ROL ETIOLÓGICO DE *Pantoea ananatis* EN LA MANCHA BLANCA DEL MAÍZ EN ARGENTINA: EVIDENCIA MOLECULAR Y EXPERIMENTAL

Decker, V.N.[1]; Copia, A.P.[1]; Couretot, L.A.[1]; Zin, F.[2]; Guerra, F.A.[2,3]; Plazas, M.C.[2,4]; Valentinis, F.[2]; Guerra, G.D.[2] y De Rossi, R.L.[2]

[1]INTA EEA Pergamino, [2]Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina. [3]GDM Argentina.[4]Agro Bayer. Contacto: decker.viviana@inta.gob.ar

ETIOLOGICAL ROLE OF *Pantoea ananatis* IN MAIZE WHITE SPOT IN ARGENTINA: MOLECULAR AND EXPERIMENTAL EVIDENCE

ABSTRACT. During the 2024/25 and 2025/26 growing seasons, maize leaves showing typical white spot (WS) symptoms were collected in Pergamino and San Jorge, Argentina. Samples represented three spatiotemporal origins: Pergamino 2025, San Jorge 2026, and Pergamino 2026. A total of 15 bacterial colonies were selected and characterized by biochemical assays (Gram staining, KOH test, and growth on YDC medium) and molecularly identified by PCR amplification and sequencing of the gyrB gene. All isolates were identified as *Pantoea ananatis* and inoculated onto four susceptible maize hybrids. All 15 colonies induced symptoms, whereas negative-control plants remained asymptomatic. The bacterium was successfully re-isolated from experimentally induced lesions, and its identity as *P. ananatis* was reconfirmed by PCR and *gyrB* sequencing, providing experimental evidence consistent with Koch's postulates, although the induced symptoms did not completely reproduce the development and complexity of lesions observed under natural field conditions. The consistency of pathogenicity across isolates from different spatiotemporal origins and maize genotypes provides robust evidence of the pathogenic capacity of *P. ananatis*. These results provide molecular and experimental evidence supporting the role of *P. ananatis* as a primary causal agent of maize white spot in Argentina and suggest that the final expression of the disease may be modulated by interactions among the pathogen, host, environment, and associated microbiota.

Keywords: *Pantoea ananatis*; maize white spot; *Zea mays*; Koch's postulates
Palabras clave: *Pantoea ananatis*; mancha blanca del maíz; *Zea mays*; postulados de Koch

INTRODUCCIÓN

La mancha blanca (MB) del maíz constituye una de las enfermedades foliares de mayor importancia del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en diversos países productores de América y Europa. En condiciones ambientales favorables puede reducir significativamente el área foliar fotosintéticamente activa, acelerar la senescencia de las hojas y ocasionar pérdidas importantes de rendimiento, especialmente cuando las

infecciones ocurren antes o durante el período crítico del cultivo (Paccola-Meirelles et al., 2001; Capucho et al., 2010; Sauer et al., 2014). En Argentina, aunque la enfermedad fue reportada hace más de una década (Alippi y López, 2010), durante las campañas 2024/25 y 2025/26 se registró un marcado incremento de su incidencia y severidad en gran parte del área maicera, posicionándose entre las principales enfermedades foliares del cultivo (Formento, 2025; de Carvalho et al., 2025; De Cól et al., 2025; De Rossi et al., 2026).

A pesar de su creciente importancia, la etiología de la MB continúa siendo uno de los aspectos más controvertidos de este patosistema. Inicialmente, la enfermedad fue atribuida al hongo *Phaeosphaeria maydis* debido a la frecuente observación de pseudotecios y picnidios en lesiones desarrolladas a campo (Amaral et al., 2004, 2005). Sin embargo, numerosos estudios posteriores demostraron que este hongo rara vez reproduce la enfermedad mediante inoculaciones artificiales y que, en la mayoría de los casos, actúa como colonizador secundario de tejidos previamente lesionados (Paccola-Meirelles et al., 2001; Gonçalves et al., 2013).

En contraste, investigaciones realizadas en Brasil, Argentina, Polonia y otros países identificaron de manera consistente a *Pantoea ananatis* asociada a lesiones típicas de MB y demostraron experimentalmente su capacidad para inducir síntomas compatibles con la enfermedad (Paccola-Meirelles et al., 2001; Alippi y López, 2010; Krawczyk et al., 2010; Sauer et al., 2014). Asimismo, se describió que determinados aislamientos poseen genes de nucleación de hielo, capaces de inducir la formación de cristales a temperaturas relativamente elevadas y provocar el colapso de las células epidérmicas, mecanismo considerado una de las principales hipótesis fisiopatológicas para explicar el inicio de la enfermedad (Sauer et al., 2014).

No obstante, aunque la evidencia disponible respalda el papel de *Pantoea ananatis* como agente fitopatógeno, la expresión de la mancha blanca en condiciones naturales parece involucrar un patosistema más complejo. En lesiones desarrolladas a campo es frecuente detectar hongos y otros microorganismos asociados, lo que sugiere que la severidad final de la enfermedad podría estar determinada por la interacción entre *Pantoea ananatis*, el hospedante, el ambiente y la microbiota foliar (Gonçalves et al., 2013; de Carvalho et al., 2025; De Col et al., 2025). En este contexto, resulta indispensable generar evidencia experimental obtenida con aislamientos locales que permita definir el rol etiológico de *Pantoea ananatis* en Argentina.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el rol etiológico de *Pantoea ananatis* en la mancha blanca del maíz mediante evidencia molecular y experimental obtenida a partir de aislamientos argentinos, incluyendo su identificación molecular mediante secuenciación del gen gyrB, la evaluación de su patogenicidad sobre híbridos susceptibles y la verificación del cumplimiento de los postulados de Koch mediante el re-aislamiento y la confirmación molecular del microorganismo inoculado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y aislamiento bacteriano

Durante las campañas 2024/25 y 2025/26 se realizaron muestreos de hojas de maíz con síntomas característicos de mancha blanca (MB) en Pergamino (Buenos Aires)

y San Jorge (Santa Fe), Argentina. A partir de tres muestras (Pergamino 2025, San Jorge 2026 y Pergamino 2026), (**Fig. 1**) se obtuvieron tres cepas bacterianas, de las cuales se seleccionaron un total de 15 colonias 5 de cada cepa.

Figura 1. Hojas de maíz con síntomas característicos de mancha blanca colectadas en el campo experimental de Pergamino durante abril de 2025.

En laboratorio, las hojas fueron desinfectadas superficialmente mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 1 minuto. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril para eliminar los restos del desinfectante. Finalmente, las muestras se dejaron secar sobre papel absorbente estéril (**Fig. 2**)

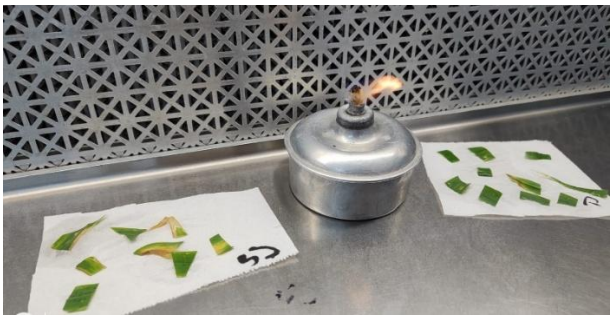

Figura 2. Secado en condiciones asépticas de muestras foliares de maíz provenientes de Pergamino y San Jorge, luego de la desinfección superficial y los enjuagues con agua destilada estéril.

Una vez secas, las hojas se dividieron en dos fracciones para el aislamiento bacteriano:

1. Siembra directa de tejido: una fracción de la hoja se cortó en pequeños fragmentos, los cuales se colocaron sobre placas de Petri con medio de cultivo LB.
2. Dilacerado del tejido: la segunda fracción se dilaceró, cortando el tejido en fragmentos muy pequeños con un bisturí previamente esterilizado por flameado dentro de un recipiente con agua estéril. A partir de la suspensión obtenida, se sembraron 50 µL sobre placas de Petri conteniendo medio LB esparciendo con espátula esterilizada por flameo.

Pruebas bioquímicas.

Se realizaron la tinción de Gram y la prueba de hidróxido de potasio (KOH) al 3 %. Así como los aislamientos bacterianos fueron cultivados en medio de cultivo YDC (Yeast Extract-Dextrose-Calcium Carbonate) para evaluar las características

morfológicas de las colonias, tales como color, tamaño, forma, borde, elevación, producción de pigmentos amarillos y aspecto mucoso, parámetros que sirven para una identificación parcial.

Identificación molecular.

Para la extracción de ADN genómico, los aislamientos bacterianos se cultivaron durante toda la noche (overnight). Posteriormente, se resuspendió aproximadamente 1 cm² de césped bacteriano en 1 mL de agua estéril. De esta suspensión se tomaron 10 µL, que fueron transferidos a un tubo con 90 µL de agua estéril. La mezcla se incubó a 95 °C durante 15 minutos para producir la lisis celular y liberar el ADN, el cual se utilizó posteriormente como molde para las reacciones de amplificación por PCR.

La reacción de PCR se realizó utilizando los primers PANAN_gyrB_fwd (GATGACGARGCCATGCTGC) y PANAN_gyrB_rev (GATCTTGCGGTATTCGCCAC) (Kini et al. 2021) que amplifican una porción del gen que codifica la subunidad β del ADN girasa (*gyrB*). La PCR produjo una ampliación de aproximadamente 423 pb correspondiente al gen *gyrB*. Dicho fragmento fue purificado y enviado para su secuenciación (**Fig. 4**). Se obtuvieron 15 colonias a partir de las tres cepas de partida y todos fueron secuenciados.

Inoculación y evaluación de patogenicidad

Para la preparación del inóculo, se tomó una colonia de cada aislamiento puro con un palillo estéril y se inoculó en un matraz Erlenmeyer con 5 mL de medio caldo Luria-Bertani (LB). El cultivo se incubó a 28 °C en oscuridad durante toda la noche (overnight) bajo agitación constante. A primera hora del día siguiente, se realizó un subcultivo de 50 mL combinando 45 mL de medio LB fresco con los 5 mL del precultivo. La suspensión bacteriana se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600} ≈ 0,3–0,5). Posteriormente, la suspensión se alicuotó en tubos de centrifugación para separar la biomasa celular del medio mediante centrifugación. El precipitado celular (*pellet*) se resuspendió en una solución de $MgCl_2$ 10 mM y se trasvasó a un pulverizador estéril. La inoculación se llevó a cabo sobre cuatro híbridos susceptibles de maíz. Las hojas fueron previamente abrasadas con lija fina para facilitar el ingreso bacteriano y, a continuación, se pulverizaron uniformemente con la suspensión bacteriana. Las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara de incubación a 25 °C, 80 % de humedad relativa y en condiciones de oscuridad continua. Como control negativo, plantas de los mismos híbridos fueron sometidas al mismo procedimiento de abrasión y pulverizadas únicamente con una solución estéril de $MgCl_2$ 10 mM, sin inóculo bacteriano, y mantenidas bajo las mismas condiciones de incubación.

Re-aislamiento y confirmación molecular

A partir de las lesiones desarrolladas en las plantas inoculadas se realizaron nuevos aislamientos bacterianos siguiendo el procedimiento previamente descripto. Las colonias recuperadas fueron sometidas nuevamente a extracción de ADN, amplificación por PCR del gen *gyrB* y secuenciación del producto obtenido. Las secuencias resultantes fueron comparadas con las correspondientes a los aislamientos utilizados como inóculo,

con el objetivo de confirmar la identidad del microorganismo recuperado y verificar el cumplimiento de los postulados de Koch.

RESULTADOS

Aislamiento bacteriano y caracterización bioquímica

A partir de estas tres cepas, correspondientes a Pergamino 2025, San Jorge 2026 y Pergamino 2026, se seleccionaron 15 colonias bacterianas para su caracterización molecular y posterior evaluación de patogenicidad.

Todos los aislamientos exhibieron morfotipos bacterianos similares. En las pruebas bioquímicas resultaron ser Gram negativas mediante la tinción de Gram, lo cual fue ratificado por la prueba de solubilidad en KOH al 3 % tras observarse la formación del hilo viscoso característico. Al ser cultivados en medio YDC, las colonias desarrollaron un color amarillo intenso, aspecto mucoso y bordes regulares, características macroscópicas consistentes con la morfología típica descripta para *Pantoea ananatis* (**Fig. 3**).

Figura 3. Colonias bacterianas desarrolladas en medio YDC, con pigmentación amarilla y aspecto mucoso compatibles con características culturales descriptas para *Pantoea ananatis*.

Confirmación e identificación molecular

La extracción de ADN genómico por lisis térmica a partir de los aislamientos permitió obtener molde apto para las reacciones de amplificación por PCR. Utilizando los cebadores específicos PANAN_gyrB_fwd y PANAN_gyrB_rev, se logró la amplificación exitosa de un fragmento de aproximadamente 423 pb correspondiente al gen *gyrB* en todos los aislamientos analizados (**Fig. 4**).

A partir de las tres cepas originales, se evaluaron un total de 15 aislamientos 5 colonias de cada cepa (calles 1 a 5 de San Jorge; calles 6 a 11 de Pergamino 2026; y calles 12 a 15 de Pergamino 2025). Tras la purificación y secuenciación de la ampliación de 423 pb, las secuencias obtenidas confirmaron con un 98.88 % de identidad la especie *Pantoea ananatis* coincidiendo con el número de acceso OQ351950.1 de las secuencias de *gyrB* (GenBank) en todos los casos (**Fig. 4**).

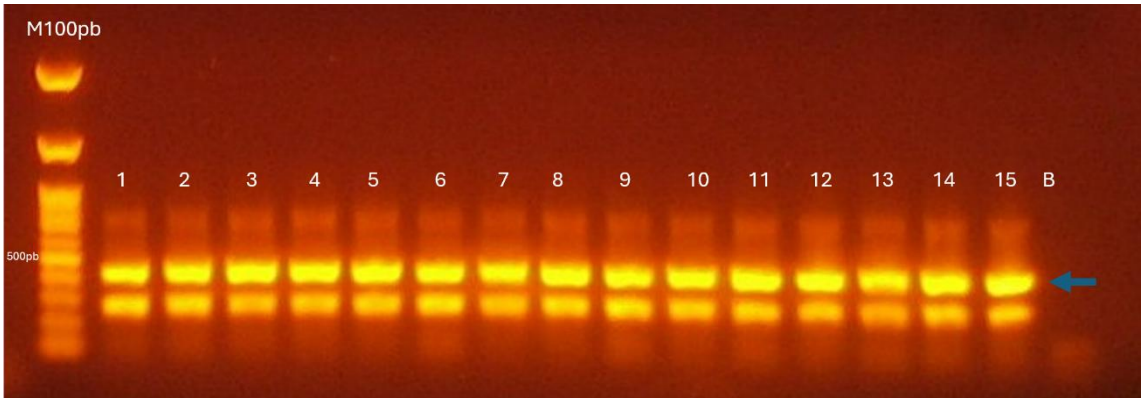

Figura 4. Amplificación por PCR de un fragmento de 423 pb del gen *gyrB*. Las calles 1 a 5 corresponden a aislamientos de San Jorge2026; las calles 6 a 11, a Pergamino 2026; y las calles 12 a 15, a Pergamino 2025. La flecha indica el fragmento de aproximadamente 423 pb correspondiente al gen *gyrB*, posteriormente purificado y secuenciado.

Prueba de patogenicidad y cumplimiento de los postulados de Koch

La inoculación artificial mediante pulverización foliar previa abrasión mecánica con las suspensiones bacterianas (OD_{600} = 0,3–0,5 en $MgCl_2$ 10 mM) indujo la aparición de síntomas en los cuatro híbridos susceptibles de maíz evaluados. Las cepas resultaron patogénicas, produciendo lesiones de aspecto acuoso en el tejido foliar inoculado. En contraste, las plantas utilizadas como control negativo permanecieron asintomáticas durante todo el período de evaluación. Bajo condiciones controladas de incubación (25 °C, 80 % HR y oscuridad), las primeras lesiones de aspecto acuoso se manifestaron en el tejido foliar inoculado.

A partir de las lesiones recién desarrolladas en las plantas sintomáticas, se realizó el re-aislamiento bacteriano en medio LB. Las colonias recuperadas mantuvieron las características culturales y bioquímicas de los inóculos originales.

Finalmente, la amplificación por PCR y posterior secuenciación del gen *gyrB* de las bacterias re-aisladas confirmó nuevamente su identidad como *Pantoea ananatis*. La identidad molecular del microorganismo recuperado con el originalmente inoculado, conjuntamente con la reproducción de síntomas y la ausencia de síntomas en los controles negativos, permitió verificar el cumplimiento de los postulados de Koch.

En conjunto, estos resultados aportan evidencia molecular y experimental que respalda el rol de *Pantoea ananatis* como agente causal primario de la MB del maíz en Argentina

DISCUSIÓN

La etiología de la mancha blanca del maíz constituye uno de los temas más debatidos dentro de la fitopatología del cultivo. Durante décadas, la enfermedad fue atribuida principalmente a *Phaeosphaeria maydis*, debido a la frecuente observación de estructuras reproductivas del hongo en lesiones desarrolladas a campo (Amaral et al., 2004; 2005). Sin embargo, numerosos estudios posteriores comenzaron a demostrar una asociación consistente entre *Pantoea ananatis* y las lesiones típicas de la enfermedad, aportando además evidencia experimental de su capacidad patogénica (Paccola-Meirelles et al., 2001; Alippi y López, 2010; Krawczyk et al., 2010; Gonçalves et al., 2013;

Sauer et al., 2014). En este contexto, el presente trabajo aporta nueva evidencia obtenida con aislamientos argentinos que contribuye a esclarecer esta controversia.

Los tres orígenes bacterianos obtenidos a partir de lesiones típicas permitieron seleccionar 15 colonias, todas identificadas molecularmente como *Pantoea ananatis*. La inoculación de los aislamientos produjo síntomas en los cuatro híbridos susceptibles evaluados, mientras que los controles negativos permanecieron asintomáticos. El posterior re-aislamiento, seguido de PCR y secuenciación del gen *gyrB*, confirmó nuevamente la identidad de *P. ananatis*, permitiendo verificar experimentalmente el cumplimiento de los postulados de Koch. La consistencia de la respuesta entre aislamientos provenientes de diferentes orígenes espacio-temporales y sobre distintos genotipos de maíz refuerza la evidencia sobre la capacidad patogénica de *P. ananatis*. Estos resultados coinciden con observaciones previamente realizadas en Brasil, Argentina y Europa (Paccola-Meirelles et al., 2001; Alippi y López, 2010; Krawczyk et al., 2010; Sauer et al., 2014).

Sin embargo, uno de los hallazgos más interesantes del presente estudio fue que la sintomatología obtenida bajo condiciones controladas no reprodujo completamente las lesiones observadas en condiciones naturales. Si bien las plantas inoculadas desarrollaron lesiones compatibles con las etapas iniciales de la enfermedad y permitieron recuperar nuevamente *Pantoea ananatis*, las lesiones presentaron menor desarrollo y complejidad que aquellas observadas habitualmente en lotes comerciales. Resultados similares fueron descriptos por otros autores, quienes atribuyeron estas diferencias al efecto del ambiente, del genotipo del hospedante y de las metodologías de inoculación empleadas (Gonçalves et al., 2013; Sauer et al., 2014).

Estas diferencias, lejos de cuestionar el cumplimiento de los postulados de Koch, aportan información relevante sobre la naturaleza del patosistema. Los postulados aportan evidencia sólida de que un microorganismo es capaz de inducir enfermedad bajo condiciones experimentales; sin embargo, su cumplimiento no implica necesariamente que la expresión completa del síndrome observado a campo dependa exclusivamente de dicho microorganismo. En condiciones naturales, las lesiones evolucionan durante varios días bajo la influencia de sucesivos ciclos de humedad, fluctuaciones térmicas, radiación solar y la interacción con una microbiota foliar compleja. En este escenario, distintos microorganismos oportunistas pueden colonizar el tejido previamente lesionado y modificar la evolución, morfología y severidad de las lesiones.

En este sentido, consideramos que una parte importante de la controversia histórica sobre la etiología de la mancha blanca probablemente haya surgido de interpretar el patosistema como una dicotomía entre *Phaeosphaeria maydis* y *Pantoea ananatis*. Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con la evidencia acumulada durante las últimas décadas, permiten proponer una interpretación diferente: *Pantoea ananatis* actuaría como un agente causal primario, capaz de iniciar el proceso infeccioso, mientras que la expresión final del síndrome observado en condiciones naturales podría resultar de la interacción entre la bacteria, el hospedante, el ambiente y otros microorganismos asociados a las lesiones. Esta interpretación permite integrar tanto la evidencia experimental disponible como la frecuente detección de estructuras fúngicas en lesiones maduras, sin asumir necesariamente que dichos organismos constituyan el agente causal inicial.

Desde un punto de vista epidemiológico y de manejo, esta distinción posee importantes implicancias. Identificar correctamente al microorganismo responsable de iniciar la infección constituye un paso fundamental para el desarrollo de estrategias de diagnóstico temprano, monitoreo, evaluación de resistencia genética y diseño de medidas de manejo. Al mismo tiempo, comprender la participación de otros microorganismos en la evolución de las lesiones abre nuevas líneas de investigación orientadas a caracterizar la microbiota asociada a la enfermedad y su posible influencia sobre la severidad del síndrome.

CONCLUSIONES

En conjunto, este trabajo aporta evidencia molecular y experimental obtenida con aislamientos argentinos que respalda el rol de *Pantoea ananatis* como agente causal primario de la MB del maíz.

Asimismo, propone una interpretación integradora del patosistema, en la cual el inicio de la infección puede atribuirse a *Pantoea ananatis*, mientras que la expresión completa de la enfermedad observada a campo probablemente sea consecuencia de una compleja interacción entre el hospedante, el ambiente y otros microorganismos asociados a las lesiones.

Bibliografía

Alippi, A. M. & López, A. C. (2010). First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. *Plant Disease*, 94(4), 487.

Capucho, A. S. et al. (2010). Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. *Crop Protection*, 29(9), 1015-1020.

de Carvalho, A. C. C., Braga, K., Custódio, A. A. P., et al. (2025). Modeling the severity–yield relationship and economic damage threshold of white spot epidemics in maize. Tropical Plant Pathology, 50, 75. https://doi.org/10.1007/s40858-025-00763-8

De Cól, M. C., Braga, K., Custódio, A. A. P., et al. (2025). Quantitative summary of nine years of fungicide efficacy data for managing white spot and protecting yield in maize. Crop Protection, 197, 107339. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2025.107339

De Rossi, R. L., Guerra, F., Lábaque, M., Plazas, M. C., Zin, F., Valentinis, F., & Guerra, G. D. (2026). Panorama fitosanitario: alta presión de enfermedades en soja y maíz en el centro-norte de Córdoba. Laboratorio de Fitopatología, Universidad Católica de Córdoba.

Formento, A. N. (2025). Mancha blanca del maíz en siembra de segunda en Victoria, Entre Ríos, durante el ciclo agrícola 2024/25. Serie Extensión Nº 96. INTA EEA Paraná

Gonçalves, R. M. et al. (2013). Etiology of Phaeosphaeria leaf spot disease of maize. *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 559-569.

Kini, K., Agnimonhan, R., Dossa, R., Silue, D., and Koebnik, R. 2021. Geno-mics-informed multiplex PCR scheme for rapid identification of rice-associated bacteria of the genus Pantoea. Plant Dis. 105:2389-2394.

Krawczyk, K. et al. (2010). First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 92(3), 807-811.

Paccola-Meirelles, L. D. et al. (2001). Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 149(5), 275-279.

Sauer, A. V., Paccola-Meirelles, L. D., Ferreira, A. S., Mehta, Y. R., & Figueiredo, J. E. F. (2014). Ice nucleation activity in *Pantoea ananatis* obtained from maize white spot lesions. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 1659–1666.