

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Bacterias asociadas a la pudrición blanda del cogollo del *Agave tequilana* Weber var. Azul en Nayarit

Bacteria associated with soft rot of *Agave tequilana* Weber var. Azul in Nayarit

Authors/Autores: Loza-Figueroa, P.G., Arrieta-Ramos, B.G., Robles-Bermúdez, A., Peña-Sandoval, G.R., Aguilar-Castillo, J.A., Ruelas-Hernández, P.G., Domínguez-Monge, S., Mendoza-García, J.D.

ID: e1940

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1940>

Received/Fecha de recepción: April 29th 2025

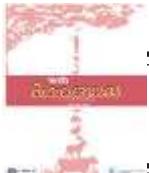
Accepted /Fecha de aceptación: November 11th 2025

Available online/Fecha de publicación: December 09th 2025

Please cite this article as/Como citar este artículo: Loza-Figueroa, P.G., Arrieta-Ramos, B.G., Robles-Bermúdez, A., Peña-Sandoval, G.R., Aguilar-Castillo, J.A., Ruelas-Hernández, P.G., Domínguez-Monge, S., Mendoza-García, J.D. (2025). Bacteria associated with soft rot of *Agave tequilana* Weber var. Azul in Nayarit. *Revista Bio Ciencias*, 13, e1940. <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1940>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.



Bacterias asociadas a la pudrición blanda del cogollo del Agave tequilana Weber var. Azul en Nayarit

Bacteria associated with soft rot of Agave tequilana Weber var. Azul in Nayarit

Bacterias en la pudrición blanda del cogollo de Agave tequilana en Nayarit/

Bacteria in the soft rot of Agave tequilana in Nayarit

Loza-Figueroa, P.G.¹ (✉), Arrieta-Ramos, B.G.^{1*} (✉), Robles-Bermúdez, A.¹ (✉) Peña-Sandoval, G.R.¹ (✉) Aguilar-Castillo, J.A.¹ (✉), Ruelas-Hernández, P.G.¹ (✉), Domínguez-Monge, S.² (✉) Mendoza-García, J.D.³ (✉)

¹Universidad Autónoma de Nayarit: Unidad académica de agricultura. Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuario. Carretera Tepic-Compostela Km.9. C.P. 63155. Xalisco, Nayarit, México.

²INIFAP - Campo Experimental Ixtacuaco. Km. 4.5. Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Tlapacoyan, Veracruz, México, C.P. 93655.

³Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Km 38.5. Carretera México-Texcoco. C.P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

*Corresponding Author:

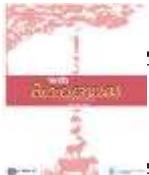
Beatriz Guillermínna Arrieta-Ramos. Unidad académica de agricultura. Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela Km. 9, C.P 63155 Xalisco, Nayarit, México. Teléfono: +52 (311) 2111163. E-mail: beatriz.arrieta@uan.edu.mx

ABSTRACT

The blue agave is a species of significant economic, social, and cultural importance to Mexico. Unfortunately, it is susceptible to serious diseases, such as soft rot. Approximately 11 different bacterial species have been reported as causal agents, and it is believed to be a syndrome. In the Nayarit state, no previous records exist regarding the specific microorganism responsible for this condition. In the present study, samples were collected from two municipalities in Nayarit with confirmed disease incidence, yielding a total of 35 bacterial isolates. Three pathogenicity tests were performed: in vitro on potato slices, in vitro on agave leaf fragments, and in vivo on agave plants. Bacterial isolates that induced disease symptoms in at least one of the assays were subjected to molecular analysis of the 16S rRNA gene. Results identified *Pectobacterium aroidearum* as the causative agent in all three tests. Other identified bacteria included *Enterobacter hormaechei* and *Pseudomonas mendocina*. This is the first study to report *Pectobacterium aroidearum* as a causal agent of soft rot in agave in Mexico.

Palabras Clave:

Pectobacterium aroidearum, 16S rDNA gene, bacteria, identification.



RESUMEN

El agave tequilero es una especie de gran importancia económica, social y cultural para el país, desafortunadamente, se enfrenta a importantes enfermedades, como la pudrición blanda del cogollo. Se reportan alrededor de 11 especies diferentes de bacterias como agente causal, y se cree que se trata de un síndrome. En Nayarit no existen reportes sobre el microorganismo causante de la enfermedad. En el presente trabajo se recolectaron muestras de dos municipios de Nayarit con incidencia de dicha enfermedad, de las cuales se obtuvieron 35 aislados. Se realizaron tres pruebas de patogenicidad: *in vitro* en papa, *in vitro* en fragmentos de hoja de agave, e *in vivo* en plantas de agave. A las bacterias que provocaron los signos de la enfermedad al menos en una de las pruebas, se les realizó análisis molecular del gen 16S, los resultados identificaron a *Pectobacterium aroidearum*, que causó enfermedad en las tres pruebas realizadas; las otras bacterias identificadas fueron *Enterobacter hormaechei* y *Pseudomonas mendocina*. Este sería el primer trabajo que reporta a *Pectobacterium aroidearum* como causante de la pudrición blanda del cogollo del agave en México.

Palabras Clave:

Pectobacterium aroidearum, 16S rDNA gene, bacteria, identificación.

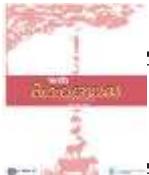
Introducción

El agave tequilero (*Agave tequilana* Weber cultivar Azul) es una especie mexicana, cultivada en la región reconocida con la Denominación de Origen del Tequila que comprende Jalisco y algunos municipios de los estados de Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas (CRT, 2025). El agave azul es la principal materia prima utilizada para elaborar el tequila (SE, 2006) y, tiene alta importancia económica, social y cultural para el país (González *et al.*, 2007), esto, debido a la generación de empleos tanto en campo como en la industria (Ángeles-Espino *et al.*, 2013). Además de generar divisas, ya que el tequila ocupa el segundo lugar por el valor de las exportaciones de productos agroalimentarios en México con la captación de 4 085 millones de dólares (MDD) en 2023 (SIAP, 2023).

Debido a que el agave, almacena en la piña alta concentración de azúcares, se favorece la proliferación de microorganismos. En *A. tequilana*, se encontró que la población de bacterias endófitas presentes en el tejido foliar era de tres millones de unidades formadoras de colonias por gramo UFC g-1 de tejido vegetal fresco. Los microorganismos identificados a partir del gen 16S rDNA mostró entre 99 y 100 % de homología con *Acinetobacter sp.*, *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter hormaechei*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus casseliflavus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Gluconobacter oxydans*. Estos microorganismos fueron considerados como promotores del crecimiento vegetal (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2014).

Así, las condiciones internas de la planta, favorecen la proliferación de diversos microorganismos, entre ellos algunos patógenos (Fucikovsky, 2004) que representan uno de los principales factores que afectan negativamente la productividad del agave. Los patógenos que atacan este cultivo son: *Fusarium oxysporum* y *F. moniliforme*, especies de hongos que colonizan y bloquean los conductos vasculares de las plantas y provocan marchitamiento de las hojas, amarillamiento y muerte de la planta, enfermedad conocida como marchitez del agave; *Cercospora agavicola*, hongo que se dispersa en las pencas y causa la mancha gris; y la bacteria *Pectobacterium carotovora*, considerada muy agresiva y que causa muerte de las pencas debido a que provoca la pudrición blanda del cogollo. Debido a su relevancia, estas enfermedades están reguladas por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), que busca reducir los niveles de infección en los estados incluidos en la Zona con Denominación de Origen del Tequila (SENASICA, 2020).

Los síntomas característicos de la pudrición blanda del cogollo, se manifiestan como daños necróticos y acuosos que pueden comenzar en las espinas apicales o laterales, que avanzan hacia la base del cogollo y al interior de la penca, el cogollo se torna de color morado oscuro y puede



desprenderse fácilmente (Valenzuela, 2003). Enseguida desciende hasta alcanzar la piña con una pudrición maloliente en su interior, para luego dejarla hueca por desintegración del tejido hasta llegar a la muerte (Rubio-Cortes, 2007).

En el caso de esta enfermedad SENASICA (2020) indica que se aislaron diferentes microorganismos como agentes causales. Tres diferentes investigaciones determinaron que se trataba del mismo microorganismo: *Erwinia spp.*, después *Pectobacterium (Erwinia) sp.* del grupo carotovora, y posteriormente *Pectobacterium carotovorum*. En 2004, Jiménez-Hidalgo y colaboradores, aislaron tres microorganismos *Erwinia cacticida*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas sp.* y propusieron que la sintomatología de la pudrición blanda era causada por diferentes microorganismos. En 2011 se reportó de nuevo *Erwinia sp.* como agente causal (Martínez-Ramírez, 2011). Para 2012 se reportó a *Bacillus pumilis*. En 2014 se reportaron otros cuatro microorganismos asociados a la enfermedad: *Pantoea sp.*, *Bacillus sp.*, *Arthrobacter sp.* y *Streptomyces sp.* En 2017 de nuevo se reportó *Pectobacterium carotovorum*, en este caso, *subs. Atroseptica* como causante de la enfermedad. Sin embargo, el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF, 2017) confirmó que más de un patógeno podría estar involucrado y que estos microorganismos podrían interactuar entre sí para causar el síndrome de la pudrición blanda del cogollo del agave.

Por ello, el objetivo de la presente investigación fue identificar el microorganismo causante de la pudrición blanda del cogollo en aislamientos obtenidos en Nayarit, México.

Material y Métodos

Material Vegetal

Se recolectaron hojas de plantas de entre dos y cuatro años, que mostraban signos y síntomas característicos de la pudrición blanda del cogollo. Se tomaron cuatro muestras de dos localidades, Miguel Hidalgo, municipio de Santa María del Oro, y Lázaro Cárdenas, Ixtlán del Río.

Aislamiento y preservación

De cada hoja, se sustrajeron tres discos de 1.0 cm de diámetro, que contenía tejido enfermo y tejido aparentemente sano. Las muestras se lavaron con agua corriente, enseguida se desinfectaron, primero, con hipoclorito de sodio al 2 %, que se enjuagó tres veces con agua destilada; enseguida se desinfectaron con alcohol al 70 % y se enjuagaron de nuevo tres veces con agua destilada estéril. Los discos se sembraron en placas con agar Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 28 °C por 24 horas. Todos los crecimientos obtenidos se resembraron en placas de LB, hasta obtener cultivos axénicos. En total se obtuvieron 35 aislados, los cuales fueron preservados en una solución de glicerol al 80 % y colocados en ultra-congelación a -80 °C.

Evaluación de patogenicidad de los aislados

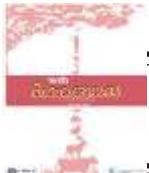
Se prepararon suspensiones a partir de los 35 cultivos axénicos. El pre inóculo se cultivó en caldo LB, se incubó a 28 °C, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 500 nm, para lo cual, se realizó la curva de crecimiento de cada aislado. A partir del cultivo en LB, se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril al 0.85 % hasta llegar a la concentración de 1.5 x 10⁻⁸ UFC mL⁻¹ (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004).

Pruebas de patogenicidad

Para las tres pruebas de patogenicidad se utilizó una suspensión bacteriana de 1.5 x 10⁻⁸ unidades formadoras de colonias por mL UFCmL⁻¹ (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004). Para las pruebas se utilizaron tres repeticiones por cada aislado.

Prueba de patogenicidad in vitro en papa.

De acuerdo a la metodología propuesta por Duarte *et al.* (2004). Se utilizaron tubérculos de papa, previamente desinfectados sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por un minuto, enseguida se lavaron tres veces con agua destilada; posteriormente se sumergieron en una solución de etanol al 70 % y se enjuagaron con agua destilada estéril. Se cortaron rebanadas de 0.5 cm de grosor, y se colocaron en cajas Petri sobre papel filtro humedecido



con agua destilada estéril. Se realizaron tres heridas sobre la rebanada de papa, en forma de rectángulos de 5 mm de profundidad y 10 mm de largo. Se realizó la inoculación a través de estas heridas. Como control negativo se aplicó solución salina estéril. Los tubérculos se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación (Corzo-López & Quiñones-Pantoja, 2017; Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004).

Pruebas de patogenicidad *in vitro* en fragmentos de agave.

Se utilizó la metodología propuesta por Duarte *et al.* (2004) modificada, ya que se utilizaron fragmentos de hoja de agave sana para la prueba. Las hojas se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por un min, enseguida se enjuagaron con agua destilada estéril y se sumergieron en una solución de etanol al 70 % enseguida se enjuagaron con agua destilada estéril. Se cortaron fragmentos de hoja de 1 cm x 5 cm y se colocaron tres segmentos en cada caja Petri sobre una cama de algodón humedecido con agua destilada estéril. Se realizó la inoculación con los aislados y se evaluaron las hojas a las 24, 48 y 72 h después de la inoculación (Corzo-López & Quiñones-Pantoja, 2017; Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004).

Prueba de patogenicidad *in vivo* en plantas de agave.

Para esta prueba se utilizaron como inóculos sólo los aislados que provocaron enfermedad en la prueba de patogenicidad en papa o en agave. Se utilizaron plantas sanas de agave tequilero, de dos años que se establecieron en bolsas de 40 x 40 cm con tierra regional desinfectada con sales cuaternarias de amonio (Mezo, 2018). Para la prueba, se utilizaron tres repeticiones que consistieron en tres plantas por aislado y tres como control negativo, al cual se le inoculó solución salina estéril. La inoculación se realizó mediante inyecciones subcutáneas, primero, se desinfectó el área con etanol al 70 % y se injectó con jeringa hipodérmica 1 ml por planta de la suspensión bacteriana (Mezo, 2018; Navarro, 2018). Despues, para inducir estrés, las plantas se colocaron en condiciones de encharcamiento para lo cual se puso una cubierta plástica bajo las bolsas sobre el cual se colocó un espejo de agua de 10 cm.

Identificación bioquímica y fisiológica

A los aislados que ocasionaron enfermedad en las pruebas de patogenicidad *in vitro* en papa, se les realizaron pruebas de crecimiento en medio de cultivo de Caseína peptona-glucosa, Tinción de Gram, crecimiento en NaCl al 5 %, crecimiento a 37 °C, crecimiento anaerobio, crecimiento en glucosa al 10 % y prueba de producción de ácido sulfídrico (H₂S) (Schaad, 2001).

Identificación molecular de los aislados bacterianos

La identificación se realizó únicamente en los aislados que produjeron la enfermedad característica de la pudrición del cogollo en alguna de las pruebas de patogenicidad. Para lo cual se realizó la extracción de ADN, de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial ZYMO Research (Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit). Enseguida se cuantificó el ADN extraído en espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop (Thermo Scientific). Por último, para la amplificación, se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16s región V3-V4, se utilizaron cebadores universales para enterobacterias (Widmer *et al.*, 1998) fD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and rD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) (Bastos-Silva *et al.*, 2009). La longitud aproximada del fragmento de entre 500 – 1500 pb (Apolinario, 2018). Las mezclas de reacción y la reacción de PCR se prepararon de acuerdo a Bastos-Silva *et al.*, (2009): 50 µl de Máster mix consistieron en 0.2 mM de cada dNTP, 10 pmol/µl de cada cebador, 1 U de ADN Taq polimerasa (Jena Bioscience) y 50 ng de ADN bacteriano. Las condiciones del ciclo térmico consistieron en un ciclo a 94 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de 50 s de desnaturalización a 92 °C; 50 s de recocido a 57 °C; 1 min de extensión a 72 °C y, por último, un paso de extensión final de 7 min a 72 °C. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador de gradiente marca Biorad 100. El producto de PCR fue observado en gel de electroforesis de agarosa al 1 % y buffer TBE 1x, con bromuro de etidio en transiluminador UV Thermo Scientific.

Los productos de PCR fueron enviados a la Unidad de Biología Molecular de la UNAM para su secuenciación. Para realizar la búsqueda de la similitud de las secuencias, se utilizó la base de datos de BLAST (National Center for Biotechnology Information NCBI).

. Postulados de Koch

A partir de la prueba de patogenicidad *in vitro* en fragmentos de agave, se realizó reaislamiento del tejido afectado por el aislado tres, que fue consistente en causar enfermedad en las tres pruebas de patogenicidad. Se preservó con glicerol al 80 % y se colocó en ultra-congelación a -80 °C. También, se realizó el procedimiento antes descrito para su secuenciación. Este aislado se denominó K3.

Resultados and Discusión

Como resultado de la siembra de las muestras obtenidas en campo, se obtuvieron 35 aislados; de los cuales sólo se consideraron los que produjeron enfermedad al menos en una de las pruebas de patogenicidad. La ubicación geográfica de los aislados se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Ubicación geográfica de los aislados obtenidos de las muestras tomadas de plantas con signos y síntomas de pudrición blanda.

Aislado	Localidad	Municipio	Coordenadas	
			Latitud N	Longitud W
2	Sta. María del Oro	Miguel Hidalgo	21°28'22.9"	104°40'15.3"
3	Sta. María del Oro	Miguel Hidalgo	21°28'36.4"	104°39'41.1"
4	Ixtlán del Río	Lázaro Cárdenas	21°02'04.3"	104°20'19.3"
8	Ixtlán del Río	Mexpan	21°02'09.3"	104°25'45.9"
9	Ixtlán del Río	Mexpan	21°02'09.3"	104°25'45.9"
10	Sta. María del Oro	Miguel Hidalgo	21°28'36.4"	104°39'41.1"

Evaluación de la patogenicidad de los aislados

Al realizar la prueba de patogenicidad *in vitro* en papa, seis aislados el 2, 3, 8, 9 y 10 provocaron signos y síntomas (Tabla 2).

Tabla 2. Resultado de las pruebas de patogenicidad de los aislados realizadas *in vitro* en papa y en segmentos de hoja de agave, e *in vivo* en plantas establecidas en campo.

Aislado	Pruebas de fitopatogenicidad		
	<i>In vitro</i> en papa	<i>In vitro</i> en agave	<i>In vivo</i>
2	+	-	-
3	+	+	+
4	-	+	-
8	+	-	-
9	+	+	+
10	+	-	-

+ Manifestó signos y síntomas; - No manifestó signos, tampoco síntomas.

Los aislados 2, 3 y 8 comenzaron a provocar signos y síntomas 48 h después de inoculados, mientras que los aislados 9 y 10 a las 72 h. En general, se presentaron exudados transparentes, bordes oscuros y pudrición acuosa en la zona inoculada de la papa, en comparación con el testigo, donde las heridas cicatrizaron sin presentar signos o síntomas (Figura 1).

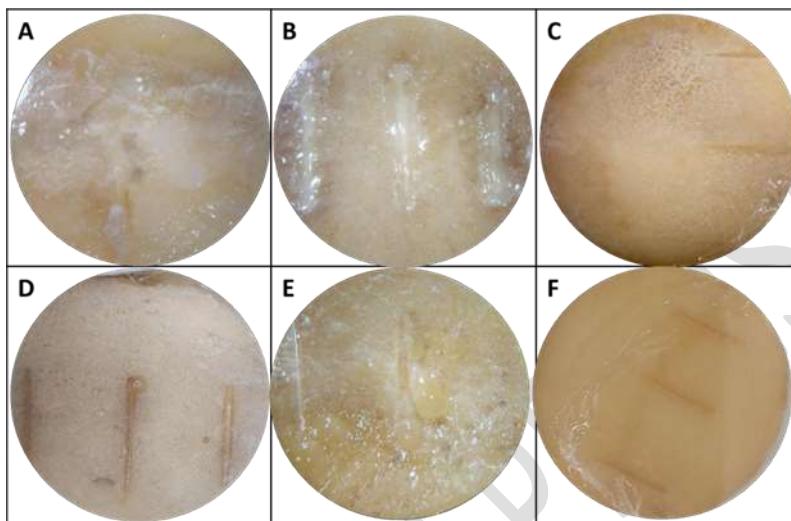


Figura 1. Signos y síntomas producidos por los aislados en las pruebas de patogenicidad *in vitro* en segmentos de papa. A) aislado 2, B) aislado 3, C) aislado 8, D) aislado 9, E) aislado 10 y F) Testigo.

En contraste al realizar la prueba de patogenicidad *in vitro* en fragmentos de agave, sólo tres aislados, el 3, 4 y 9 presentaron respuesta (Tabla 2). Los aislados 3, y 4 comenzaron a provocar síntomas 24 h después de la inoculación en la zona infectada, los cuales consistieron en oscurecimiento en los bordes de las heridas. A partir de las 48 h, se mostraron signos como exudados, pudrición acuosa y manchas oscuras (Figura 2).



Figura 2. Signos y síntomas producidos por los aislados en la prueba de patogenicidad *in vitro* en hojas de agave. A) aislado 3, B) aislado 4 y C) Testigo, en la prueba de patogenicidad *in vitro* en fragmentos de agave.

Al realizar la prueba de patogenicidad *in vivo*, únicamente se presentaron signos y síntomas en las plantas de agave inoculadas con los aislados 3 y 9 (Tabla 2). El aislado 3 comenzó a provocar síntomas como oscurecimiento en los bordes del orificio, 29 días después de la inoculación; mientras que el aislado 9, comenzó a presentarlos a partir del día 34. Ambos aislados provocaron pudrición

acuosa y exudados (Figura 2). En cuanto al testigo, cicatrizó sin mostrar algún tipo de síntoma, como se observa en la figura 2.

Identificación bioquímica y fisiológica

Las pruebas bioquímicas y fisiológicas se realizaron además de las moleculares debido a la variante que existe entre individuos, de acuerdo a su metabolismo aun cuando pertenece a la misma especie (Fonseca, 2014). Los resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de los aislados se muestran en el Tabla 3.

Tabla 3. Resultado de las pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a los aislados que causaron signos y síntomas al menos en una de las pruebas de patogenicidad.

Aislado	pH	Gram tinción	Crecimiento		Anaeróbico	Glucosa 10 %	H ₂ S producción
			NaCl 5 %	at 37 °C			
2	M	-	+	-	+	+	+
3	A	-	+	+	-	-	-
4	A	-	+	+	+	+	+
8	M	-	+	+	+	+	-
9	A	-	+	+	+	+	-
10	M	-	-	-	-	-	-

pH: M = pH ≥ 7.4, A = pH ≤ 5.5.

Identificación molecular de los aislados bacterianos

Los iniciadores rD1 y fD1 que fueron utilizados, pudieron amplificar todas las muestras de los aislados, a excepción del control negativo, dónde no se utilizó ADN. En general, todos los aislados tuvieron un peso molecular aproximado de 1000 – 1200 pb como se muestra en la figura 3.

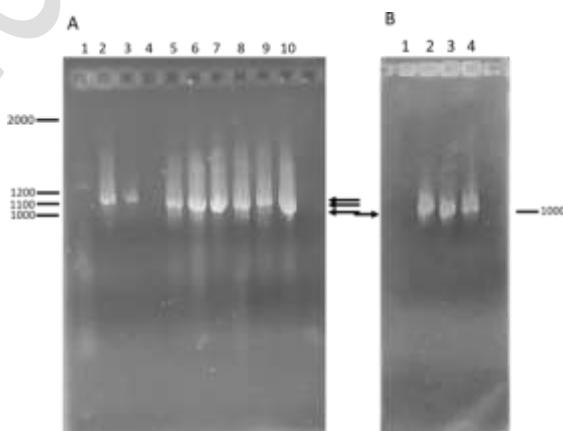


Figura 3. Amplificación por PCR de los aislados. A), carril 1, marcador molecular marca sigma 50 pb; carril 2, aislado 2; carril 5, aislado 8; carril 6, aislado 10 control positivo; carril 8, aislado 9; carril 11, control negativo. B) carril 1, marcador molecular; carril 2, aislado 10; carril 3, aislado 4; carril 4, aislado 3. Las flechas indican el tamaño de los fragmentos.



Los resultados obtenidos del análisis BLAST de los aislados se muestran en el Tabla 4.

Tabla 4. Resultado de análisis BLAST de las secuencias 16S rRNA obtenidas de los aislados evaluados

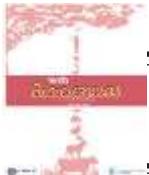
Aislado	Microorganismo	Porcentaje de similitud
2	<i>Enterobacter asburiae</i>	99.90 %
3	<i>Pectobacterium aroidearum</i>	99.71 %
4	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99.00 %
8	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99.61 %
9	<i>Pectobacterium aroidearum</i>	99.62 %
10	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99.90 %

Sin embargo, el aislado 3 manifestó síntomas en papa y en hoja de agave; e *in vivo* en agave 24 horas antes que el 9 en las pruebas de patogenicidad *in vitro* y con diferencia de cinco días en la prueba de patogenicidad *in vivo* (Tabla 2).

Basados en la secuencia de un fragmento de ADN ribosomal estos aislados presentaron 99.71 y 99.62 % de similitud con *Pectobacterium aroidearum*. Esta especie agrupa a bacterias que no producen gas (Nabhan *et al.*, 2013). De la misma forma en las pruebas bioquímicas y fisiológicas, estos aislados no produjeron H₂S.

En las primeras investigaciones sobre pudrición blanda en *Agave tequilana* var. azul, que no consideraban los análisis moleculares, se señaló a *Erwinia* y a *Pectobacterium carotovorum* o *P. carotovorum* subsp *carotovorum* como el agente causal de la pudrición blanda en agave (SENASICA, 2020). Esto quizá esté relacionado con el hecho de que, hasta hace algunos años, *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* servía para agrupar aislados que diferían de otros aislados pectobacteriales. Fue hasta 2013 cuando a partir de análisis filogenéticos moleculares, se propuso a *Pectobacterium aroidearum* como una nueva especie para un grupo de patógenos que causan pudrición blanda (Nabhan *et al.*, 2013). Desde entonces, se reportó por primera vez causando pudrición blanda en calabaza (*Cucurbita pepo*) (Moraes *et al.*, 2016) y en frutos de chile (*Capsicum annuum*) en Brasil (Moraes *et al.*, 2020); en alcatraz (Li *et al.*, 2022) y en durazno Olecranon Honey (*Prunus persica*) en China (Liang *et al.*, 2022); en alocasia (*Alocasia amazonica*) en Polonia (Mikiciński *et al.*, 2023). Generalmente se considera una especie con preferencia por monocotiledóneas, pero causa pudriciones blandas en especies dicotiledóneas.

La secuencia del ADN ribosomal 16S del aislado 2 mostró un 99.9 % de similitud con *Enterobacter asburiae*. En las pruebas *in vitro*, este aislado sólo mostró signos y síntomas en papa. Sin embargo, en las pruebas bioquímicas presentó crecimiento en condiciones anaerobias y producción de ácido sulfídrico (H₂S). El género *Enterobacter* es anaerobio facultativo y no produce H₂S (Jha *et al.*, 2011). Sin embargo, se observó que en el caso de *Escherichia coli* se presentan cepas atípicas constituidas por variantes productoras de H₂S que causan una amplia gama de enfermedades en humanos y animales (Mazumder *et al.*, 2023). Son escasos los reportes de este microorganismo como causa de enfermedad en plantas; apenas en 2020 se realizó el primer reporte donde se identificó que provoca pudrición del tubérculo de ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) en China (Zhang *et al.*, 2020); en 2021 el primer reporte donde se identificó como agente causal del tizón bacteriano en arroz, en algunos casos acompañado de *Pantoea ananatis* en China (Xue *et al.*,



2021); y en 2023, como causa de enfermedad en la raíz tuberosa de rábano (*Raphanus sativus L.*) (Wang *et al.*, 2023).

En contraste, *Enterobacter asburiae* raza RS83 fue estudiada por su capacidad para promover el crecimiento vegetal (Jetiyanon, 2015). Además, se encontró que *Enterobacter asburiae* JAS5 posee potencial para la bioremediación de campos agrícolas contaminados con plaguicidas (Abraham & Silambarasan, 2015).

Los aislados 4, 8 presentaron 99.00 % y 99.61 % de similitud con *Enterobacter hormaechei*. En las pruebas bioquímicas, el aislado 4 presenta crecimiento positivo a 37 °C, crecimiento en condiciones anaerobias y producción de ácido sulfídrico. Aunque la temperatura óptima de crecimiento de *Enterobacter* es de 30 °C la mayoría de las cepas clínicas crecen a 37 °C (Grimont & Grimont, 2015).

Por otro lado, el aislado 8 comparte estas características, excepto que no produce ácido sulfídrico. Existen también diferencias entre estos dos aislados en las respuestas en las pruebas de patogenicidad *in vitro*. El aislado 8 mostró signos y síntomas únicamente en papa, mientras que el aislado 4 presentó signos y síntomas en hojas de agave, aunque no en la prueba *in vivo* (Tabla 2). La susceptibilidad a bacterias pectolíticas depende de diversos factores como la concentración del inóculo, la temperatura y la variedad del cultivo, entre otros (Franco *et al.*, 2007); en este caso, es posible que uno de los factores no se presentó para la manifestación del síntoma. Debido a que los microorganismos pueden estar presentes en las plantas sin causar enfermedad, y las plantas pueden permanecer asintomáticas durante todo el ciclo de desarrollo, y actuar como reservorio del patógeno (Marín-Ortiz *et al.*, 2018). Sin embargo, se requiere mayor investigación. Martínez-Rodríguez *et al.*, (2014) encontraron esta bacteria en hojas de plantas de *Agave tequilana* y consideraron que era una bacteria que podía promover el crecimiento debido a las propiedades de fijación de nitrógeno, producción de ácido indol acético y solubilización de fosfatos. Aunque *Enterobacter hormaechei* pertenece al complejo “*Enterobacter cloacae*”, que incluye seis especies: *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* y *E. nimipressuralis* que generalmente se aislaron en enfermedades hospitalarias (O’Hara *et al.*, 1989), en 2019, en Malasia se realizó el primer reporte de *E. hormaechei* como agente causal de la pudrición del tallo de Pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) y, en el mismo año, en el continente americano en Costa Rica (Retana *et al.*, 2019). Es importante notar que agave y pitahaya tienen en común que son plantas suculentas.

El aislado 10 presentó 99.90 % de similitud con *Pseudomonas mendocina*. Jiménez-Hidalgo *et al.* (2004), realizaron una investigación donde caracterizaron los aislados a partir de pruebas moleculares, bioquímicas y de ácidos grasos. Las pruebas moleculares identificaron a *Pseudomonas* sp. aunque tuvo 97 % de homología con *P. mendocina* y *P. alcalophyla*. Los microorganismos identificados en esta investigación corresponden a: *E. asburiae*, *P. aroidearum*, *E. hormaechei* y *P. mendocina*. De los aislados evaluados, *E. asburiae* fue el único que reprodujo consistentemente la enfermedad en las tres pruebas, por lo que se considera el más virulento.

Estos resultados coinciden en parte con lo reportado por Jiménez-Hidalgo *et al.* (2004), quienes identificaron tres especies asociadas a la pudrición blanda del agave: *Erwinia cacticida*, *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas* sp., y señalaron que esta enfermedad puede ser causada por más de una especie bacteriana. No obstante, las especies identificadas en el presente estudio difieren de las encontradas por dichos autores.

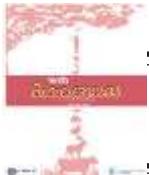
Conclusiones

Con base en la diversidad bacteriana identificada y en las pruebas realizadas, se concluye que el síndrome de pudrición blanda del agave está asociado a un complejo de patógenos. Las bacterias detectadas fueron *Enterobacter asburiae*, *Pectobacterium aroidearum*, *Enterobacter hormaechei* y *Pseudomonas mendocina*. Este estudio constituye el primer reporte que identifica a estas especies como agentes causales de la pudrición blanda del cogollo en aislamientos obtenidos en Nayarit, México.

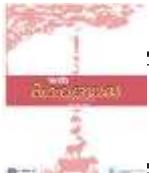


References

- Abraham, J., & Silambarasan, S. (2015). Plant growth promoting bacteria *Enterobacter asburiae* JAS5 and *Enterobacter cloacae* JAS7 in mineralization of endosulfan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 3336–3348. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1504-7>
- Ángeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., Paredes-Gutiérrez, L., & Hurtado-De la Peña, S. (2013). Determinación de la dosis letal (DL50) con Co60 en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(4), 381-386. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400003&lng=es&tlang=es.
- Apolinario C., G. G. (2018). Identificación bioquímica y molecular de bacterias patógenas aisladas de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas en Chirguá, Edo. Carabobo, Venezuela. [Tesis de Lic. Universidad Central de Venezuela]. <https://saber.ucv.ve/bitstream/10872/19685/1/TEG%20Genesis%20Apolinario.pdf>
- Bastos-Silva, M. L. R., Pereira-Lyra, M. C. C., Oliveira-Paula, J., Almeida-Burity, H., & Campos-Takaki, G. M. (2009). Microbial diversity in *Chromobacterium violaceum* determined by 16S rRNA gene analysis. *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 300-303. https://doi.org/10.1142/9789812837554_0063
- Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria [CNRF]. (2017). Pudrición blanda del cogollo del agave *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Waldee, 1975. Ficha técnica. SAGARPA-SENASICA. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/244028/Ficha_Tcnica_Pectobacterium_carotovorum_en_agave_Versi_n_FINAL.pdf
- Corzo-López, M., & Quiñones-Pantoja, M. L. (2017). Identificación bioquímica, fisiológica y patogénica de aislados bacterianos asociados a la pudrición blanda y pierna negra en papa. *Revista de Protección Vegetal*, 32(3), 00. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000300005
- Consejo Regulador del tequila [CRT]. (2025, diciembre 03) Denominación de Origen. <https://www.crt.org.mx/tequila-denominacion-de-origen/>
- Duarte, V., De Boer, S. H., Ward, L. J., & De Oliveira, A. M. R. (2004). Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 535–545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x>
- Fonseca, I. (2014). Identificación bioquímica y molecular de *Burkholderia gladioli* y análisis de su interacción con plantas de *Solanum tuberosum*. [Tesis de doctorado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela]. <https://saber.ucv.ve/bitstream/10872/19685/1/TEG%20Genesis%20Apolinario.pdf>
- Franco, C., Y., Stefanova, N., M., & Coronado,I., M. F. (2007). Patogenicidad y virulencia de cepas de *Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*, 11(1), 15-18. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116144003.pdf>
- Fucikovsky, Z. L. (2004). Agave tequilana Weber var. Azul y sus principales problemas fitosanitarios. In Avances de la investigación en el agave tequilero. Pp. 148-159. Consejo Regulador del Tequila A. C.
- González H.H., Del Real, J. I., & Solís, A., J. F. (2007) Manejo de plagas del agave tequilero. Ed. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza, S.A de C.V.
- Grimont, P. A. & Grimont, F. (2015). Enterobacter. In Whitman, W.B. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.qbm01145>
- Jetiyanon, K. (2015). Multiple mechanisms of *Enterobacter asburiae* strain RS83 for plant growth enhancement. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 37(1). <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2292-RE>
- Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., & Saraf, M. (2011). Enterobacter: role in plant growth promotion. In: Maheshwari, D. Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_8



- Jiménez-Hidalgo, I., Virgen-Calleros, G., Martínez-de la Vega, O., Vandemark, G. & Olalde-Portugal, V. (2004). Identification and characterization of bacteria causing soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 317-331. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000019791.81935.6d>
- Li, L., Yuan, L., Zhao, Y., Shi, Y., Chai, A., Xie, X., & Li, B. (2022). Emergence of bacterial soft rot in calla lily caused by *Pectobacterium aroidearum* in China. *Crop Protection*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105854>
- Liang, Z., Liu, H., Xu, Z., & Zhang, Lian-Hui. (2022). First report of *Pectobacterium aroidearum* causing soft rot in Olecranon Honey Peach (*Prunus persica*) in China. *Plant Disease*, 106(6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2238-PDN>
- Marín-Ortiz, J. C., Hoyos-Carvajal, L. M., & Botero-Fernández, V. (2018). Detección de plantas asintomáticas de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con *Fusarium oxysporum* usando espectroscopía de reflectancia VIS. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2), 436-446. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-21732018000200436
- Martínez-Ramírez, J. L. (2011). Evolución histórica y situación actual de la pudrición del cogollo en el cultivo del agave azul tequilero. In Briceño Félix, G. A., Hurtado de la Peña, S., Díaz Mederos, P. & Pérez-Mejía, F. A. 1er Foro de discusión fitosanitaria en el cultivo del agave azul tequilero, Integrando esfuerzos para impulsar bienestar en el sector. Pp. 35-44.
- Martínez-Rodríguez, J. C., De la Mora-Amutio, M., Plascencia-Correa, L. A., Audelo-Regalado, E., Guardado, F. R., Hernández-Sánchez, E. Peña-Ramírez, Y. J., Escalante, A., Beltrán-García, M. J., & Ogura, T. (2014) Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 1333-1339. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400025>
- Mazumder, R., Hussain, A., Rahman, M. M., Phelan, J. E., Campino, S., Abdullah, A., Clark Taane, G., & Mondal, D. (2023). Genomic and functional portrait of multidrug-resistant, hydrogen sulfide (H₂S)-producing variants of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1206757>
- Mezo, V. M. (2018). Identificación del agente causal del anillo rojo del agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul). [Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados]. http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/2297/Mezo_Villalobos_MMC_Fitopatologia_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Mikiciński, A., Warabieda, M., Nowak, J. S., & Puławska, J. (2023). First report on *Pectobacterium aroidearum*, a new pathogen causing soft rot on alocasia (*Alocasia amazonica*) in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 105, 1169-1170. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01369-2>
- Moraes, A. J. G., Silveira, E. B., Mariano, R. L. R., Silva, A. M. F., Lima, N. B., Peixoto, A. R., & Gama, M. A. S. (2016). First Report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing soft rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. *Plant Disease*, 101. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1168-PDN>
- Moraes, J. G., Baia, A. D. B., Souza, E. B., Peixoto, A. R., Barroso, K. A., Almeida, C. O., Balbino, V. Q., Silva Jr., W.J., & Gama, M. A. S. (2020). First report of *Pectobacterium aroidearum* causing soft rot of pepper (*Capsicum annuum*) fruits in Brazil. *Plant Disease*, 104(11), 3054. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0403-PDN>
- Nabhan, S., De Boer, S. H., Maiss, E., & Wydra, K. (2013). *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(7), 2520-2525. <https://doi.org/10.1099/ijsm.0.046011-0>
- Navarro López, D. E. (2018). Evaluación de la inducción de defensa sistémica asociada al ácido salicílico en *Agave tequilana* Weber var. Azul durante la interacción con *Fusarium oxysporum*. [Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco A.C]. <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/632/1/Diego%20Eloyr%20Navarro%20L%20C3%23B3pez.pdf>
- O'Hara, C., Steigerwal, A., Hill, B., Farmer, J., Fanning, G., & Brenner, D. (1989). *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group



75. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(9), 2046-2049. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.9.2046-2049.1989>

Retana S., K., Castro Z., O., Blanco M., M., & Quesada G., A. (2019). Etiología de las pudriciones en el tallo de *Hylocereus costaricensis*, provocadas por *Enterobacter hormaechei*, en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 43(2), 61-73. <https://doi.org/10.15517/rac.v43i2.37949>

Rubio-Cortes, R. (2007). Enfermedades del cultivo de agave. In Rulfo-Vilchis, O., Pérez-Domínguez, J. F., del Real-Laborde, J. I. & Byerly-Murphy, K. F. Conocimiento y prácticas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. (pp. 169–195). INIFAP.

Schaad, N. W., Jones, J., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>

Secretaría de Economía [SE]. (2006). NOM-006-SCFI-2005. Que establece las características y especificaciones de todos los integrantes de la cadena productiva, industrial y comercial del Tequila. Tequila especificaciones. México: SE. <https://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SE/Normas/Oficiales/NOM-006-SCFI-2005.pdf>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA]. (2020, febrero 10). Plagas reglamentadas del agave. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/plagas-reglamentadas-del-agave-110851>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2023). Panorama Agroalimentario. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. México. https://nube.agricultura.gob.mx/panorama_siap/

Valenzuela Z., A. G. (2003). El Agave Tequilero. Cultivo e Industria de México. Ed. Mundiprensa.

Wang, R., Wang, X., Liu, Y., Chen, P., Wang, Y., Wang, W., Zhang, Y., Gu, R., & Zhang, Y. (2023). First report of radish tubers rot caused by *Enterobacter asburiae* in China. *Plant Disease*, 107(9): 2839. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-22-2650-PDN>

Widmer, G. (1998). Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. *Advances in Parasitology*, 40, 223-239. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60122-0](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60122-0)

Xue, Y., Hu, M., Chen, S., Hu, A., Li, S., Han, H., Lu, G., Zeg, L., & Zhou, J. (2021). *Enterobacter asburiae* and *Pantoea ananatis* causing rice bacterial blight in China. *Plant Disease*, 105(8), 2078-2088. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2292-RE>

Zhang, X., Zhao, N., Yang, J., Zhang, W., Yang, Y., Li, L., Yan, H., & Liu, D. (2020). Ginger tuber rot caused by *Enterobacter asburiae* in China. *Plant Disease*, 104(11). <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0645-PDN>