

IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE UNA BACTERIOSIS EN

ÑAME (*Dioscorea alata* L.)

Margarita Rodríguez, Juan Matehus, Armando Gerstl y María A. Santana

RESUMEN

El ñame (*Dioscorea alata* L.), ampliamente usado como fuente de calorías en África, Asia y el Caribe, es una planta herbácea y trepadora que se reproduce generalmente de forma vegetativa y produce un tubérculo comestible de gran tamaño con alto contenido de almidón. Varios microorganismos fitopatógenos, incluyendo virus, hongos y bacterias, afectan al cultivo. Plantas enfermas de la zona de Guarataro, estado Bolívar, Venezuela, fueron colectadas en el 2003, año en que hubo ~80% de pérdidas en la producción de ñame de la zona a causa de una enfermedad desconocida. Hojas colectadas de plantas enfermas con lesiones acuosas y necróticas fueron esterilizadas superficialmente y transferidas a solución salina para permitir la difusión de bacterias desde los bordes del tejido y ser luego sembradas en medio LB agar. Como controles se emplearon agua

y medio LB. Colonias amarillas, brillantes y lisas, fueron visibles a las 24-48h de incubación a 30°C. Varios aislados fueron inoculados en las pruebas de hipersensibilidad en tabaco y de patogenicidad en plántulas de ñame cultivadas in vitro. Varios grados de respuesta de hipersensibilidad en tabaco fueron observados. Las plántulas de ñame inoculadas mostraron lesiones acuosas en la lámina foliar, las cuales no se observaron en los controles. Aislados bacterianos fueron observados mediante microscopía de luz, revelando bacterias bacilares Gram negativas. Varios flagelos peritricos fueron observados por microscopía electrónica. Los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas indicaron que los aislados corresponden a *Pantoea agglomerans* (Enterobacteriaceae). Se discuten diferentes metodologías para la identificación de bacterias.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A PHYTOPATHOGENIC BACTERIA FROM WATER YAM (*Dioscorea alata* L.)

Margarita Rodríguez, Juan Matehus, Armando Gerstl and María A. Santana

SUMMARY

Water yam (*Dioscorea alata* L.), a staple crop in Africa, Asia and the Caribbean, is a herbaceous twining vine plant generally reproduced by vegetative sections and highly affected by several phytopathogenic organisms including virus, fungi and bacteria. Diseased plants were collected from Guarataro, Bolívar State, Venezuela, in 2003. That year an unknown disease led to ~80% loss of water yam production. The leaves from diseased plants have watery or necrotic lesions on the leaf lamina. Pieces of necrotic tissue were surface sterilized, then transferred to saline solution and the bacteria allowed to diffuse into the solution from the edge of the dissected tissue. The bacteria were isolated on LB agar media. Yellow, shining, smooth colonies with regular margins were visible within 24-48h

of incubation at 30°C. Several isolates were inoculated on tobacco plants. Water and LB media were used as negative controls. Several degrees of hypersensitivity response resulted from the inoculation of tobacco. However, inoculation of in vitro water yam plants showed watering lesions on the leaf lamina inoculated with bacteria cultures and no lesions on water and media inoculated leaves. Bacterial cells observed by light microscopy showed Gram-negative regular rods. Several peritricous flagella were observed under EM. Data from biochemical and physiological tests indicated that the isolates belong to the Enterobacteriaceae family specifically to *Pantoea agglomerans*. Different methodologies for bacterial identification are discussed.

Introducción

El ñame constituye un cultivo de varias especies de la familia Dioscoreaceae, la cual comprende más de 600 especies distribuidas en la zona tropical húmeda. *Dioscorea alata* L. es un ñame originario de Asia que

ha sido cultivado desde hace varios miles de años, siendo esta especie la más ampliamente distribuida en las zonas productoras. *Dioscorea alata* L. es una planta trepadora cuyas raíces producen un tubérculo profundo de gran tamaño y alto contenido de almidón. El ñame es cultivado y consumido princi-

palmente en los trópicos húmedos de África, Asia y el Caribe. Se reproduce principalmente de forma vegetativa mediante fracciones de los tubérculos, siendo esto la principal causa de la poca disponibilidad de material de siembra, ya que ~30% de los tubérculos son guardados con ese fin. Adicionalmente, también

a consecuencia de la reproducción vegetativa, las enfermedades son transferidas de un ciclo a otro y de una localidad a otra, incidiendo esto sobre la productividad del cultivo.

A nivel mundial >90% de la producción de ñame tiene lugar en el continente africano, siendo Nigeria su principal productor

PALABRAS CLAVE / Bacteriosis / *Dioscorea alata* L. / Fitopatógenos / Ñame /

Recibido: 14/08/2007. Modificado: 05/06/2008. Aceptado: 06/06/2008.

Margarita Rodríguez. Licenciada en Educación Mención Biología, Universidad Católica Andrés Bello (UCAB), Venezuela. M.Sc., Ph.D., Carleton University, Canadá. Profesora, Universidad Simón Bolívar (USB), Venezuela.

Juan Matehus. Ingeniero Agrónomo, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesional Asociado, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Venezuela.

Armando Gerstl. Ingeniero Agrónomo, UCV, Venezuela. Geren-

te de Campo. Agroindustrial Mandioca CA, Temblador, Estado Monagas, Venezuela.

María Angélica Santana. Licenciada en Biología, USB, Venezuela. Ph.D., University of Cambridge, Inglaterra. Profesora, USB, Venezuela.

Investigadora Invitada, IDEA, Venezuela. Dirección: Departamento de Biología Celular. División de Ciencias Biológicas, USB. Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Caracas 1080. Venezuela. e-mail: msantana@usb.ve

IDENTIFICACIÓN DO AGENTE CAUSAL DE UNA BACTERIOSE NO INHAME (*Dioscorea alata* L.)

Margarita Rodríguez, Juan Matehus, Armando Gerstl e María A. Santana

RESUMO

O inhame (*Dioscorea alata* L.), amplamente usado como fonte de calorías na África, Ásia e no Caribe, é uma planta herbácea e trepadeira que se reproduz geralmente de forma vegetativa e produz um tubérculo comestível de grande tamanho com alto conteúdo de amido. Vários microorganismos fitopatogénos, incluindo vírus, fungos e bactérias, afetam ao cultivo. Plantas enfermas da zona de Guarataro, estado Bolívar, Venezuela, foram coletadas em 2003, ano em que houve ~80% de perdas na produção de inhame dessa zona a causa de uma enfermidade desconhecida. Folhas coletadas de plantas enfermas com lesões aquosas e necróticas foram esterilizadas superficialmente e transferidas a uma solução salina para permitir a difusão de bactérias desde as bordas do tecido e ser logo plantadas em meio LBA. Como controles foram empregados água e meio LBA.

Colônias amarelas, brilhantes e lisas, foram visíveis às 24-48h de incubação a 30°C. Vários isolados foram inoculados nas provas de hipersensibilidade em tabaco e de patogenicidade em plântulas de inhame cultivadas *in vitro*. Vários graus de resposta de hipersensibilidade em tabaco foram observados. As de plântulas de inhame inoculadas mostraram lesões aquosas na lâmina foliar, as quais não se observaram nos controles. Isolados bacterianos foram observados mediante microscopia de luz, revelando bactérias bacilares Gram negativas. Vários flagelos peritricos foram observados por microscopia eletrônica. Os resultados das provas bioquímicas e fisiológicas indicaram que os isolados correspondem a *Pantoea agglomerans* (Enterobacteriaceae). Discutem-se diferentes metodologias para a identificação de bactérias.

con 34×10^6 t en 2006, lo que representó el 77% de la producción mundial (FAOSTAT, 2007). En Venezuela, el ñame es un cultivo marginal cuyo principal uso es el consumo directo como hortaliza. La producción nacional del cultivo para el año 2006 fue de 86952t, con una productividad de $8,6t \cdot ha^{-1}$, menor al promedio mundial de $9,1t \cdot ha^{-1}$ y muy por debajo de los rendimientos alcanzados en algunos países como Japón con una productividad de $23,3t \cdot ha^{-1}$ (FAOSTAT, 2007). El área de cultivo reportada en Venezuela para 2006 fue de 10093ha, razón ésta de la poca importancia y atención que se le ha dado a la producción de material de siembra sano y al apoyo en el estudio de los problemas del cultivo.

El ñame es fuertemente atacado por diversos organismos fitopatogénos virales y fúngicos, que afectan su productividad y almacenamiento, siendo éstos los responsables de la pérdida de ~25% de la producción anual. La mayor parte de las pérdidas reportadas para el cultivo son debido a enfermedades virales, antracnosis y nemátodos (Amusa *et al.*, 2003). Con relación a las bacteriosis, el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) reporta únicamente la presencia de una enfermedad bacteriana, conocida como la enfermedad de la agalla de la corona, cuyo agente causal es

Agrobacterium tumefaciens y la pudrición bacteriana. Para esta última no se encontró ningún reporte que describiera el agente causal de la enfermedad. Adicionalmente, Hernández y Trujillo (1993) reportan una bacteriosis en mapuey (*Dioscorea trifida* L.) cuyo agente causal fuera identificado dentro del género de la *Xanthomonas* sp., y Knight *et al.* (1999) sugieren que *Xanthomonas campestris* puede infectar a *Dioscorea cayenensis*, siendo éste uno de los factores que pudiera estar afectando la producción de ñame en Jamaica.

En Venezuela no se ha reportado bacteriosis de importancia en cultivos de *Dioscorea alata* L. o presentes en el material de siembra utilizado por los agricultores. Sin embargo, en el 2003 se registró en la zona de Guarataro, al oriente del país, una pérdida cercana al 80% del total del material sembrado en la zona, que presentaba lesiones acuosas y pudrición avanzada de los tejidos. El presente trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar el agente causal presente en plantas de ñame enfermas proveniente de la zona en cuestión.

Materiales y Métodos

Plantas de ñame enfermas de tres variedades, "Criollo", "Culebrón" y "Uña", fueron colectadas en la zona de Guarataro, Estado Bolívar, Venezuela. Explantes

con yemas laterales fueron desinfectados superficialmente con etanol 70% por 1min y luego tratados por 10min con cloro comercial (hipoclorito de sodio 2,5%) y Tween 20 0,5%, previo al aislamiento de bacterias a partir de los tejidos en solución salina. Las especies bacterianas presentes en el explante fueron inoculadas en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con agar 1,5% (LBA) e incubadas a 30°C por 24h. Colonias individuales fueron resuspendidas en agua estéril y reinoculadas mediante estriado por estiramiento en medio LBA hasta alcanzar un cultivo puro.

Las pruebas de hipersensibilidad fueron realizadas en plantas de tabaco, inoculando cultivos bacterianos de 24h de crecimiento en medio LB a 30°C ($\sim 1 \times 10^8$ ufc/ml). Semillas de tabaco fueron sembradas en turba estéril y luego trasplantadas individualmente en bolsas. Plantas de 20-25cm y con 4-6 hojas fueron utilizadas para las pruebas de hipersensibilidad. Agua y medio LB estéril fueron utilizados como controles negativos. Las reacciones de hipersensibilidad fueron observadas 24 y 48h después de la inoculación.

Las pruebas de patogenicidad se hicieron inoculando plantas de ñame provenientes del Banco de Germoplasma del Instituto de Estudios Avanzados, Venezuela, y crecidas bajo condiciones *in vitro*. Previo a la inoculación,

plantas de ñame de seis semanas creciendo *in vitro* en medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 3% sacarosa, $1mg \cdot l^{-1}$ ácido naftalén acético, $0,2mg \cdot l^{-1}$ bencil aminopurina y 0,1% carbón activado, fueron transplantadas a envases de vidrio conteniendo agua y una esponja de soporte (Trigiano y Gray, 2000). Dichas plantas fueron mantenidas por 7 días antes de su inoculación en una cámara de crecimiento con luz, fotoperíodo y temperatura controladas (2500lux, 12h luz y 28-30°C) e inoculadas con la aguja de una jeringa conteniendo la solución de bacterias de 24h de crecimiento en LB a 30°C ($\sim 1 \times 10^8$ ufc $\cdot ml^{-1}$). Agua y medio LB estéril fueron también utilizados como controles negativos de esta prueba. El progreso de la enfermedad fue monitoreado durante 15 días.

Siguiendo el protocolo de identificación de bacterias fitopatogénas reportado por Schaad *et al.* (2001), se procedió a hacer la tinción de Gram y la prueba de la solubilidad en KOH 3%. Luego se procedió a la prueba del crecimiento anaeróbico usando el sistema GasPak Anaerobic System (Gibco-BBL, Voigt Global Distribution, EEUU) y la prueba de oxidación/fermentación de la glucosa o prueba de Hugh y Leifsons (Macfaddin, 1976).

La observación de los flagelos se hizo en cultivos bacterianos

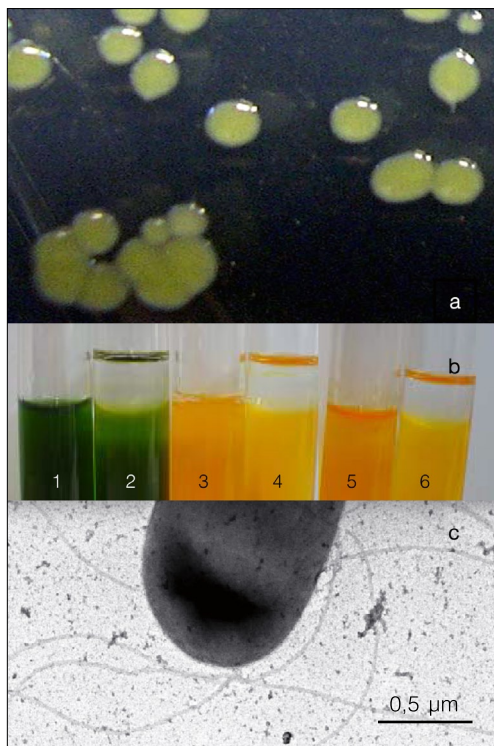


Figura 1. Caracterización morfológica de la cepa bacteriana aislada a partir de explantes de ñame (*Dioscorea alata* L.) provenientes de la región del Guarataro, Estado Bolívar, Venezuela. a: Morfología de la colonia creciendo en medio LB; b: prueba de anaerobiosis por fermentación/oxidación de la glucosa; tubos 1-2 *Xanthomonas campestris* (control negativo), tubos 3-4 cepa bacteria bajo estudio (prueba positiva, anaeróbica facultativa) y tubos 5-6 *Erwinia carotovora* ATCC 15713 (control positivo); c: microscopía electrónica de la bacteria teñida por tinción negativa y observada en un microscopio electrónico de trasmisión.

de 24h de crecimiento en LB a 30°C, los cuales fueron resuspendidos cuidadosamente en agua estéril y diluidos a razón de 1:10⁴. Los cultivos diluidos fueron teñidos mediante tinción negativa y la observación de los flagelos se hizo en el Servicio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Estructural del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, en un microscopio electrónico marca Philips Cryo CM120.

La extracción de pigmentos se hizo en acetona:metanol (50:50) siguiendo el procedimiento reportado por Sedkova *et al.* (2005). El espectro de absorción del pigmento se hizo en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-VIS Lambda35.

La caracterización bioquímica se llevó a cabo mediante la inoculación de las cepas en los medios específicos, siguiendo los procedimientos de MacFaddin

rafinosa, sorbitol e inositol. Adicionalmente, se verificó el crecimiento a diferentes temperaturas y se hicieron las pruebas de Voges-Proskauer y MIO (motilidad, indol y ornitina decarboxilasa).

Para confirmar la identificación bioquímica de las cepas aisladas se realizaron las pruebas MicroScan Autoscan4 y el análisis del perfil de ácidos grasos, en el Laboratorio de Bacteriología de la Clínica Leopoldo Aguerrevere, Caracas, y por el servicio del laboratorio de patología vegetal de la Universidad de Florida, EEUU, respectivamente.

Con el objeto de hacer la tipificación de los genes del ARN ribosomal 16S de la cepa bacteriana, el ADN bacteriano fue aislado mediante el procedimiento de Chen y Kuo (1993). La amplificación del ADN que codifica a los genes del ARN ribosomal 16S se hizo mediante



Figura 2. Pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad. a: Reacción de hipersensibilidad de la hoja de tabaco a la cepa bacteriana aislada a partir de explantes de ñame (*Dioscorea alata* L.) provenientes de la región del Guarataro, Estado Bolívar; b: hoja de planta de ñame cultivada *in vitro* inoculada con medio de cultivo; c: prueba de patogenicidad con hoja de planta de ñame cultivada *in vitro* inoculada con la cepa bacteriana aislada.

(1976) y Schaad *et al.* (2001). Las pruebas bioquímicas realizadas fueron licuefacción de gelatina, catalasa, oxidasa, ureasa, reducción de nitratos, producción de H₂S a partir de peptona, citrato, indol, rojo de metilo, ornitina decarboxilasa, y la formación de ácido a partir de la utilización de glucosa, sacarosa, arabinosa, manosa, trealosa, celobiosa, ramnosa, melibiosa,

la metodología publicada por Lu *et al.* (2000) con los cebadores universales (U1 y U2) reportados. Después de 10min de denaturalización del ADN a 94°C, se corrieron 35 ciclos de 1min a 94°C para la denaturalización, 1min a 55°C para el acoplamiento del cebador y 2min para la síntesis o extensión. Al final, un ciclo de 10min a 72°C fue incluido para la terminación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de 1xTAE - 1% (p/v) agarosa, purificados y secuenciados por el servicio de secuenciamiento del Laboratorio de Genómica del Instituto de Estudios Avanzados. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el uso del programa DNAMAN y comparadas con las secuencias publicadas en la base de datos del *genebank* por BLAST de nucleótidos (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Las pruebas para determinar motilidad bacteriana por contracción, enjambre y natación se hicieron siguiendo la metodología de Rashid y Kornberg (2000).

Resultados y Discusión

De las tres variedades de ñame provenientes del Guarataro, Estado Bolívar, pudieron aislarse bacterias que formaron colonias brillantes de color amarillo (Figura 1a). La tinción Gram y KOH al 3% indicaron estar en presencia de bacterias Gram negativas capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis (Figura 1b). La observación de la bacteria por microscopía

electrónica de transmisión con tinción negativa mostró la presencia de varios flagelos peritricos (Figura 1c).

Las reacciones de hipersensibilidad en tabaco fueron positivas a las 48h pero la respuesta de hipersensibilidad (Figura 2a) fue variable entre diferentes inoculaciones de los aislados. Las cepas aisladas fueron inoculadas en plantas *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) produciéndose la aparición de lesiones acuosas en la lámina foliar, amarillamiento de los bordes de las lesiones y la senescencia prematura de las hojas inoculadas con la bacteria (Figura 2c). Ninguna lesión fue observada en aquellas plantas que fueron inoculadas con agua o medio de cultivo estéril (Figura 2b). Adicionalmente, las bacterias pudieron ser reaisladas de las plantas enfermas inoculadas, presentando las mismas características de las cepas que le dieron origen.

El pigmento extraído a partir del cultivo bacteriano tuvo dos picos de absorción, uno a 522nm y otro a 490nm, este último indicativo de pigmentos de la presencia de carotenoides (Polivka *et al.*, 1999; Sedkova *et al.*, 2005).

Los resultados de las pruebas de caracterización bioquímica llevadas a cabo en las cepas aisladas a partir de plantas enfermas se listan en la Tabla I y muestran un perfil bioquímico que las diferencian de otras bacterias fitopatógenas, tales como *Xanthomonas campestris* (mostrado en la tabla) y *Erwinia carotovora*, entre otras (Schaad *et al.*, 2001).

TABLA I
RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS
DE LAS CEPAS DE *Pantoea agglomerans* AISLADAS DE
ÑAME Y LAS DE *Xanthomonas campestris* REPORTADAS
EN LA LITERATURA

Pruebas	<i>Pan</i> *	<i>Xam</i> **
Tinción Gram	-	-
Crecimiento a 40°C	+	NE
Crecimiento en NaCl	5%	3%
Catalasa	+	+
Citrato	+	+
Oxidasa	-	-
Ureasa	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	+
Hidrólisis de esculina	NE	+
Rojo Metilo	-	-
Anaerobio facultativo	+	-
Pigmento xanthomonadinas	-	+
Producción de H ₂ S	-	+
Producción de indol	-	-
Reducción nitrato	-	-
Arginina hidrolasa	-	-
Lisina decarboxilasa	-	-
Ornitina decarboxilasa	-	-
β-galactosidasa	+	+
Voges-Proskauer	+	-
Producción de ácido por utilización de:		
Glucosa	+	+
Sacarosa	+	+
Inositol	-	NE
Arabinosa	+	+
Manosa	+	+
Trealosa	+	+
Celobiosa	+	+
Ramnosa	+	-
Rafinosa	+	+
Melobiosa	+	+
Sorbitol	+	-

* *Pantoea agglomerans*. ** *Xanthomonas campestris*.
NE: no ensayado.

El análisis de un cultivo en el Microscan autoscan 4, que analiza adicionalmente las actividades de las enzimas arginina hidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, β-galactosidasa y la utilización de adonitol, malonato, acetato, cetrinida y esculina, identificó a la bacteria con un 96,5% de probabilidad como *Enterobacter agglomerans*, actualmente denominada *Pantoea agglomerans* (Gavini *et al.*, 1989).

El grupo bacteriano *Pantoea* está conformado por el antiguo grupo denominado *Enterobacter agglomerans*, donde también estaba incluida *Escherichia vulneris* (Brenner *et al.*, 1982). La especie está ampliamente distribuida y ha sido aislada de plantas, suelos y humanos (heridas, sangre y órganos internos) después de heridas con material vegetal (Cruz *et al.*, 2007). El grupo *Pantoea* también recoge al antiguo grupo de bacterias

clasificadas como *Erwinia herbicola*, especie que ha sido reportada como endofítica en varias especies de plantas y saprófita del suelo (Gavini *et al.*, 1989; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

Por otro lado, el análisis de los ácidos grasos ubicó a esta bacteria dentro de la especie *Escherichia vulneris* con un índice de similitud de 0,83. Una búsqueda en la base de datos de las características bioquímicas que diferencian *E. vulneris* y *P. agglomerans* muestra que se diferencian por la actividad de la lisina decarboxilasa, y la prueba de Voges-Proskauer, las cuales deben dar positiva y negativa, respectivamente, para *E. vulneris* e inversamente (negativa

y positiva) como *P. agglomerans* (Sacsquispe y Ventura, 2001). Las pruebas dieron para *P. agglomerans*.

Adicionalmente, el análisis de una secuencia parcial de 850pb de la región conservada de los genes del ARN ribosomal 16S mostró que la secuencia reportada en la base de datos del *genebank* con mayor identidad fue de una *Enterobacteriaceae* CCUG (AY837751.1), y de éstas las del género *Enterobacter*, siendo *Enterobacter cloacae* (EF120473.1) la primera especie indicada en la lista de identidad de acuerdo a un BLASTn con el *genebank*. Una búsqueda de las diferencias bioquímicas entre *P. agglomerans* y *E. cloacae*, muestra que la arginina hidrolasa y la ornitina decarboxilasa son positivas para *E. cloacae* y negativas para *P. agglomerans* (Sacsquispe y Ventura, 2001). Ambas pruebas fueron realizadas, siendo negativas para el aislado de ñame.

La identificación de bacterias por la secuencia de los genes ribosomales ha sido ampliamente utilizada en los últimos años. Sin embargo, para el grupo de las *Enterobacteriaceae* se ha reportado la poca discriminación que puede tener esta metodología en la diferenciación de especies estrechamente relacionadas dentro del grupo, debido al alto grado de conservación de estos genes (Spröer *et al.*, 1999; Paradis *et al.*, 2005). La comparación de

la secuencia ribosomal del aislado con las secuencias reportadas en el *genebank* mostró que varios géneros de bacterias mostraban 99% de homología. Esto resultó aún más evidente al comparar dos secuencias del *genebank*; una correspondiente a *Enterobacter cloacae* (cepa B5 DQ202394.1) y una de *P. agglomerans* (AB004691.1) encontrándose únicamente 4 nucleótidos de diferencia de 850pb entre las dos secuencias. De aquí la necesidad de la búsqueda de nuevos genes para el análisis filogenético y la identificación de este grupo de bacterias. Debido a esta problemática Paradis *et al.* (2005) proponen el uso de los genes que codifican para el factor de elongación Tu y la subunidad β de la F-ATPasa, para la mejor discriminación de las diferentes especies dentro del grupo de las *Enterobacteriaceae*.

Una observación relevante es que la cepa aislada mostró consistentemente la formación de biopelícula, una apariencia mucoides después de varios días de crecimiento y una prueba positiva para el movimiento por contracciones (*twitching*), por natación (*swimming*), y por enjambre (*swarming*; Figura 3). La formación de agregados de apariencia mucosa en la superficie del tubo en la interfase líquido-aire, es característico de la formación de una biopelícula, como se muestra en la Figura 3a. Esto se debe a la

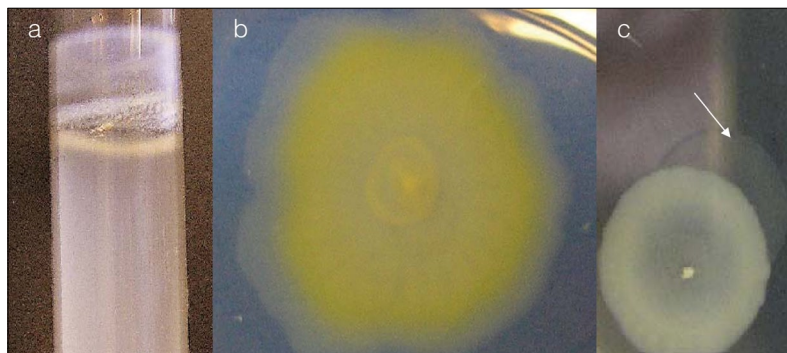


Figura 3. Pruebas de caracterización del movimiento de la cepa bacteriana aislada y formación de biopelícula. a: Formación de biopelícula en la interfase del medio; b: prueba para verificar el movimiento bacteriano por enjambre (*swarming*) tras inocular la bacteria con palillo de punta fina en medio LB con 0,6% agar e incubar a 30°C por 16h; c: prueba para verificar el movimiento bacteriano por contracciones (*twitching*), en las que colonias crecidas en LBA fueron inoculadas con un palillo punta fina hasta al final del medio LB con agar 1% e incubado a 30°C por 16h. La flecha indica el halo de desplazamiento de la bacteria en la interfase acuosa entre el medio y la placa.

adhesión de células planctónicas del medio que se desplazan por medio de flagelos o pili y se adhieren a la superficie para formar primero una monocapa de microcolonias que se desarrollan como comunidades complejas, cubiertas de exopolisacáridos, que las ayudan a retener alimento y protegerse de agentes tóxicos (Costerton *et al.*, 1995). Adicionalmente, la motilidad bacteriana ha sido reconocida como una de las propiedades necesarias para la formación de una biopelícula (Pratt y Kolter, 1998; Harshey, 2003). Las diferentes formas de motilidad permiten la formación de asociaciones simbióticas o patogénicas en plantas y animales. La biopelícula esta relacionada con los mecanismos de patogenicidad de bacterias fitopatógenas de muchos cultivos (Parsek y Greenberg, 2005; Torres *et al.*, 2007). Koutsoudis *et al.* (2006) reportan que la patogenicidad de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* y su colonización en el xilema de la planta se realiza mediante la formación de biopelícula, lo cual conduce al bloqueo del tejido al paso de agua y al posterior marchitamiento que caracteriza a la enfermedad. Todo este proceso se inicia con la formación de la biopelícula, la que es regulada por el mecanismo de *quorum sensing*, el cual regula a su vez expresión de genes de patogenicidad bacteriana. La formación de la biopelícula observada para las cepas aisladas a partir de ñame pudiera estar relacionado entonces con la patogenicidad bacteriana.

P. agglomerans ha sido reportada en años recientes como una especie fitopatógena de algunos cultivos de importancia económica tales como el milo, la cebolla, la remolacha, el palmito y el algodón entre otros (Frederickson *et al.*, 1997; Ezra *et al.*, 2004; Edens *et al.*, 2006; Medrano y Bell, 2007). En Venezuela este es el primer reporte de *Pantoea agglomerans* en *Dioscorea alata* L. Sin embargo, existen reportes de infecciones de esta especie

en cultivares de arroz (González *et al.*, 2003) y plantas ornamentales de *Gloxinia alba* (Jiménez *et al.*, 2007).

Conclusión

El presente trabajo muestra el aislamiento e identificación de *Pantoea agglomerans* a partir de plantas de ñame (*Dioscorea alata* L.) enfermas provenientes de la zona del Guarataro, Estado Bolívar, Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Bacteriología de la Clínica Leopoldo Aguerrevere por el análisis bacteriológico con el Microscan Autoscan4 y a Yhendi García por su asistencia técnica.

REFERENCIAS

- Amusa NA, Adegbite AA, Muhammed S, Baiyewu RA (2003) Yam diseases and its management in Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 497-502.
- Brenner DJ, McWhorter AC, Knutson JKL, Steigerwalt AG (1982) *Escherichia vulneris*: a New Species of *Enterobacteriaceae* Associated with Human Wounds. *J. Clin. Microbiol.* 15: 1133-1140.
- Chen W, Kuo T (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucl. Ac. Res.* 21: 9.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial Biofilm. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-749.
- Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH (2007) *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1989-1992.
- Edens DG, Gitaitis RD, Sanders FH, Nischwitz C (2006) First Report of *Pantoea agglomerans* Causing a Leaf Blight and Bulb Rot of Onions in Georgia. *Plant Dis.* 90: 1551.
- Ezra D, Barash I, Weinthal DM, Gaba V, Manulis S (2004) PthG from *Pantoea agglomerans* pv *gypsophilae* encodes an avirulence effector that determines incompatibility in multiple beet species. *Mol. Plant Pathol.* 5: 105-113.
- FAOSTAT (2007) <http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>
- Frederickson DE, Monyo ES, Odvody GN, King SB (1997) A disease of Pearl Millet in Zimbabwe Caused by *Pantoea agglomerans*. *Plant Dis.* 81: 959.
- Gavini F, Meraert J, Beji A, Mielcarek C, Izard D, Kersters K, De Ley J (1989) Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck, 1988), Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. Nov. As *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 337-345.
- González A, Contreras N, Galindo I, Sánchez B, Gómez N (2003) Identificación Convencional y Molecular de *Pantoea agglomerans*, patógeno bacteriano aislado en dos localidades del circuito arrocero nacional. *I Cong. Venez. Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola.* (www.danac.org.ve/semana/index.php?id_semana=189)
- Harshey RM (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 249-273.
- Hernández Y, Trujillo GE (1993) Bacteriosis en mapuey (*Dioscorea trifida* L.). *Rev. Fac. Agron. Maracay* 19: 87-98.
- Jiménez O, Contreras N, Rodríguez C (2007) Identificación y caracterización de *Pantoea agglomerans* aislada en plantas de *Gloxinia (Gloxinia alba)*. *Bioagro* 19: 53-57.
- Knight OS, Hamilton MAE, Omoruyi FO, Asemota HN (1999) Cell wall degrading enzymes in in vitro derived plantlets of Round-Leaf Yellow yam (*Dioscorea cayenensis*) infected with *Xanthomonas campestris*. *Proc. 4th Conf. Faculty of Pure and Applied Sciences.* UWI, Mona, Jamaica. p. 103.
- Koutsoudis MD, Tsalts D, Minogue TD, von Bodman SB (2006) Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *PNAS* 103: 5983-5988.
- Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC (2000) Use of PCR Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2076-2080.
- Macfaddin JF (1976) *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria.* Williams and Williams. Baltimore, MD, EEUU. 850 pp.
- Medrano EG, Bell AA (2007) Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *J. Appl. Microbiol.* 102: 134-143.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-496.
- Paradis S, Boissinot M, Paquette N, Bélanger SD, Martel EA, Bourdreau DK, Picard FJ, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG (2005) Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase b-subunit. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 55: 2013-2025.
- Parsek MR, Greenberg EP (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 13: 27-33.
- Pratt LA, Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30: 285-293.
- Polivka T, Herek JL, Zigmantas D, Akerlund HE, Sundström V (1999) Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids. *PNAS* 96: 4914-4917.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero EM (2006) Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Mol. Plant Microb. Interact.* 19: 827-837.
- Sacsaquispe R, Ventura G (2001) *Manual de Procedimientos Bacteriológicos. Infecciones Intrahospitalarias.* Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. 85pp.
- Sedkova N, Tao L, Rouviere PE, Cheng Q (2005) Diversity of Carotenoid Synthesis Gene Clusters from Environmental *Enterobacteriaceae* Strains. *Appl. Env. Microbiol.* 71: 8141-8146.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.* 3^a ed. APS Press. St. Paul, MN, EEUU. 373 pp.
- Spröer C, Mendrock U, Swiderski J, Lang G, Stackebrandt E (1999) The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Rashid MH, Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 97: 4885-4890.
- Torres PS, Malamud F, Rigano LA, Russo DM, Marano MR, Castagnaro AP, Zorregiatta A, Bourab K, Dow JM, Vojnov AA (2007) Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Env. Microbiol.* 9: 2101-2109.
- Trigiano RN, Gray DJ (2000) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises.* CRC. Boca Raton, FL, EEUU. 454 pp.