapuato, Guanajuato, México (DICIVA-CIS-UG), el 26 de septiembre de 2016.

El ITR está ubicado a 20° 31' 44" de latitud norte y 100° 48' 54" de longitud oeste, altitud de 1 767 m y suelos de tipo arcillo-limoso y arcillo-arenoso, de alta permeabilidad, su clima oscila entre semiseco y semicálido, con una precipitación pluvial promedio de 575.3 mm anuales (Inafed, 2017a). La DICIVA-CIS-UG está ubicada en longitud 101° 34' 09" longitud oeste, latitud 20° 51' 18" latitud norte, altitud 1 730 m con tipo de suelo de tipo arcilloso, su clima es semicálido subhúmedo, con una precipitación de 800 mm anuales (Inafed, 2017b).

Fechas de evaluación y colectas

La toma de muestras para la detección de bacterias se realizó por muestreo de follaje de ajo a los 135 días después de la siembra (dds) en las localidades de Irapuato (31 muestras) y de Celaya (31 muestras), para un total de 62. Se obtuvo una muestra de una hoja en 10 plantas representativas para cada síntoma presuntivo de bacteriosis: 1) necrosis en punta de follaje, 2) rayado unilateral, R1 y 3) rayado en ambos lados de la hoja, R2, así como la muestra de una planta aparentemente sana (Testigo). Una vez registradas, se colocaron en bolsas de polietileno y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras

El procesamiento de muestras y diagnóstico e identificación de los agentes etiológicos de la enfermedad se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del ITR, Celaya, Guanajuato, México.

Cada muestra de follaje se lavó y se colocó sobre papel filtro estéril. Para las muestras que presentaban daño visible, se obtuvieron muestras con 50% de tejido sano y 50% enfermo de 0.5 a 1 cm, para los testigos, se tomaron muestras de diferentes partes de la hoja. A continuación, todas las muestras se trataron con hipoclorito de sodio al 1% durante 30 s, 1 min en agua destilada estéril, 1 min en etanol al 70% y 1 min en agua destilada estéril, se colocaron en caja Petri con agar papa dextrosa (PDA, difco) y se incubaron a 28 ± 2 °C durante 24-48 h. Posteriormente se realizó el aislamiento en medio de cultivo para obtener cada una de las cepas puras, de donde se describió la morfología colonial de las bacterias identificadas en Celaya e Irapuato, respectivamente. En muestras los testigos no presentaron desarrollo de patógenos a las 72 h de incubación.

Identificación molecular de bacterias

A partir de las cepas puras de las bacterias aisladas se procedió a realizar la extracción directa del DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega^{MR}, Cat. A1120), conforme al protocolo del fabricante. La concentración e integridad del DNA se verificó por espectrofotometría UV a 260 nm en un espectrofotómetro nanodrop 2000c (Thermo Scientific^{MR}) y electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Los iniciadores de la reacción de PCR fueron 16S (5' AGAGTTTGATCMTGGC 3') y A20 (5' CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 3') para la amplificación de un fragmento del gen 16S rDNA (Klindworth *et al.*, 2013). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler marca Life Technologies^{MR}), con temperatura de alineamiento de 56 °C. Los productos de amplificación por PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y fueron fotodocumentados en un Gel Doc^{MR} EZ Imager marca BIO-RAD.

Secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR

La secuenciación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio-CINVESTAV-IPN Irapuato), con el equipo Applied Biosystems^{MR} Modelo 3730, mediante el método Taq FS Dye terminator cycle sequencing fluorescence-based, con la técnica de Sanger y tecnología capilar.

Los electroferogramas y secuencias obtenidas se analizaron con el programa FinchTV v 1.4.0 (Geospiza Inc.), se realizó la edición eliminando las regiones extremas con ambigüedades en secuencia y se compararon las secuencias obtenidas en ambos sentidos de las cadenas complementarias; posteriormente, con la herramienta Blast (the basic local alignment search tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) se realizó el alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Una vez confirmadas, se publicaron las secuencias para registrarlas como aislados obtenidos en la presente investigación (Cuadro 1) en la base de datos del NCBI.

Cuadro 1. Identificación molecular de las bacterias aisladas en follaje de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) en Celaya e Irapuato, otoño-invierno 2016-2017.

Muestra	Localidad	Descripción	Núm. accesión	Clave de cepa
M1	Celaya	<i>Pantoea agglomerans</i>	MN699684	ITR01
M3	Celaya	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MN699685	ITR03
M4	Celaya	<i>Erwinia persicina</i>	MN699686	ITR04
M5	Celaya	<i>Erwinia persicina</i>	MN699687	ITR05
M6	Celaya	<i>Erwinia persicina</i>	MN699688	ITR06
M7	Celaya	<i>Bacillus megaterium</i>	MN699689	ITR07
M8	Irapuato	<i>Bacillus aryabhatai</i>	MN699690	ITR08
M9	Irapuato	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MN699691	ITR09
M10	Irapuato	<i>Bacillus megaterium</i>	MN699692	ITR10
M11	Irapuato	<i>Bacillus aryabhatai</i>	MN699693	ITR11
M12	Irapuato	<i>Erwinia persicina</i>	MN699694	ITR12
M13	Irapuato	<i>Bacillus megaterium</i>	MN699695	ITR13
M14	Celaya	<i>Bacillus mojavensis</i>	MN699696	ITR14

Pruebas de patogenicidad: diseño experimental

Para efectuar las pruebas de patogenicidad se utilizó el material LPM seleccionando bulbos con apariencia sana que se establecieron en condiciones de invernadero (temperatura de 12 a 14 ° C)(Khade *et al.*, 2017), se permitió su germinación y desarrollo hasta la etapa de cuatro hojas, se verificó que mantuvieran un estado saludable hasta antes de la inoculación con cepas puras de los aislados.

Como inóculo, se utilizaron suspensiones de 10 000 ufc ml⁻¹ correspondientes a dichos aislados. De cada suspensión bacteriana, se inocularon 100 µL, correspondientes a 1 000 ufc, aplicados con jeringa desechable a 2 cm por encima del cuello. Las cepas inoculadas se identificaron como 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, se incluyó además un testigo al que se inoculó agua destilada estéril. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar, con tres repeticiones.

Análisis estadístico

Los datos de patogenicidad fueron analizados por la prueba de chi cuadrada, con 11 grados de libertad, con la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

Donde: f_o = la frecuencia observada y f_e = la frecuencia esperada, para cada cepa inoculada.

Resultados y discusión

Morfología colonial en aislados de bacterias en Celaya e Irapuato

A partir de los diferentes síntomas (punta, R1 y R2) se obtuvieron un total de 45 cepas puras con morfología variable de la localidad de Celaya, y de éstas se seleccionaron siete cepas representativas para su identificación molecular. De igual forma, se aislaron 29 cepas puras con morfología diferente de la localidad Irapuato, y se seleccionaron seis cepas representativas para la identificación molecular (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 2. Resultados de morfología colonial e identificación molecular de las bacterias aisladas en follaje de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) con síntomas, producidas a campo abierto en Celaya, otoño-invierno 2016-2017.

(%) de plantas punta* con cepas aisladas	(%) de plantas R1 con cepas aisladas	(%) de plantas R2 con cepas aisladas	(%) de plantas con síntomas de cepas aisladas, total	Morfología colonial color, forma, diámetro (mm), elevación, aspecto, borde.	Especie identificada por PCR
15.55	13.33	13.33	42.22	Blanquecino, circular, 4.5-5, central, mucoide, entero.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
8.88	8.88	13.33	31.11	Blanca, circular, 1-1.5, central, cremosa, entero	<i>Erwinia persicina</i>
6.66	11.11	2.22	20	Blanco, circular, 3, central, mucoide, liso.	<i>Bacillus megaterium</i>
-	2.22	2.22	4.44	Amarillo fuerte, circular, 1.5, central ligera, cremoso brillante, liso	<i>Pantoea agglomerans</i>
-	2.22	-	2.22	Amarillo paja, irregular, 3, convexa, acuosa cerosa, ondulado	<i>Bacillus mojavensis</i>

* = síntoma en punta; R1= rayado de un lado; R2= rayado de dos lados en follaje de ajo.



Cuadro 3. Resultados de la morfología colonial e identificación molecular de las bacterias aisladas en tres síntomas diferentes de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) en Irapuato, otoño-invierno 2016-2017.

(%) de plantas punta con cepas aisladas	(%) de plantas R1 con cepas aisladas	(%) de plantas R2 con cepas aisladas	(%) de plantas síntomas con cepas aisladas, total	Morfología colonial color, forma, diámetro (mm), elevación, aspecto, borde	Especie identificada por PCR
6.9	13.79	13.79	34.48	Blanquecino, circular, 4.5-5, central, mucosoide, entero	<i>Bacillus amyloliquefa-ciens</i>
3.45	6.9	13.79	24.14	Amarillo paja, circular, 3-5, central, cremosa brillante, entero	<i>Bacillus aryabhatai</i>
10.34	6.9	6.9	24.14	Blanca, circular, 1-1.5, central, cremosa, entero	<i>Erwinia persicina</i>
10.34	6.9	-	17.24	Blanca, circular, 2-3, central, cremoso, entero	<i>Bacillus megaterium</i>

* = síntoma en punta; R1= rayado de un lado; R2= rayado de dos lados en follaje de ajo.

En el follaje aparentemente sano (asintomático) no se presentó crecimiento de cepas bacterianas luego 72 h de incubación. Como resultado de la identificación molecular, a cada secuencia ribosomal (16S) obtenida verificada se asignó un número de accesión en la base de datos del NCBI y quedó registrada para acceso libre (Cuadro 1).

A partir de las pruebas de patogenicidad efectuadas, se concluye que las cepas aisladas correlacionan con los síntomas identificados en las plantas sintomáticas, ya que el reaislamiento de las bacterias de tejido afectado permitió la recuperación del mismo microorganismo inoculado, con un valor de chi cuadrada de 1.33 (valor crítico= 3.05, $p \leq 0.01$). Las plantas muestreadas llegaron a la madurez y los bulbos recuperados de plantas inoculadas mostraron daño evidente y menor peso en relación al testigo.

En el ciclo otoño-invierno (O-I) 2015-2016 se observaron los primeros síntomas de enfermedad bacteriana en la localidad de Irapuato. Al no existir a nivel nacional registro de los daños causados en el ajo por los patógenos identificados, los resultados obtenidos en esta investigación evidencian, por primera vez, la causalidad de estas bacterias en la afectación del cultivo de ajo en México.

Para favorecer la brotación de la plántula de ajo sin efectos negativos sobre los rendimientos comerciales, se ha establecido una temperatura de 14 a 17 °C combinada con humedad relativa de 60% (Burba, 2009). En temperatura superiores, las catáfilas que cubren los bulbillos de ajo, cambian su color de moteado a rosado transparente en fresco y se presenta una necrosis, que oscurece el tejido y se desintegran casi por completo cuando la invasión es muy severa principalmente del género *Bacillus* y algunas fitopatógenas (Philip, 2017).

Debido a su alto contenido y disponibilidad de agua, la mayoría de las frutas y hortalizas despliegan valores de actividad de agua (Aw) superiores a 0.85 (Badui, 2012), que favorecen el rápido crecimiento de diversos microorganismos y la activación de distintas funciones metabólicas. Cuando no se tiene un buen control del agente causal durante el desarrollo del cultivo de ajo, se presenta una pudrición blanda generalizada en el bulbo de ajo, denominada 'putrefacción bacteriana'. Este proceso ha sido documentado previamente y se relaciona con el ataque de bacterias como agente causal de la enfermedad (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

Con respecto a las bacterias patógenas identificadas durante esta investigación, en las dos localidades de estudio, las especies bacterianas más frecuentes fueron: *Bacillus amyloliquefaciens* (76.7%), *B. megaterium* (37.24%) y *B. aryabhattai* (24.14%), *Erwinia persicina* (55.25%), *Pantoea agglomerans* (4.44%) (Cuadros 2 y 3). Se ha documentado que las bacterias son microorganismos especialmente frecuentes en hortalizas y verduras que crecen en contacto directo con el suelo, principalmente del género *Bacillus* y algunas fitopatógenas (Philip, 2017).

Las especies del género *Erwinia* y *Pantoea* se limitan a vivir sobre las superficies vegetales o a ejercer un papel secundario en diversas infecciones, además de las especies patógenas que producen pudriciones blandas, donde se destacan *E. carotovora* y *E. chrysanthemi* (ahora *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* y *P. chrysanthemi*), cuya importancia se incrementa por el amplio rango de hospedantes y su distribución mundial, así como por sus mecanismos de sobrevivencia y dispersión. (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

En bulbos se han aislado *Pectobacterium carotovorum*, *Burkholderia cepacia* y *Pantoea ananatis* (Navarrete-Maya *et al.*, 2014), lo cual coincide con el género *Pantoea* de una bacteria aislada de síntomas de rayado de un lado y de dos lados en follaje de ajo cultivado en la localidad de Celaya, Guanajuato.

El desarrollo de varias especies de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia* produce podredumbre húmeda bacteriana, ya que al sintetizar enzimas que actúan sobre la pectina existente en la lámina media de los tejidos de estos productos (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012). Algunas de las cepas aisladas durante la presente investigación pertenecen al género *Erwinia* y se asocian a síntomas de punta y de rayado de uno o de ambos lados, es el caso de *E. persicina* como agente causal de la podredumbre blanda del follaje tanto en Celaya como en Irapuato.

En España se ha incrementado el registro de nuevas bacterias que afectan a los principales cultivos leñosos y hortícolas y es debido a la introducción de material vegetal infectado, se ha reportado *Erwinia amylovora* con graves pérdidas económicas en numerosos países mediterráneos (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012). Esta bacteriosis también podría considerarse una amenaza para la agricultura en México. La presencia de *Erwinia persicina* en el cultivo de ajo en las localidades de Irapuato y Celaya correlacionan con esta aseveración. En muestras de follaje de ajo obtenidas en Celaya, se aislaron tanto cepas individuales como consorcios de dos cepas, en las muestras colectadas de follaje tales como: *Bacillus amyloliquefaciens* + *B. megaterium* 8.88% de las muestras con síntomas en punta y R1; *B. amyloliquefaciens* + *Erwinia persicina* 8.88% en síntomas de punta, R1 y R2; *E. persicina* + *B. megaterium* con 6.66% en síntomas de punta y R1; *B. amyloliquefaciens* + *Pantoea agglomerans* 2.22% en rayado de un lado (R1) y *Pantoea agglomerans* + *E. persicina* con 2.22%, en rayado de dos lados (R2).

La calidad de bulbos de ajo de Celaya fue aceptable debido a que se controló el problema mediante la aplicación de bactericidas químicos durante el desarrollo del cultivo (sulfato de gentamicina y clorhidrato de oxitetraciclina; kasugamisina y tetraciclina), mientras que en Irapuato se consideró pérdida total de la cosecha debido a manejo inadecuado y a la presencia de re-inóculo en suelo debido a la asignación del mismo lote de cultivo que el año anterior. Esto podría relacionarse con el caso de un patógeno reportado en el sureste de España; al determinar la posible transmisión de bacterias a través de semillas, se confirmó la presencia de *Erwinia aphidicola* en semillas de frijol, causando una disminución de más del 50% en la producción y además, se identificaron *Bacillus simplex*/*Bacillus muralis*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida* y *Paenibacillus polymyxa* (Marín *et al.*, 2011).

En 2013, algunos investigadores reportaron la presencia de *Erwinia persicina*, en Europa, asociada a síntomas de podredumbre blanda rosada en bulbos de ajo de tipo chino recolectados de Tembleque (Toledo, España), el 50% de los bulbos mostraban estos síntomas en al menos un diente y el color rosado a lo largo del bulbo. Mediante pruebas moleculares se identificó *E. persicina* como agente causal, siendo este el primer reporte en cultivo de ajo en Europa (Gálvez *et al.*, 2015).

Estos resultados coinciden con los encontrados en Celaya e Irapuato, ya que se aisló *Erwinia persicina* en síntomas de punta y rayado de uno y dos lados en follaje de ajo, al igual que coinciden

los síntomas en bulbos durante el almacenamiento y al momento de seleccionar la semilla para la siembra. Casos similares, los aislados de Celaya e Irapuato que se identificaron como *E. persicina* provocaron síntomas de punta, R1 y R2 en follaje de ajo.

B. amyloliquefaciens se ha considerado un agente de control biológico y fuente de antibióticos y otros metabolitos secundarios para el biocontrol de patógenos de plantas, puede inhibir el crecimiento de hongos patógenos como: *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans* y *Penicillium citrium* (Li *et al.*, 2016). Esta especie fue aislada como cepa única, en el follaje de algunas plantas de ajo de Irapuato, con síntomas en punta, R1 y R2 y también se aisló en Celaya, pero en combinación con otras cepas, por lo que no parece ser de lo más recomendable como agente de biocontrol en cultivos de ajo; sin embargo, es necesario seguir realizando pruebas para determinar su comportamiento tanto *in vitro* como en campo.

B. megaterium, es una especie con capacidad fitopatológica que ha sido aislada a partir de semillas, suelo y agua. Su presencia en follaje de ajo se asoció con síntomas de punta, R1 y R2 en la localidad de Celaya, así como con síntomas de punta y R1 en Irapuato. Recientemente se descubrió que la cepa A12 (BMA12) *B. megaterium* estimula el crecimiento de las plantas de tomate en condiciones salinas (Akram *et al.*, 2019).

A pesar de que algunas cepas de *Bacillus aryabhatai* contribuyen en la solubilización de zinc y que pueden utilizarse como bioinoculantes para biofertilización y biofortificación (Aketi *et al.*, 2014), los resultados en esta investigación fueron diferentes, ya que *Bacillus aryabhatai* se aisló de forma individual en la localidad de Irapuato y su presencia se asoció a daños severos en ajo tanto en follaje como en los bulbos.

El género *Pantoea* incluye varias especies generalmente asociadas a plantas, ya sea como epífitas o fitopatógenas. La especie *Pantoea Agglomerans*, fue solamente aislada en muestras de Celaya. Se caracteriza por la formación de otro tipo de estructura multicelular llamada symplasmata y mantiene la capacidad de formar biopelículas (Yang *et al.*, 2017). Durante el desarrollo de esta investigación, *P. agglomerans* se aisló de follaje en cultivos de ajo con síntomas R1 y R2 asociado con *E. persicina* y *B. amyloliquefaciens*, por lo que se identifica como patógeno y agente causal de bacteriosis.

B. mojavensis es endófito con propiedades antibacterianas de amplio espectro (Jasim, *et al.*, 2016); sin embargo, en Celaya se aisló de manera individual causando daño en follaje y bulbo de ajo.

Conclusiones

Se encontraron enfermedades emergentes, al identificar seis bacterias asociadas a las plantas de ajo con síntomas en follaje de estrías en hojas (un borde o ambos) y en punta, se procesaron 15 aislamientos bacterianos, identificando molecularmente seis especies en fase de desarrollo vegetativo del cultivo, se detectó: *Bacillus aryabhatai*, *Pantoea agglomerans*, *E. persicina*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. mojavensis*, por lo anterior se considera que son agentes fitopatógenos capaces de afectar tanto el follaje como el bulbo de ajo, por lo que representan un riesgo fitosanitario para este cultivo.

Las especies bacterianas identificadas en Irapuato fueron: *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium* y *Erwinia persicina*. Las cepas de las bacterias patógenas aisladas se encontraron en forma única, capaces de disminuir el rendimiento y ocasionar la pérdida total de la cosecha. Las especies bacterianas identificadas en Celaya fueron: *Pantoea agglomerans*, *E. persicina*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. mojavensis*. Se encontraron de forma única el 71.11% y en consorcio de dos cepas un 28.88%.

Pueden actuar de forma única o en consorcio y llegan a producir en follaje y bulbo de ajo pudrición blanda. En comparación con los aislados en Irapuato solamente se encontró solo una colonia en el 100% de las muestras. Cabe la posibilidad de que el *B. amyloliquefaciens* esté relacionado con la cepa de *E. persicina* o con otras especies de bacterias; sin embargo, queda como un panorama por explorar. Los patógenos comunes aislados en Irapuato y Celaya fueron *Bacillus amyloliquefaciens*,

Erwinia persicina y *Bacillus megaterium*. Se encontraron en consorcios de dos cepas. Se confirmó que las bacterias recuperadas en plantas inoculadas con síntomas correspondieron a las cepas inoculadas.

Recomendaciones

Eliminar los restos vegetales al término del cultivo, voltear los suelos con arado para que la intemperización reduzca las poblaciones de bacterias en el próximo año, hacer rotación de cultivos de diferente familia botánica, controlar insectos y malezas que sean reservorios de bacterias, disminuir la fertilización nitrogenada en caso de presencia de síntomas de bacteriosis, evitar la presencia prolongada de agua libre sobre plantas y suelo; usar riego por goteo, desinfectar herramientas utilizadas en manejo del cultivo, aplicar control químico al bulbo-semilla durante el almacenamiento, en la siembra, de manera preventiva en etapa de plántula, así como durante el desarrollo de todo el cultivo.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca asignada a MJNL Núm. 236955 para la realización de esta investigación. Asimismo, al Tecnológico Nacional de México por el apoyo del proyecto: estudio fitopatológico de la interacción ajo-complejo bacterial Núm. 5426.19P.

Bibliografía

- 1 Aketi, R.; Sharma, S. K.; Sharma, M. P.; Namrata, Y. and Joshi, O. P. 2014. Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhatai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*. 73(1):87-96. <http://doi/10.1016/j.apsoil.2013.08.009>.
- 2 Akram, W.; Aslamc, H.; Ahmad S. R.; Anjumd , T.; Yasind, N. A.; Khanc, W. U.; Ahmada, A.; Guoa, J.; Wua, T.; Luo, W. and Li, G. 2019. *Bacillus megaterium* strain A12 ameliorates salinity stress in tomato plants through multiple mechanisms. *Journal of Plant Interactions*. 14(1):506-518. <https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1662497>.
- 3 Badui-Dergal, S. 2012. Química de los alimentos. Edición Pearson Addison Wesley. Quinta Ed. 744 p. ISBN: 978-607-32-1508-4. <https://es.slideshare.net/marcovinioroblesaguiar/quimica-de-los-alimentos-5a-edicin>.
- 4 Burba, J. L. 2009. Garlic (*Allium sativum* L.) genetic improvement and seed production. Possibilities of adaptation to variable environments. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 3(1):28-44.
- 5 FAO. 2018. Base de datos estadística FAOSTAT. <http://www.fao/faostat/es/#data/QC>.
- 6 Gálvez, L.; Gil-Serna, J.; García-Díaz, M. and Palmero, D. 2015. First report of a garlic bulb rot caused by *Erwinia persicina* in Europe. *Plant Disease*. 99(5):723. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1195-PDN>.
- 7 Hawkes, C. V.; Waring, B. G.; Rocca, J. D. and Kivlin, S. N. 2017. Historical climate controls soil respiration responses to current soil moisture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114(24):6322-6327. <https://doi:10.1073/pnas.1620811114>.
- 8 Inafed. 2017a. Características y uso de suelo en Celaya. Gobierno del Estado de Guanajuato. <https://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM11guanajuato/municipios/11007a.html>.
- 9 Inafed. 2017b. Características y uso de suelo en Irapuato. <https://inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM11guanajuato/municipios/11017a.html>.

- 10 Jasim, B.; Sreelakshmi, S.; Mathew, J. and Radhakrishnan, E. K. 2016. Identification of endophytic *Bacillus mojavensis* with highly specialized broad spectrum antibacterial activity. *3 Biotech* 6(2):187-196. Doi: 10.1007/s13205-016-0508-5.
- 11 Jiménez-Díaz, R. M. 2017. Las enfermedades de las plantas: impactos, amenazas y control. *Boletín de la Real Academia de Córdoba. BRAC.* 166(1):111-130. <https://www.researchgate.net/publication/324091733-las-enfermedades-de-las-plantas-impactos-amenazas-y-control>.
- 12 Khade, Y.; Thangasamy, A. and Gorrepati, K. 2017. Garlic production technology. *Indian Horticulture.* 62(1):57-59.
- 13 Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 7(1):1-41. Doi: 10.1093/nar/gks808.
- 14 Li, X.; Zhang, Y.; Wei, Z.; Guan, Z.; Cai, Y. and Liao, X. 2016. Antifungal activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PLoS ONE.* 11(9):e0162125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125>.
- 15 Marín, F.; Santos, M.; Carretero, F.; Yau, J. A. and Diáñez, F. 2011. *Erwinia aphidicola* isolated from commercial bean seeds (*Phaseolus vulgaris*). *Phytoparasitica.* 39(5):483-489. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0190-4>.
- 16 Navarrete-Maya, R.; Aranda-Ocampo, S.; Rodríguez-Mejía, M. L.; Moya-Hernández, S. L. y González-Ochoa, M. G. 2014. Bacterias fitopatógenas en semillas: su detección y regulación. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 32(2):75-88. <http://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2-01.pdf>.
- 17 Navarro-León, M. J.; Maldonado-Mancera, M. T.; Ramírez-Pimentel, J. G.; Aguirre-Mancilla, C. L.; Pérez-Moreno, L.; Covarrubias-Prieto, J. y Raya-Pérez, J. C. 2019. El recubrimiento de semilla de ajo preserva la viabilidad. *Ciencia y Tecnol. Agrop. México.* 7(1):1-9. <http://somecta.org.mx/Revistas/2019-1/2019-1/Recubrimiento%20de%20semillas%20de%20ajo.pdf>.
- 18 O'Neill, E. M.; Mucyn, T. S.; Patteson, J. B.; Finkel, O. M.; Chung, E.; Baccile, J. A.; Massolo, E.; Schroeder, F. C.; Dangl, J. L. and Bo, L. 2018. Phevamine A, a small molecule that suppresses plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 115(41):E9514-E9522. <https://doi: 10.1073/pnas.1803779115>.
- 19 Palacio-Bielsa, A.; Roselló, M. and Llop, P. 2012. *Erwinia* spp. from pome fruit trees: similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species. *Trees.* 26(1):13-29. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0644-9>.
- 20 Philip, P. 2017. Shining a light on the dark world of plantroot-microbe interactions. *PNAS.* 114(17):4281-4283. 10.1073/pnas.1703800114.
- 21 Yang, J.; Yu, J.; Jiang, J.; Liang, C. and Feng, Y. 2017. D-tyrosine affects aggregation behavior of *Pantoea agglomerans*. *Journal Basic Microbiology.* 57(2):184-189. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600455>.



Identificación de bacterias asociadas a síntomas en follaje de ajo en dos localidades de Guanajuato

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 November 2024
Date accepted: 01 February 2025
Publication date: 20 February 2025
Publication date: Jan-Feb 2025
Volume: 16
Issue: 1
Electronic Location Identifier: e3382
DOI: 10.29312/remexca.v16i1.3382
Funded by: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Funded by: Tecnológico Nacional de México
Award ID: 236955

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

Allium sativum L
bacteriosis en ajo
identificación molecular
patogenicidad

Counts

Figures: 0
Tables: 3
Equations: 2
References: 21
Pages: 0