



Congreso Internacional **Biología, Química y Agronomía**

Science and Technological Innovation:
A Strategy for Well-Being

Ciencia e Innovación Tecnológica:
Estrategia para el Bienestar

José Luis Zavala Aguirre
Juan Villafaña Rojas
Miguel J. Beltrán García
Editores



Editorial Universidad Autónoma de Guadalajara

La información compendiada en este libro digital proviene de los trabajos presentados durante el 5^{to} Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía de la Universidad Autónoma de Guadalajara el cual fue celebrado del 31 de septiembre al 2 de octubre de 2015 en las instalaciones de UNICO de la misma Universidad. La información fue presentada por investigadores y grupos de trabajo especializados sobre quienes recae la responsabilidad de la validez de dichas investigaciones. Los autores, comité editorial y la casa editorial no somos responsables de las consecuencias del uso que se dé a la información presentada. La mención de productos comerciales o servicios, de ninguna manera implican compromisos o afiliaciones por parte de la Universidad Autónoma de Guadalajara. Se autoriza el uso y distribución de los contenidos, libremente proporcionados por los autores para su compilación y registro ante ISBN, para lo cual se requiere sean citados dando créditos a sus creadores. Cualquier duda o aclaración deberán ser realizadas directamente con los autores correspondientes cuyos datos de contacto están registrados en cada contribución. El comité editorial intentó unificar los formatos en base a las retroalimentaciones recibidas durante el proceso de galeras; los datos incompletos o faltas ortográficas son responsabilidad de los autores que no dieron retroalimentación.

ISBN: 978-607-719-005-9

EDITORIAL: Universidad Autónoma de Guadalajara, A.C. Av. Patria 1201. Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco, 45129. México. Primera edición: 2016

Comité Científico:

Agrobiotecnología	Dr. Miguel J. Beltrán García
Biocombustibles	Dr. Froylan Mario Espinosa Escalante
Biología de Recursos Naturales	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Biología Molecular	MC. Aurora Huerta Robles / MC Marcela de la Mora Amutio
Biología y Química del estrés oxidativo	Dr. Miguel J. Beltrán García
Biomateriales	Dr. Tito E. Herrera Larrasilla
Biorremediación	Dr. José A. Lomelí Sención
Biotecnología Alimentaria	MC. Gloria M. Macedo Raygoza / Biól. Claudia I. Cisneros Reyes
Biotecnología Clínica	MC. Araceli Escobedo Magallón
Biotecnología Farmacéutica	MC. Carlos Alberto Manuel Cabrera
Conservación de ecosistemas	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Control Biológico	Dr. David Ortiz Mendoza
Ecotoxicología	Dr. José Luis Zavala Aguirre
Fermentaciones	Dr. Juan Villafañá Rojas
Fitopatología	MC. Laura Marcela Meixner Rojas
Ingeniería Química	Dr. Efrén Aguilar Garnica
Procesos Químicos	Dr. Efrén Aguilar Garnica
Q. Alimentos	Dra. Lourdes Contreras Pacheco
Q. Analítica	MC. Gloria Macedo Raygoza
Q. Bioorgánica	IQ. Ma. Lourdes Rivera Castro
Q. Clínica	MC. Araceli Escobedo Magallón
Q. Farmacéutica	MC. Carlos Alberto Manuel Cabrera
Q. Productos Naturales	IQ. Ma. Lourdes Rivera Castro
Química Agronómica	IA. Lydia Olvera Avila



ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas aeruginosa*, CAUSAL AGENT OF SOFT ROT IN *Polianthes tuberosa*

(Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas aeruginosa*, agente causal de pudrición blanda en *Polianthes tuberosa*)

Beatriz Genoveva Guardado-Fierros^a, Gabriel Rincón-Enríquez^a, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar^{a*}

^aBiotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.

*Autor que presentó el trabajo.

+Autor para correspondencia: eqaguilar08@gmail.com

Área del Conocimiento: Fitopatología.

ABSTRACT

The tuberose (*Polianthes tuberosa*) is one of the most important floriculture crops in the state of Morelos. The production of this crop is affected by various pests and diseases. One of the diseases causing major losses is soft rot caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), ubiquitous and multi-host bacteria. Pa is capable of infecting humans, animals, plants and insects and it has been isolated from various plant species such as onion, radish, potato, lettuce and celery, like sewage, so it is a source of inoculum for floriculture crops. The objective of this work was to isolate and identify Pa from rhizosphere soil of tuberose, from Morelos. Soil samples were taken in the rhizosphere of diseased tuberose plants with soft rot in Puente de Ixtla, Morelos. Pa isolation was performed by the method of serial dilutions 1:10 into selective medium Kings B, where *Pseudomonas* presents a green fluorescent phenotype, 31 isolates were characterized molecularly by ITS and 29 were positive according to the size of the ITS into the genome published for this bacteria, pathogenicity and virulence of the 29 isolates was also determined, the results showed soft rot; therefore Pa bacterial isolates were defined as phytopathogenic.

Keywords: Soft rot; plant pathogenic bacteria; molecular identification by ITS.

RESUMEN

El nardo (*Polianthes tuberosa*) es uno de los cultivos más importantes de la floricultura en el estado de Morelos. La producción de este cultivo se ve afectado por varias plagas y enfermedades. Una de las enfermedades que causan pérdidas importantes es la pudrición blanda provocada por *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), bacteria ubicua y multi-huésped. Pa es capaz de infectar seres humanos, animales, plantas e insectos y se ha aislado a partir de varias especies de plantas como la cebolla, el rábano, papa, lechuga y apio, así como en las aguas residuales, lo que constituye una fuente de inóculo para los cultivos florícolas. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar Pa de suelo de la rizosfera de nardo de Morelos. Las muestras de suelo fueron tomadas de la rizosfera de plantas nardo enfermas por pudrición blanda en Puente de Ixtla, Morelos. El aislamiento de Pa se realizó por el método de diluciones seriales 1:10 en medio selectivo Kings B, donde *Pseudomonas* presenta un fenotipo verde fluorescente,



31 aislados se caracterizaron molecularmente por ITS y 29 fueron positivos a Pa de acuerdo con el tamaño del ITS del genoma publicado de esta bacteria. También se determinó la patogenicidad y la virulencia de los 29 aislamientos de Pa, los resultados mostraron la pudrición blanda; por lo tanto, los aislados bacterianos de Pa fueron considerados como fitopatógenos.

Palabras Clave: Pudrición blanda; bacterias fitopatógenas; Identificación molecular por ITS.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa (Pa) es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama gama de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias como *Escherichia coli*. En los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia de cepas de Pa resistentes a diversos antibióticos de última generación, lo que la hace una de las bacterias difíciles de erradicar. Pa es una de las tres principales bacterias nosocomiales importantes, Pa es patógena oportunista, la predominancia de esta bacteria radica principalmente en su multiresistencia y su gran arsenal de factores de virulencia. Pa es una de las principales causantes de infecciones en pacientes enfermos con cáncer, trasplantes, quemados y en pacientes con fibrosis cística. Sin embargo su rango de hospederos no solo se limita a ser patógena oportunista humana, sino que también se ha reportado como entomopatógena en *Drosophila* sp. y *Galleria mellonella*. En nematodos *Caenorhabditis elegans* y como fitopatógena se ha reportado en lechuga (*Lactuca sativa*) y *Arabidopsis thaliana*, esta última es utilizada para estudiar los factores de virulencia, los cuales se cree son los mismos para infecciones vegetales y animales. Rivera [1] identificó a *P. aeruginosa* como patógena en el cultivo ornamental del nardo (*Polianthes tuberosa*) producido en el estado de Morelos. Pa es aparentemente la causante de la pudrición blanda en los bulbos de este cultivo. La identificación de esta bacteria se basa principalmente en pruebas bioquímicas y fisiológicas como: fermentación de azúcares, prueba oxidasa, motilidad, oxidación de azúcares, descarboxilación de lisina, crecimiento a 42°C. También pueden ser identificadas mediante métodos genéticos, utilizando PCR, RFLP, etc. Sin embargo estos deben ser combinados con pruebas bioquímicas o morfológicas. Identificar a Pa de una manera rápida y oportuna, puede salvar miles de vidas humanas, de igual manera, una prueba rápida puede evitar el riesgo de contaminar cultivos vegetales con aguas contaminadas con la bacteria evitando daños tanto a cultivos, como a personas involucradas en su manejo y posterior consumo. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar a *P. aeruginosa* a partir de pudriciones blandas del cultivo del nardo de Morelos.

METODOLOGÍA

En la Figura 1 se muestra la estrategia metodológica general para el cumplimiento de los objetivos planteados en este estudio. Para la caracterización de Pa, por medio de la técnica de ITS e ITS-RFLP se siguió el protocolo propuesto por [2], para los métodos de extracción de ADN y PCR se siguieron los métodos propuestos por [3]. Las pruebas de patogenicidad y virulencia se realizaron siguiendo lo propuesto en [1].

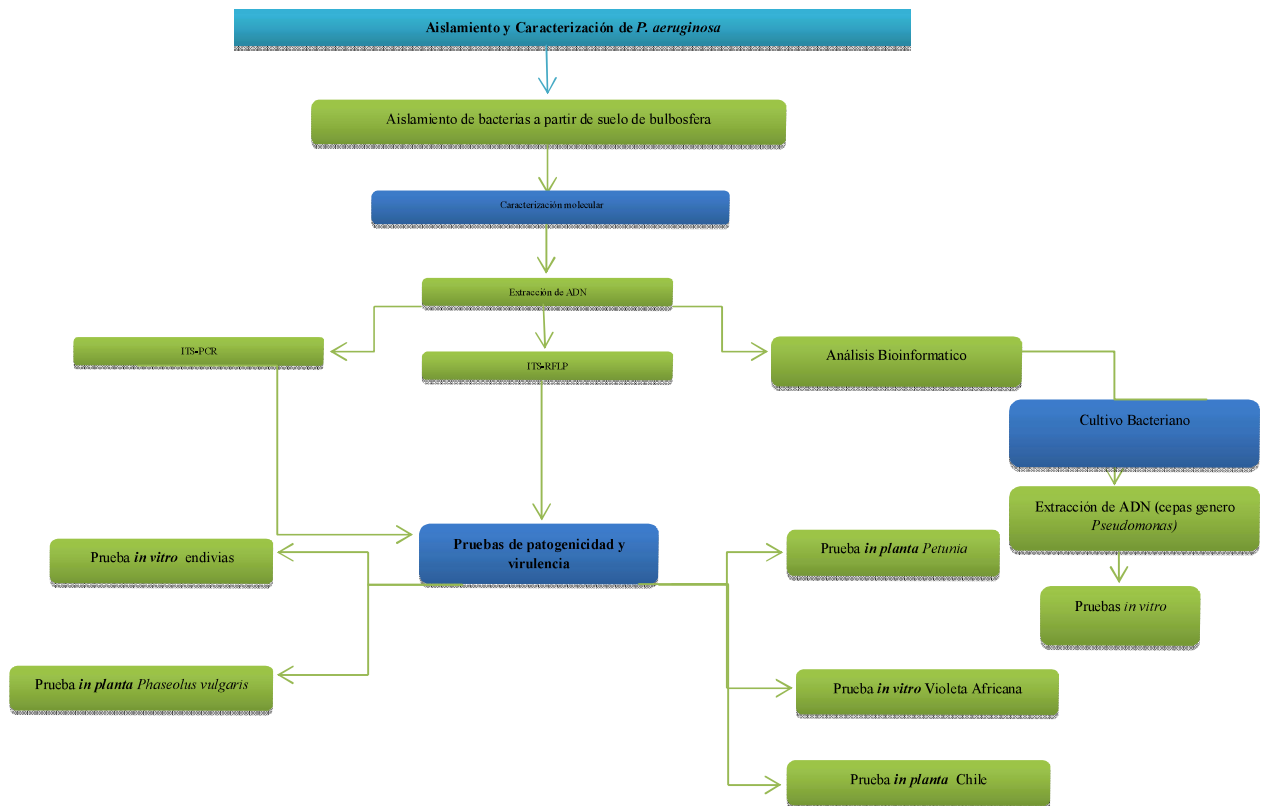


Figura 1. Esquema general de la metodología seguida para el aislamiento y caracterización del agente causal de la pudrición blanda del bulbo o corno del nardo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se obtuvieron 31 aislados típicos de *P. aeruginosa* a partir del suelo rizosférico de nardos con pudrición blanda del predio de Puente de Ixtla, Morelos (18°39'16.64"N /99°21'59.10"O). Los aislamientos mostraron coloración verde-amarilla en medio KB similar a la cepa de referencia de *P. aeruginosa* (Figura 2), por lo que fueron seleccionados para su caracterización molecular mediante la técnica de ITS [2].

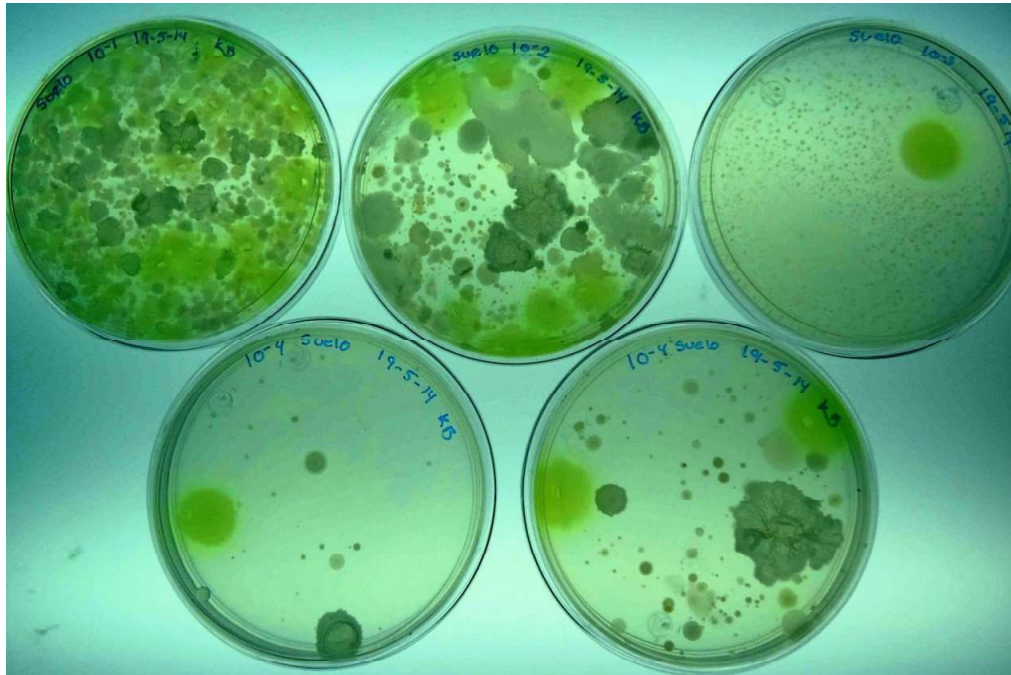


Figura 2. Crecimiento verde-amarillo típico de *P. aeruginosa* sobre medio KB. El aislamiento se realizó a partir de suelo rizosférico de nardos enfermos por pudrición blanda.

La amplificación de la región intergénica (ITS) de *P. aeruginosa* es de 558 pb de acuerdo a una determinación *in silico* en el genoma de *P. aeruginosa*. De los 31 aislamientos presumiblemente aislados como *P. aeruginosa* solo 29 amplificaron la banda esperada de 558 pb (Figura 3a). Para determinar con mayor precisión que los 29 aislamientos seleccionados con los ITS de *P. aeruginosa*, se realizó un análisis de ITS-RFLP. La digestión del fragmento del ITS se realizó con la enzima *CfoI*, de acuerdo a una digestión *in silico* generaría 5 fragmentos característicos de *P. aeruginosa* (221, 143, 104, 72 y 18 pb) en comparación con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (cepa 1448A) (306, 202, 106 y 18 pb) (Figura 3). Posterior a la digestión de los ITS de los 29 aislamientos pertenecientes a *P. aeruginosa* se encontró que el patrón de fragmentos coincidió con el patrón típico de *P. aeruginosa*, por lo que se concluyó que estos aislamientos son cepas de *P. aeruginosa*.

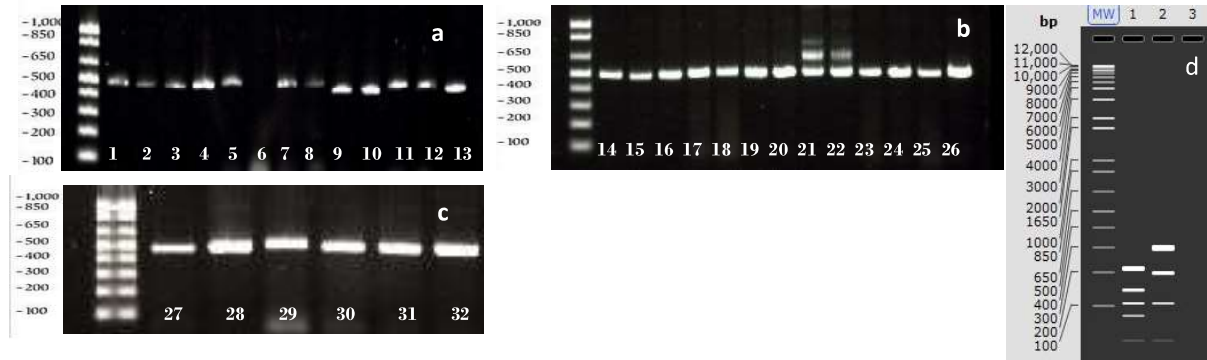


Figura 3. Patrones típicos de ITS de *Pseudomonas aeruginosa* de los distintos aislamientos a partir de rizosfera de nardo proveniente de plantaciones de Morelos. (a). Amplificación de cepas Pa (línea 1) y aislamientos 1 al 12 (línea 2 a 13); (b) aislamientos 13 a 25 (línea 15 a 26); (c) aislamientos 26 a 31 (línea 27 a 32); (d) ITS-RFLP: Digestión del ITS con *CfoI* *in silico* del amplificado de las cepas de *P. aeruginosa* (carril 1) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (carril 2).

Con el fin de corroborar que las cepas empleadas de *Pseudomonas* correspondían a los patovares se realizó una amplificación del ITS de esos patovares. Peters [4] realizaron un estudio de caracterización de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, utilizando como testigos a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, en donde se puede observar que el fragmento de ADN amplificado para los ITS fue de 250 pb, lo cual coincidió con lo encontrado en este estudio, en este mismo sentido en *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* mostró una amplificación igual a lo obtenido en este trabajo (600 pb) [5]. Mientras tanto para las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *glycine*, *phaseolicola* y *tomato* su fragmento de ADN amplificado fue verificado mediante un análisis *in silico*, lo cual coincidió con lo encontrado en el producto de la PCR.

Finalmente, respecto a las pruebas de patogenicidad realizadas en hojas de endivias (*Cichorium endivia*) se encontró que solo 27 cepas de las 29 fueron fitopatógenas, dado que fueron capaces de provocar pudrición blanda (Figura 4B). Por otro lado también se encontró una diversidad en el grado de la enfermedad por parte de las diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas 7 y 23 mostraron solo una respuesta hipersensible en la hoja. Mientras que las cepas 4, 9, 11, 12, 17 y 22 maceraron por completo las hojas de endivias, mientras que el resto de las cepas solo presentó algún grado de virulencia sobre hojas de endivias (Figura 4A).

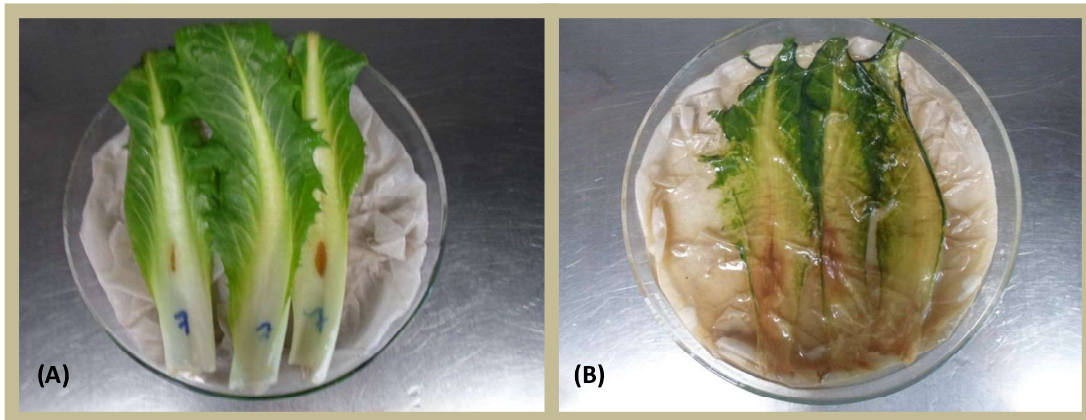


Figura 4. Muestra representativa de las pruebas de patogenicidad y virulencia del banco de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. (A) La cepa 7 solo es capaz de inducir un mínimo de pudrición blanda mientras que la cepa 17 (B) causa una pudrición blanda completa de todas las hojas de endivias después de 5 días de incubación a 28°C.

Pruebas de patogenicidad sobre otras plantas hospederas mostraron distintos resultados, para frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) la cepa 17 mostró mayor patogenicidad con síntomas similares a la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, sin embargo fueron menores a los provocados por la cepa BV157 de *Pseudomonas aeruginosa*. Las pruebas realizadas en petunia (*Petunia* sp.) y chile (*Capsicum annuum* L.) no mostraron síntomas de enfermedad; finalmente un ensayo realizado *in vitro* en violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) mostró que varias cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (entre ellas la 17) maceraban al 100 % hojas de esta especie ornamental.

CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron 29 cepas como *Pseudomonas aeruginosa* a partir de suelo de rizosfera de nardos enfermos por pudrición blanda. 27 de las cepas aisladas de *Pseudomonas aeruginosa* son fitopatógenas y presentan un distinto grado de virulencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto de Fomento Científico y Tecnológico CONACYT-Gobierno del Estado de Morelos por el financiamiento del proyecto "Uso del axihuitl o hierba de agua (*Eupatorium* sp) para control de enfermedades de nardo (*Polianthes tuberosa*) y cultivos ornamentales en agricultura protegida" con el número de proyecto MOR-2009-C02-120296. Beatriz Guardado-Fierros, agradece a CONACYT por la beca para estudios de maestría.

REFERENCIAS

- [1] Rivera, L. (2011). Estudio del agente causal de la pudrición blanda en nardo del estado de Morelos. (Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. UdeG, Guadalajara Jalisco, México).
- [2] Jensen, M. A., J. A. Webster, N. Straus. (1993). "Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism". *Microbiology* 59: 945-



952.

- [3] Sambrook, J., E.F., Fritsch, T. Maniatis, Sambrook, J. (2001). *“Molecular cloning: a laboratory manual”*. 3er Edition. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [4] Peters, B., Ash G., Cother E., Hailstones D., Noble D., Urwin, N. (2004). *“Pseudomonas syringae pv. maculicola in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity”*. Plant Pathology 53: 73-79.
- [5] Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R. G., Ausubel, F., et al. (1995). *“Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals”*. Science 268: 1899-1902.