

Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de manchas foliares del filodendro (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium*) en Cuautla, Morelos, México

***Xanthomonas campestris* pv. *campestris* responsible of leaf spots in Philodendron (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium*) in Cuautla, Morelos, Mexico**

Sandra Lourdes Moya-Hernández¹, María de Lourdes Rodríguez-Mejía^{2§} y Mario Espinosa Mendoza³

¹Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria Laboratorio de Bacteriología, Tel: 5090300 Ext: 51333, Guillermo Pérez Valenzuela Núm. 127, Col. del Carmen, Coyoacán, D. F. (lourdes_2111@hotmail.com). ²Universidad Autónoma Chapingo-Departamento de Parasitología Agrícola. Carretera México-Texcoco km 38.5. Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. (rodime_lu@hotmail.com). ³Laboratorio de Biología Molecular Centro Nacional de Referencia Fitosanitario SENASICA-SAGARPA. (mario.espinosa@senasica.gob.mx). §Autor para correspondencia: rodime_lu@hotmail.com

Resumen

En los últimos cinco años, en viveros del estado de Morelos, se observaron plantas de filodendro (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium*), con manchas necróticas de aspecto húmedo y rodeadas de un halo clorótico, la presencia de esta enfermedad reduce el valor comercial de la planta y afecta su calidad. Esta enfermedad se encontró con una incidencia de 7 a 11%. Se realizaron aislamientos del tejido enfermo en medio BK y CPG, obteniendo colonias bacterianas de color amarillo, Gram negativas, aeróbicas y de consistencia mucóide en el medio YDC. La reproducción de síntomas se logró con la inoculación por aspersión de una suspensión acuosa con 10^5 UFC mL⁻¹. La identificación se llevó a cabo con pruebas fisiológicas, bioquímicas, por PCR, y por la secuenciación del fragmento del 16S rDNA, de esta manera el agente causal de la necrosis foliar del filodendro fue identificado como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Palabras clave: bacteria, PCR, secuenciación.

Introducción

El filodendro (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium* Koch & Sello) es una planta ornamental de follaje originaria de las islas del sudeste asiático y la Polinesia. En México

Abstract

In the last five years in nurseries from the state of Morelos, philodendron plants (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium*) were observed with necrotic spots wet look and surrounded by a chlorotic halo; the presence of this disease reduces the commercial value of the plant and affects its quality. This disease was found with an incidence of 7-11%. Isolates from diseased tissue in BK and CPG medium were made, obtaining yellow bacterial colonies, gram negative, and aerobic and mucoid consistency in YDC medium. Reproduction of symptoms was achieved with inoculation by spraying an aqueous suspension of 10^5 CFU mL⁻¹. The identification was carried out with physiological, biochemical tests, PCR, and sequencing the fragment 16S rDNA, in this way the causative agent of leaf necrosis on philodendron was identified as *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Keywords: bacteria, PCR, sequencing.

Introduction

Philodendron (*Philodendron scadens* subsp. *oxycardium* Koch & Sello) is an ornamental plant native to the islands of Southeast Asia and Polynesia. In Mexico there have been

* Recibido: octubre de 2014
Aceptado: enero de 2015

se han registrado siete especies endémicas concentradas en las zonas tropicales de los estados de Veracruz, Chiapas y Oaxaca (Acebey, 2007). Pertenecen a la familia Araceae, con hojas alternas anchas y acorazonadas, de color verde brillante, jaspeadas de manchas blancas o amarillas y es comúnmente vista como planta de interior debido a su facilidad de crecimiento y alta tolerancia a pocas condiciones de luz. Actualmente se produce en el estado de Morelos ya que es utilizada como planta de ornato en casas y jardines; así como, de corte en complementos de arreglos florales.

En los últimos cinco años se ha observado en viveros de la zona de Cuautla, Morelos plantas de filodendro, con manchas foliares, necróticas de aspecto húmedo y rodeadas por un halo amarillo, las cuales reducen notablemente su calidad, por lo cual, se decidió realizar la presente investigación con el objetivo de determinar la etiología de la enfermedad.

Obtención de muestras. En viveros del estado de Morelos se recolectaron 20 muestras de hojas de plantas de filodendro, que presentaban manchas necróticas, húmedas y con un halo clorótico. Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente para su análisis.

Aislamiento. Se verificó la presencia de bacterias a través de la observación del flujo bacteriano. Las hojas enfermas fueron divididas en porciones de aproximadamente 1 cm², se desinfectaron con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 1%/ 1 min. y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y bajo condiciones asépticas, el tejido desinfectado se transfirió a un tubo con agua destilada estéril y se agitó por unos 10 min para que el agua se enturbio y con ellas se sembraron por estría cruzada varias cajas con medio de cultivo CPG (10 g de peptona, 1 g de ácidos casamínos, 10 g de glucosa, 18 g agar y 1 L de agua) y BK (20 g de proteosa peptona N° 3, 1.5 g de K₂HPO₄ 3H₂O, 1.5 g de MgSO₄ 7H₂O, 15 mL de glicerol, 15 g de agar y 1 L de agua), estas se incubaron a 28 °C durante 48 h. Las colonias individuales se purificaron en medios YDC y BK (Guevara, 2004).

Pruebas de patogenicidad. Se utilizó una suspensión bacteriana preparada con colonias de 24 h de crecimiento en medio BK, ajustada a una concentración de 10⁸ UFC mL⁻¹. La inoculación se realizó por infiltración en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. xanthi), y en plantas sanas de filodendro se inoculó también por aspersión, pero en este caso la concentración se redujo a 10⁵ UFC mL⁻¹. Las plantas testigo se inocularon con agua destilada estéril. Las plantas de filodendro se mantuvieron en cámara húmeda hasta la

seven endemic species concentrated in tropical areas of the states of Veracruz, Chiapas and Oaxaca (Acebey, 2007). It belongs to the family Araceae, with wide alternate leaves and heart shaped bright green, variegated with white or yellow spots and is commonly seen as a houseplant because of its ease of growth and high tolerance to few light conditions. Currently is produced in the state of Morelos since it is used as an ornamental plant in gardens and homes; as well as cutting accessories for floral arrangements.

In the last five years has been observed that in nurseries from the area of Cuautla, Morelos, philodendron plants, with leaf spot, necrotic wet look and surrounded by a yellow halo, which significantly reduces their quality, therefore, it was decided to do the present research in order to determine the etiology of the disease.

Sampling. In nurseries from Morelos state, 20 samples of philodendron leaves, exhibiting necrotic spots, moist and with a chlorotic halo were collected. Samples were kept at room temperature for analysis.

Isolation. The presence of bacteria was verified by looking for bacterial slime. Diseased leaves were divided into portions of about 1 cm², disinfected with an aqueous solution of sodium hypochlorite at 1%/1 min. and then rinsed three times with sterile distilled water and aseptic conditions, the disinfected tissue was transferred to a tube with sterile distilled water and stirred for about 10 min so that water became turbid and with them were inoculated various plates with culture medium CPG (10 g peptone, 1 g casamino acids, 10 g glucose, 18 g agar and 1 L of water) and BK (20 g proteose peptone No. 3, 1.5 g K₂HPO₄ 3H₂O, 1.5 g MgSO₄ 7H₂O, 15 mL glycerol, 15 g agar and 1 L of water), these were incubated at 28 °C for 48 h. Individual colonies were purified in medium YDC and BK (Guevara, 2004).

Pathogenicity tests. A bacterial suspension prepared with colonies of 24 h growth in medium BK, adjusted to a concentration 10⁸ CFU mL⁻¹ was used. The inoculation was performed by infiltration snuff leaves (*Nicotiana tabacum* var. xanthi) and in healthy philodendron plants was also inoculated by spraying, but in this case the concentration was reduced to 10⁵ CFU mL⁻¹. Control plants were inoculated with sterile distilled water. Philodendron plants were kept in a humidity chamber until symptoms appearance. Potato slices were also inoculated with bacterial culture which was kept at a temperature of 28 °C and high relative humidity conditions (Rodríguez, 2006).

reproducción de síntomas. También se inocularon rodajas de papa con cultivo bacteriano las que se mantuvieron a una temperatura de 28 °C y en condiciones de alta humedad relativa (Rodríguez, 2006).

Identificación del agente causal. Se observaron las características morfológicas y culturales de las bacterias, además de la realización de pruebas bioquímicas y fisiológicas relevantes tales como: color, consistencia y forma de las colonias, prueba de Gram, tipo de metabolismo, producción de oxidasa, catalasa, reducción de nitratos, producción de H₂S, hidrólisis de esculina, licuefacción de gelatina, hidrólisis de almidón, producción de ácido de azúcares; así como, el crecimiento en medios selectivos (Guevara, 2004).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La extracción del DNA de la cepas bacterianas se realizó con el kit Plant DNAzol® Reagent (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del DNA se verificó en un espectrofotómetro modelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA), tomando como referencia el valor de absorbancia 260/280 de 1.7 - 2.

La mezcla de reacción se preparó para un volumen de 25 µL con 20 picomoles de cada iniciador, 1 µL de dNTP a una concentración de 200 nM, 5 µL de 1X buffer para PCR, 3 µL de MgCl₂ a una concentración final de 1.5 nM, 2.5 µL de *Taq* Polimerasa (Roche, USA), 5 µL de DNA y 29.5 µL de agua grado PCR, para obtener un volumen final de 50 µL. Los oligonucleótidos utilizados fueron universales para la detección de bacterias: 8F 5'-GGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG-3' modificado por acortamiento del extremo 5'; por Falske *et al.* (1997) y 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (universal Turner *et al* 1999) que amplifican un fragmento de 1 500 pares de bases (pb) de la región del gen rDNA 16S. La amplificación del fragmento se realizó con las siguientes condiciones de termociclaje: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos a 95 C por 2 min, 56 C por 1 min y 72 C durante 1. 50 min, con una extensión final de 72 C por 5 min. Para observar los fragmentos amplificados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, se cargaron de 15 a 20 µL de los productos de PCR en cada pozo y se corrió a 100 volts durante una hora, transcurrido el tiempo el gel se tiñó con 1mg de bromuro de etidio en 1 000 mL de agua destilada durante 20 min, posteriormente el gel se enjuaga en agua destilada (CIMMYT, 2006) y finalmente los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador modelo Gel Doc XR (BioRad, USA).

Identification of the causative agent. Morphological and cultural characteristics of bacteria were observed, in addition to the realization of important biochemical and physiological tests such as color, texture and shape of the colonies, gram test, type of metabolism, production of oxidase, catalase, nitrate reduction, H₂S production, hydrolysis of esculin, gelatin liquefaction, starch hydrolysis, acid production from sugars; thus growth on selective media (Guevara, 2004).

Polymerase chain reaction (PCR). DNA extraction of the bacterial strains was performed with DNAzol® Plant Reagent Kit (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions. The integrity of DNA was checked on a spectrophotometer Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA), taking as reference the absorbance value 260/280 of 1.7 - 2.

The reaction mixture was prepared to a volume of 25 µl with 20 pmol of each primer, 1 µl of dNTP at a concentration of 200 nM, 5 µl of 1X PCR buffer, 3 µL of MgCl₂ to a final concentration of 1.5 nM, 2.5 µL of *Taq* Polymerase (Roche, USA), 5 µl of DNA, and 29.5 µL of PCR grade water to a final volume of 50 µL. The oligonucleotides used were universal for bacteria detection: 8F 5' GGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG-3' modified by shortening the extreme 5'; by Falske *et al.* (1997) and 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (universal Turner *et al* 1999) which amplified a fragment of 1 500 base pairs (bp) from the 16S rDNA region. Fragment amplification was performed with the following thermocycling conditions: one cycle of initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles at 95 C for 2 min, 56 C for 1 min and 72 C for 1.50 min with a final extension of 72 C for 5 min. To observe the amplified fragments an electrophoresis in agarose gel 1%, were loaded 15 to 20 µl of PCR products in each well and was run at 100 volts for one hour, after time passed the gel was stained with 1 mg of ethidium bromide in 1 000 ml of distilled water for 20 min, then the gel was rinsed in distilled water (CIMMYT, 2006) and finally the DNA fragments were visualized on a transilluminator Gel Doc XR (BioRad, USA).

Sequencing and alignment. The PCR product was sequenced on equipment Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystem, USA). The sequences of both regions were assembled and edited using the program BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999) with which a consensus sequence was created and compared with sequences deposited in the National Center Biological Information (NCBI, 2010) and Ribosomal Database Project, through the option BLAST 2.2.19. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood (ML) with program MEGA5.

Secuenciación y alineamiento. El producto de PCR fue secuenciado en un equipo Genetic Analyzer 3130 (APPLIED BIOSYSTEM, USA). Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999) con el cual se creó una secuencia consenso, y se comparó con secuencias depositadas en el National Center Biological Information (NCBI, 2010) y en Ribosomal Database Project, a través de la opción BLAST 2.2.19. La historia de la evolución fue inferida utilizando el Maximum Likelihood (ML) con el programa MEGA5.

El árbol filogenético se realizó con el programa MEGA5 comparando 26 secuencias de diferentes especies de *Xanthomonas* y el fuera de grupo está representado por una secuencia de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Durante los muestreos se observaron plantas de filodendro con hojas que presentaban manchas necróticas, húmedas y rodeadas por un halo clorótico (Figura 1 A) y después de cierto tiempo el tejido necrosado se desprendía (Figura 1 B).

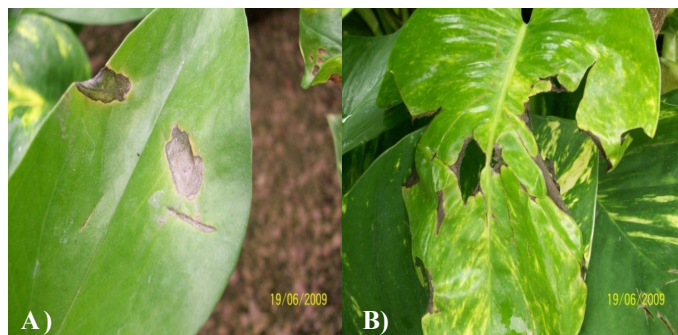


Figura 1. A) hoja de filodendro con manchas necróticas y rodeadas por un halo clorótico; y B) hoja de filodendro con perforación del tejido necrosado.

Figure 1. A) philodendron leaf with necrotic spots and surrounded by a chlorotic halo; and B) philodendron leaf with perforation of necrotic tissue.

Aislamiento e identificación

De las manchas foliares se aislaron con frecuencia colonias amarillas, circulares de borde liso y mucoides (Figura 2) las cuales fueron purificadas en medio YDC y BK.

La bacteria resultó ser Gram negativa, aeróbica, de crecimiento mucoso en medio YDC, catalasa positiva, oxidasa negativa, incapaz de reducir los nitratos a nitritos, además de no crecer en medio de cultivo CPG con cloruro de trifeníl tetrazolio al 0.1%. Estas características son reportadas por Duveiller *et al.* (1997) como típicas del género *Xanthomonas*.

The phylogenetic tree was performed with the program MEGA5 by comparing 26 sequences from different species of *Xanthomonas* and off group is represented by a sequence of *Stenotrophomonas maltophilia*.

During the sampling of philodendron plants were observed leaves exhibiting necrotic spots, wet and surrounded by a chlorotic halo (Figure 1A) and after some time the dead tissue detached (Figure 1B).

Isolation and identification

From leaf spot were often isolated yellow colonies, circular smooth edge and mucoid (Figure 2) which were purified on medium YDC and BK.



Figura 2. Colonias de la bacteria aislada de manchas necróticas del filodendro (*Philodendron scandens* subsp *oxycardium* Koch & Sello) en medio CPG.

Figure 2. Colonies of bacteria isolated from necrotic spot of philodendron (*Philodendron scandens* subsp *oxycardium* Koch & Sello) in medium CPG.

The bacteria was gram negative, aerobic, mucoid growth on medium YDC, catalase positive, oxidase negative, unable to reduce nitrates to nitrites, do not grow well in culture medium CPG with triphenyl tetrazolium chloride 0.1%. These features are reported by Duveiller *et al.* (1997) as typical of the genus *Xanthomonas*.

The bacteria grew at 35 °C, produced H₂S, tolerates sodium chloride at 2%, liquefied gelatin, hydrolyzed esculin and starch; and produced acid from arabinose, glucose, mannose, galactose, cellobiose, fructose and melibiose. These results agree with those quoted by Rodríguez (2006) for the species *Xanthomonas campestris*. Furthermore the bacteria grew well on the selective medium SX, which is constituted by: 10 g of soluble potato starch, 1 g of meat extract, 5 g of ammonium chloride, 2 g of K₂HPO₄, 1 mL methyl violet (sol at 1% in

La bacteria creció a 35 °C, produjo H₂S, toleró cloruro de sodio a 2%, licuó la gelatina, hidrolizó la esculina y el almidón; y produjo ácido a partir de arabinosa, glucosa, manosa, galactosa, celobiosa, fructosa y melobiosa. Estos resultados coinciden con lo citado por Rodríguez (2006) para la especie *Xanthomonas campestris*. Además la bacteria creció muy bien en el medio selectivo SX, el cual esta cosntituido por :10 g de almidón soluble de papa, 1 g de extracto de carne, 5 g de cloruro de amonio, 2 g de K₂HPO₄, 1mL de violeta de metilo (sol al 1% en etanol al 20%), 2 mL de verde de metilo (sol acuosa al 1%), 250 mg de cicloheximida, 15 g de agar y 1L de agua destilada) lo cual también es característico de esta especie (Guevara, 2006).

Pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas, cumpliéndose los postulados de Koch; en las hojas de tabaco se presentó una reacción de hipersensibilidad a las 24 h de la inoculación tal y como lo menciona Duveiller *et al.* (1997), las plantas de filodendro inoculadas tanto con el método de infiltración como el de aspersión presentaron manchas necróticas, húmedas y rodeadas por un halo clorótico (Figura 3).



Figura 3. Planta de filodendro mostrando síntomas después de la inoculación de la cepa bacteriana aislada de manchas foliares.

Figure 3. Philodendron plant showing symptoms after inoculation of bacterial strain isolated from leaf spot.

Las rodajas de papa presentaron una pudrición blanda generalizada y según Dianese (1985) algunas cepas de *X. campestris* pv. *campestris* presentan elevadas concentraciones de ácido poligalacturónico y pectinesterasa que inducen la liberación de electrolitos y provocan la maceración de los tejidos. En los reaislamientos de la zona afectada se obtuvieron colonias bacterianas con las mismas características que la inoculada inicialmente.

ethanol 20%), 2 mL of methyl green (1% aqueous sol), 250 mg of cycloheximide, 15 g of agar and 1L of distilled water) which is also characteristic of this species (Guevara, 2006).

Pathogenicity tests. Pathogenicity tests were positive, fulfilling Koch's postulates; in the snuff leaves a hypersensitivity reaction at 24 h after inoculation presented as mentioned by Duveiller *et al.* (1997), philodendron plants inoculated with both the infiltration and spraying method showed necrotic, wet and surrounded by a chlorotic halo (Figure 3).

The potato slices showed soft rotting and according to Dianese (1985) some strains of *X. campestris* pv *campestris* have high plasma concentrations of polygalacturonic acid and pectinesterase inducing the release of electrolyte and cause maceration of tissue. On the reisolation of the affected area bacterial colonies with the same characteristics as the initially inoculated were obtained.

Polymerase chain reaction. The amplified fragment with primers 8F and 1492R from bacterial strains were approximately of 1 500 bp (Figure 4).

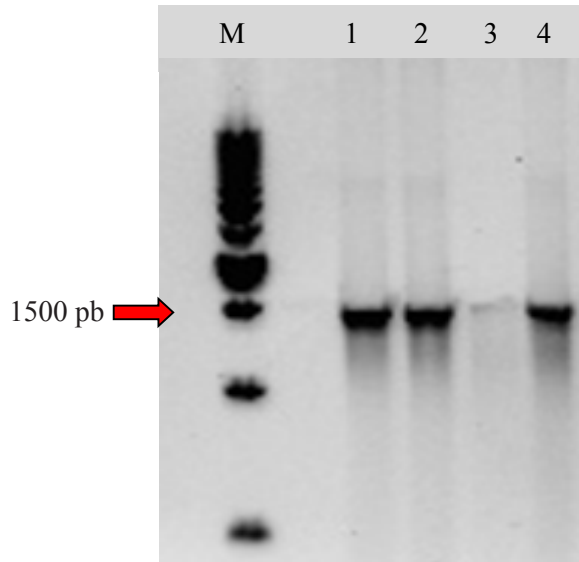


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del producto de aproximadamente 1 500 pb. Línea 1 a la 4 producto de PCR de la cepa aislada de manchas foliares del filodendro. M. Marcador molecular 1Kb (Invitrogen, USA).

Figure 4. Electrophoresis in agarose gel at 1% of the amplification product of approximately 1 500 bp. Line 1 to 4 PCR product of isolate strain from leaf spot of philodendron; M. molecular marker 1Kb (Invitrogen, USA).

Reacción en cadena de la polimerasa. El fragmento amplificado con los iniciadores 8F y 1492R a partir de las cepas bacterianas fue de aproximadamente de 1 500 pb (Figura 4).

Secuenciación y alineamiento

El alineamiento de la secuencia consenso resultante del análisis con el programa Bioedit y marcada como *Xanthomonas* sp. 3 al ser alineada con la base de datos Ribosomal data base project arrojó una identidad de 100% con *Xanthomonas campestris*. Esta base de datos alinea exclusivamente el rDNA 16S de bacterias y tiene una alta confiabilidad. El árbol filogenético se realizó con el programa Mega 5 comparando 26 secuencias de diferentes especies de *Xanthomonas* y el fuera de grupo está representado por una secuencia de *Stenotrophomonas maltophilia*, en él se puede observar que la cepa aislada del filodendro se agrupa con *Xanthomonas campestris* (Figura 5).

Conclusiones

El análisis BLAST de la secuencia nucleotídica obtenida mostró una máxima identidad de 98% con la secuencia ATCC 33913 depositada en el Gen Bank y que corresponde a *Xanthomonas campestris*.

Los resultados de las pruebas bioquímicas confirman que el agente causal de las manchas foliares del filodendro pertenece a la especie en mención.

Literatura citada

- Acebey, A. 2008. Diversidad y distribución de Araceae de la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas Veracruz, México. *Rev. Mex. Biod.* 79(2):3-4.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 2006. Protocolos de Laboratorio. Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. 100 p.
- Dianese, J. 1985. Actividad pectolítica de patovares de *Xanthomonas campestris* que afectan a la mandioca. *Rev. Microbiol.* 16:195-202.
- Duveiller, E.; Fucikovsky, L. and Rudolph, K. 1997. The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). El Batán, Estado de México. 65 p.
- Falske, A.; Rheims, H.; Wolterink, A.; Stackebrandt, E. and Akkermans, A. D. 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soil. *Microbiology.* 143:2983-2989.

Sequencing and alignment

The alignment of the consensus sequence resulting from the analysis with the BioEdit program and marked as *Xanthomonas* sp. 3 when aligned to the Ribosomal Database Project showed an identity of 100% with *Xanthomonas campestris*. This database aligns only to the 16S rDNA of bacteria and has high reliability. The phylogenetic tree was performed using the Mega 5 program comparing 26 sequences of different species of *Xanthomonas* and outside the group is represented by a sequence of *Stenotrophomonas maltophilia*, it can be observed that the isolated strain from the philodendron is grouped with *Xanthomonas campestris* (Figure 5).

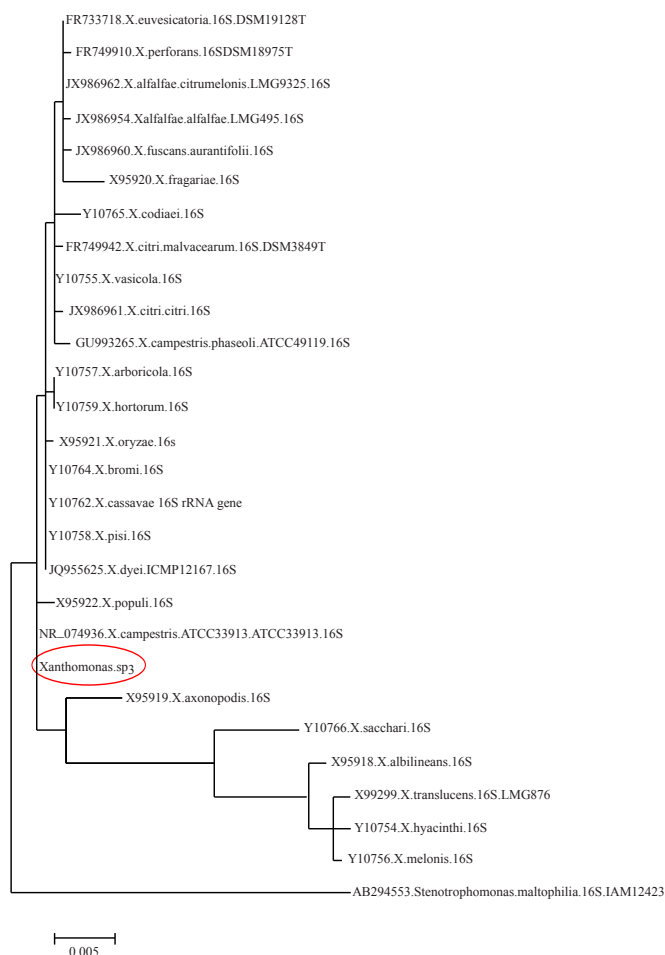


Figura 5. Árbol filogenético de *Xanthomonas* sp., empleando el modelo estadístico de Maximun Likelihood (ML), con el gen 16s RNA ribosomal.

Figure 5. Phylogenetic tree of *Xanthomonas* sp., using the statistical model Maximun Likelihood (ML), with the 16S RNA ribosomal gene.

- Guevara, Y. 2004. Bacteriosis en cilantro (*Coriandrum sativum* L.) causada por *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson en Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Maracay, Venezuela. Rev. Mex. Fitopatol. 23- 001.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Rodríguez, M. M. 2006. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Departamento de Parasitología Agrícola. Texcoco, Estado de México. 146 p.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol. Evol. 4:406-425.
- Turner, S.; Pryer, K.; Miao, V. and Palmer, J. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. J. Eukaryotic Microbiol. 46:327-338.

Conclusions

The BLAST analysis of the nucleotide sequence obtained showed a maximum identity of 98% with the ATCC 33913 sequence deposited in GenBank and corresponding to *Xanthomonas campestris*.

Confirming the results from the biochemical test that the causal agent of leaf spot of philodendron belongs to the species in question.

End of the English version

