

NOTA TÉCNICA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Pantoea agglomerans* AISLADA EN PLANTAS DE GLOXINIA (*Gloxinia alba*)

Odaliz Jiménez¹, Nancy Contreras² y Carmen Rodríguez³

RESUMEN

En *Gloxinia alba* se observaron manchas acuosas rodeadas de un halo amarillo en el ápice de las hojas y flores, que al avanzar causaban necrosis de la lámina foliar, defoliación y muerte de la planta. De este material se realizaron aislamientos, que originaron colonias bacterianas de color amarillo. Para las pruebas de patogenicidad se inocularon mediante aspersión de una suspensión bacteriana (10^8 células·mL⁻¹) hojas y flores de gloxinia sin heridas y con heridas, resultando estas últimas afectadas más rápidamente. A los cuatro días los síntomas eran evidentes y al avanzar el tiempo se necrosaron hojas y flores. En los reaislamientos se obtuvieron colonias idénticas a las originales. La bacteria aislada resultó Gram negativa y vista al microscopio óptico presentó forma de bastón. Produjo colonias de color amarillo en los medios de agar nutritivo y YDC. En el medio D₃ de Kado y Heskett cambió la coloración verde del medio a rojo. Resultó anaeróbica facultativa, reacción ácida en agar dextrosa rojo fenol, toleró concentraciones de 5% de NaCl, hidrólisis del almidón negativa, reducción de nitratos positiva, indol positiva, crecimiento positivo en medio YS a 37 °C, oxidasa negativa, catalasa positiva, reducción de carbohidratos positiva con sacarosa, manosa, maltosa, arabinosa y glucosa, y negativa para melibiosa. La bacteria se identificó como *Pantoea agglomerans*, considerándose este el primer reporte de esta bacteria afectando a *Gloxinia alba* en Venezuela y a nivel mundial.

Palabras clave adicionales: Patógenos, bacterias, *Erwinia*, plantas ornamentales

ABSTRACT

Identification and characterization of *Pantoea agglomerans* isolated from *Gloxinia alba*

A humid blight surrounded by a yellow halo was observed in flower and leaf tips of *Gloxinia*, and when advancing caused necrosis, defoliation and death of the plant. Isolations were made of from this material, resulting in yellow bacteria colonies. For the pathogenicity tests, spray inoculations were made using a bacteria suspension (10^8 cells·mL⁻¹) in wounded and non-wounded flowers and leaves, being the former affected more rapidly. Four days later, the symptoms were severe and in time the flowers and leaves became wilted. In the reisolation test, colonies identical to the original were obtained. The isolated bacterium was Gram negative and showed a rod shape through conventional microscope. The colonies were yellow in nutrient agar medium and in YDC. In the medium D₃ of Kado and Heskett, the green coloration changed to red. The pathogen resulted facultative anaerobic, acid reaction in red fenol dextrose agar, tolerant to concentrations of 5% NaCl, negative starch hydrolysis, positive nitrate reduction, positive indol, positive growth in YS medium at 37 °C, negative oxidase, positive catalase, positive carbohydrate reduction in sucrose, manose, maltose, arabinose and glucose, and negative in melibiose. The bacteria was identified as *Pantoea agglomerans*, being considered the first report of this pathogen affecting *Gloxinia alba* in Venezuela and at world wide level.

Additional key words: Plant pathogen, bacteria, *Erwinia*, ornamental plants

INTRODUCCIÓN

El género *Gloxinia* es originario de Brasil y México, pertenece a la Familia *Gesneriaceae* y

tiene numerosas especies como *G. gymnostona*, *G. maculata*, *G. perennis*, *G. chic*, *G. lindeniana*, *G. odyssey*, *G. sylvatic* y *G. alba*, muy utilizadas como plantas ornamentales. Es un cultivo de

Recibido: Septiembre 20, 2006

Aceptado: Marzo 23, 2007

¹ Dpto. de Fitotecnia. Decanato de Agronomía. email: odalizjimenez@ucla.edu.ve

Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

² Posgrado de Fitopatología. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". email: ncontreras@ucla.edu.ve

³ Dpto. de Ciencias Biológicas. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto, Venezuela. email: araujoelena@yahoo.com

flores rojas que crece mejor con poca luz, en suelos sueltos y bien drenados. En Venezuela fue introducida desde hace mucho tiempo (Schnee, 1960).

En plantas de *Gloxinia alba* colectadas en un vivero comercial de Barquisimeto, estado Lara, en año 2003 se observaron manchas acuosas rodeadas de un halo amarillo en el ápice de hojas y flores que al avanzar causaban necrosis de la lámina foliar, defoliación y muerte de la planta, lo que pudieran asociarse con un ataque de la bacteria *Pantoea agglomerans*. Sin embargo, no se pudieron encontrar referencias a nivel nacional o mundial sobre esta bacteria en el cultivo de gloxinia.

El objetivo de este trabajo consistió en la identificación y caracterización del agente causal de los síntomas mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

A hojas y flores afectadas, lavadas con agua destilada estéril (ADE), se les realizaron cortes del tejido en la zona de avance del síntoma (entre el tejido sano y el afectado) para obtener pequeños trocitos, los cuales se colocaron en un portaobjeto sobre una gota de ADE y se observaron al microscopio óptico de luz en lente de inmersión (100x) para comprobar la presencia de flujo bacteriano.

Para realizar los aislamientos se tomaron secciones pequeñas del área afectada y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% durante 2 min. Posteriormente se lavaron tres veces en ADE, se colocaron en tubos de ensayo con ADE y se maceraron. De este macerado se tomó una pequeña porción con un ansa de platino y se sembró por agotamiento en placas de Petri contentivas de agar nutritivo (AN). Las placas se incubaron por 48 h hasta la aparición de colonias, las cuales fueron replicadas individualmente en AN después de 24 h para obtener cultivos puros y realizar las pruebas de patogenicidad.

Para efectuar estas pruebas se tomaron cultivos puros de 48 h de crecimiento sobre medio AN y se preparó una suspensión bacteriana en ADE a una concentración de 10^8 células·mL⁻¹, utilizando los tubos 3 y 4 de la escala de McFarland (Barret, 1975), luego se inocularon en plantas sanas utilizando el método de aspersión sobre las hojas con heridas y sin heridas. De igual manera se

procedió con las plantas testigos, asperjándolas solo con ADE. Todas las plantas se mantuvieron en cámara húmeda durante 48 h en umbráculo, observándolas diariamente hasta la aparición de los síntomas, para luego proceder al reaislamiento del organismo causante de los síntomas, siguiendo el procedimiento descrito inicialmente. El reaislamiento fue utilizado para efectuar la caracterización cultural, morfológica, fisiológica y bioquímica de la bacteria en el Laboratorio de Bacteriología del Posgrado de Fitopatología de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

Las características culturales se determinaron mediante la descripción de la forma, color, elevación y consistencia del aislamiento patogénico sobre los medios AN y YDC (extracto de levadura, dextrosa y carbonato de calcio). Las características morfológicas se establecieron mediante las tinciones de rojo congo, presencia de flagelos y tinción de Gram (Schaad, 1994; Suslow et al., 1982). Las propiedades fisiológicas y bioquímicas fueron estudiadas mediante pruebas de KOH al 3 %, catalasa y oxidasa, prueba de anaerobiosis en el medio Hugh y Leifson, aerobiosis en bactotioglicolato, reacción alcalina o ácida en bacto agar dextrosa rojo fenol, licuefacción de la gelatina, pudrición de la papa, hidrólisis del almidón, reducción de nitratos, producción de ácido sulfhídrico (H₂S), reacción de hipersensibilidad en tabaco, prueba de indol, crecimiento en medio YS (extracto de levadura y sales), tolerancia al NaCl 5 %, producción de ácido a partir de los carbohidratos sacarosa, manosa, maltosa, arabinosa, glucosa y melibiosa (Holt et al., 1994; Schaad, 1994).

Finalmente se realizaron pruebas de crecimiento en los medios diferenciales D₂ (selectivo para *Corynebacterium*), D₃ (selectivo para *Erwinia*), D₄ (selectivo para *Pseudomonas*) y D₅ (selectivo para *Xanthomonas*), según Kado y Heskett (1970).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó flujo bacteriano en los cortes de tejidos vistos al microscopio óptico. Se aisló consistentemente en el medio de cultivo AN y YDC colonias bacterianas de color amarillo, circulares, consistencia mucóide, convexas y lisas.

El método de inoculación que resultó ser más

efectivo en las pruebas de patogenicidad fue el de aspersión de hojas y flores con heridas ya que permitió la mejor expresión de los síntomas en menor tiempo (4 días) en comparación con el método de aspersión en hojas y flores sin heridas

(10 días). Al avanzar el tiempo se necrosaron flores y hojas (Figura 1). En los reaislamientos se obtuvieron colonias idénticas a las originales. Las plantas testigo no mostraron ningún tipo de sintomatología.

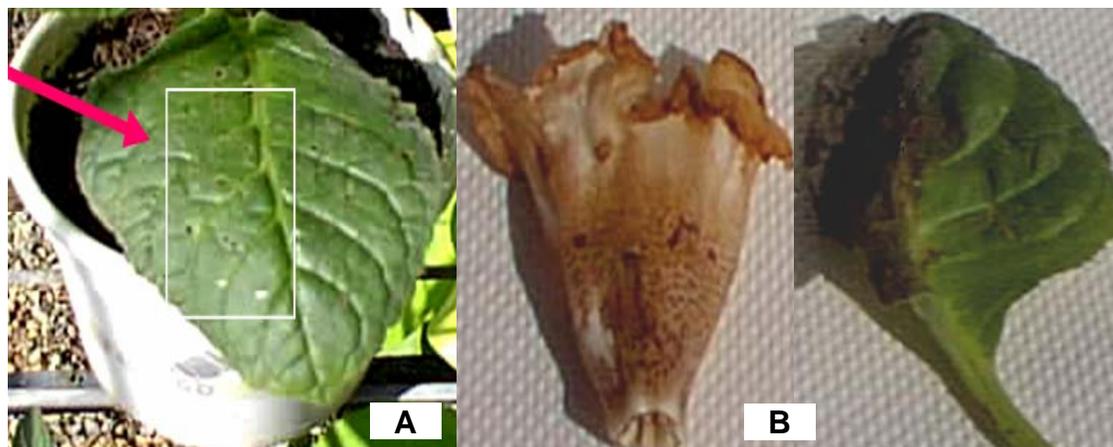


Figura 1. Síntomas de *Gloxinia alba* inoculadas con *Pantoea agglomerans* A) Lesiones foliares iniciales B) Manchas necróticas en flor y hoja

Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la bacteria aislada se presentan en el Cuadro 1. Allí se destaca que la bacteria, entre otras características, presentó flagelación peritrica, reacción de Gram negativa, anaerobiosis en el medio Hugh y Leifson y en la prueba de bactotioglicolato, producción de acidez en el medio bacto agar dextrosa rojo fenol y oxidasa negativa.

Por otra parte, en el Cuadro 2 se observa que existió crecimiento bacteriano de color amarillo en medio YDC. La bacteria creció en el medio diferencial D₃ y no hubo crecimiento de en los medios D₂, D₄ y D₅.

Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas antes mencionadas junto al crecimiento positivo en el medio D₃, el cual indujo la reacción típica del cambio de coloración del medio de verde a anaranjado, permitieron ubicar el aislamiento dentro del género *Erwinia* (Kado y Heskett, 1970; Shaad, 1994; Holt et al., 1994).

La prueba de la pudrición de la papa negativa, licuefacción de la gelatina positiva, crecimiento positivo en YS, la prueba del ácido sulfhídrico positiva, la utilización de los carbohidratos sacarosa, manosa, maltosa, arabinosa y glucosa, y la no reducción de la melibiosa, la ubica dentro de la especie *E. herbicola* (Shaad, 1994; Holt et al.,

1994). *E. herbicola* actualmente es conocida como *Pantoea agglomerans* debido a una transferencia de especie (Gavini et al., 1989).

La identificación de *P. agglomerans* y su diferenciación de otras especies de *Pantoea* es confirmada con base en los siguientes resultados:

La prueba negativa en la pudrición de la papa la diferencia de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. chrysanthemi*. El crecimiento en 5 % de concentración de sales de cloruro de sodio (NaCl) no coincide con lo señalado para *P. chrysanthemi*, la cual no tolera esa concentración de sales.

Las pruebas de producción de ácido sulfhídrico y licuefacción de la gelatina no se ajustan con lo descrito para *E. amylovora* (Shaad, 1994; Holt et al., 1994). La reducción de nitratos y la reacción positiva con la manosa difiere de lo señalado para *E. amylovora*. La reducción de nitratos tampoco coincide con lo observado en *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

La reacción positiva con maltosa no coincide con lo señalado para *P. chrysanthemi*. Así mismo, la reacción positiva con la sacarosa no se ajusta con lo descrito para *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. La reacción fermentativa que induce la bacteria (rápido cambio de color rojo a amarillo) coincide con lo señalado en la literatura

para *P. agglomerans*. La respuesta negativa a la prueba de la pudrición de la papa, la licuefacción positiva de la gelatina, el crecimiento en YS a 37 °C, la respuesta positiva a la prueba del ácido

sulfhídrico y la producción de ácido a partir de la utilización de arabinosa, sacarosa, glucosa, manosa y maltosa, mas no de melibiosa, confirmó la ubicación dentro de la especie *P. agglomerans*.

Cuadro 1. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la bacteria aislada de *Gloxinia alba*

Prueba	Reacción	Observaciones
Tinción con Rojo Congo	Bacilo	
Tinción de flagelos	Peritricos	
Tinción de Gram	-	
KOH al 3%	+	Gram negativa
Catalasa	+	
Oxidasa	-	(24h)
Hugh and Leifson	+	Anaeróbica facultativa
Bactotioglicolato	-	Anaeróbica facultativa
Bacto agar dextrosa rojo fenol	+	Reacción ácida
Licuefacción de la gelatina	+	(72 h)
Pudrición de la papa	-	
Hidrólisis de almidón	-	
Reducción de nitratos	+	
Producción H ₂ S	+	
Hipersensibilidad en tabaco	-	
Indol	-	
Crecimiento en el YS	+	37 °C
Tolerancia al NaCl al 5 %	+	
Reducción de carbohidratos:		
Sacarosa	+	
Manosa	+	
Maltosa	+	
Arabinosa	+	
Glucosa	+	
Melibiosa	-	

Cuadro 2. Crecimiento en medios de cultivo utilizados en la caracterización de la bacteria

Medio	Crecimiento
Medio AN	+ (Amarillo)
Medio YDC	+ (Amarillo)
D ₂ (Kado y Heskett)	-
D ₃ (Kado y Heskett)	+ (Amarillo)*
D ₄ (Kado y Heskett)	-
D ₅ (Kado y Heskett)	-

*El medio cambió de verde a rojo

La bacteria se diferenció de *P. stewartii* subsp. *stewartii* (*E. stewartii*) debido a los resultados de las pruebas de licuefacción de la gelatina, producción de ácido sulfhídrico y utilización de la melibiosa. Se diferenció de *P. ananatis* en que esta última produce ácido a partir de la melibiosa

(Shaad, 1994; Holt et al., 1994). El uso de la prueba del indol como determinante para la separación de dos patovares de *E. herbicola* (pv. *milletiae* y pv. *herbicola*) resultó negativo, lo que refleja que puede tratarse del primer o segundo patovar.

Cabe destacar que *P. agglomerans* ha sido reportada en Venezuela atacando otras ornamentales como begonia tipo besito por Contreras et al. (1991) y *Aglaonema spp.* por Contreras et al. (1994) en viveros del estado Barinas.

Así mismo, Hernández y Trujillo (2000) detectaron a *Erwinia sp.* en plantas de *Kalanchoe sp.*, *Cynoches chlorochylon*, *Catasetum sp.*, *Dieffenbachia sp.* y *Phylodendrum sp.* El presente estudio representa el primer reporte de *P.*

agglomerans afectando a *Gloxinia alba* en Venezuela.

CONCLUSIONES

Los síntomas observados en *Gloxinia alba* fueron causados por la bacteria *Pantoea agglomerans*. Es importante señalar que no se encontraron antecedentes ni referencias de *P. agglomerans* como patógeno de este cultivo.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado. Proyecto 002-AG-1998

LITERATURA CITADA

1. Barret, T. 1975. Preparation of bacterial vaccine. In: R.N. Godman (ed.) Proceedings of the First Workshop of Phytobacteriology. University of Missouri Press. Columbia. p. 73.
2. Contreras, N., G. Trujillo y Y. Hernández. 1991. Bacteriosis afectando begonia (*Begonia sp.*). Fitopatología Venezolana 4: 44 (Resumen).
3. Contreras, N., G. Trujillo y Y. Hernández. 1994. *Erwinia herbicola* causante de un tizón en hojas de *Aglaonema spp.* Agronomía Tropical 44(3): 335-344.
4. Gavini, F., J. Mergaert, A. Beli, C. Mielcarek, D. Izard, K. Kersters y J. De Ley. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck, 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea gen. nov.* as *Pantoea agglomerans comb. nov.* and descriptions of *Pantoea dispersa sp. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 337-345.
5. Hernández, Y. y G. Trujillo. 2000. Problemas bacterianos en algunas ornamentales en Venezuela. 46ª Reunión Anual de la Sociedad Interamericana de Horticultura Tropical. Miami, Florida. Resumen p.14.
6. Holt, J., N.R. Krieg; P.H. Sneath, T. Staley y T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland.
7. Kado, C.I. y M.G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976.
8. Schaad, N.W. (ed.). 1994. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 148 p.
9. Schnee, L. 1960. Plantas comunes de Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. (Maracay). Alcance N° 3: 1-662.
10. Suslow, T., M. Schroth y M. Isaka. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72: 917-918.