

FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Pseudomonas syringae subsp. *syringae* (van Hall 1902)
Janse 1982



SENASICA, AGRICULTURA SANA PARA EL BIENESTAR.

"ESTE PROGRAMA ES PÚBLICO, AJENO A CUALQUIER PARTIDO POLÍTICO. QUEDA PROHIBIDO EL USO PARA FINES DISTINTOS A LOS ESTABLECIDOS EN EL PROGRAMA"



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), [2021]

Impreso por SENASICA

Todos los derechos reservados.

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Sinonimias	1
Nombres comunes	1
Posición taxonómica	1
SÍNTOMAS.....	1
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	3
Aislamiento a partir de tejido vegetal	3
Morfología.....	4
Prueba Serológica ELISA.....	6
Interpretación de resultados	6
Técnicas moleculares.....	6
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	6
Controles para las pruebas moleculares.....	8
Interpretación de resultados de PCR punto final.....	8
Identificación del patógeno	10
REFERENCIAS	11
AVISO.....	12

***Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* (van Hall 1902) Janse 1982**

GENERALIDADES

El género *Pseudomonas* alberga 221 especies descritas, infecta un gran número de hospedantes agrícolas como: cítricos, peral, algunos frutales de hueso y algunas gramíneas. *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* es capaz de infectar alrededor de 180 especies de plantas, entre ellas almendro, cerezo, ciruelo, damasco, durazno, perales y arándanos.

Al igual que en otras enfermedades bacterianas, el material propagativo y las plántulas son la principal fuente de inóculo primario (Rodríguez, 2010), en campo puede diseminarse por la presencia de insectos y por exudados que pueden ser diseminados a nivel local por el salpique de agua, ya sea por el riego o la lluvia, y si existen vientos fuertes, la bacteria puede dispersarse a grandes distancias.

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Pseudomonas syringae subsp. *syringae* (van Hall 1902) Janse 1982

Sinonimias

Pseudomonas syringae van Hall 1902 (Approved Lists 1980)

<https://lpsn.dsmz.de/species/pseudomonas-syringae>

Nombres comunes

Cancro o tizón bacteriano, Cancro bacteriano del ciruelo, del durazno, Mancha foliar, Atizonamiento de la flor de peral y del arándano.

Posición taxonómica

Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, *Pseudomonas*, *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*,

(Bergey's, 2017).

SÍNTOMAS

Los síntomas característicos producidos por la infección de ésta bacteria incluyen: manchas circulares, rojizas con halo amarillo en las hojas, atizonamiento de hojas y flores,

muerte de ramas, canchros, exudados y lesiones en frutos. (Figura 1). La bacteria puede introducirse al hospedante a través de estomas, nectarios, heridas producidas por el manejo del cultivo, insectos o cualquier daño mecánico; una vez dentro, la bacteria coloniza los tejidos y da lugar a las lesiones en donde se producen exudados (Figura 2).



Figura 1. Síntomas ocasionados por *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*. Atizonamiento de las hojas en la imagen superior. Manchas foliares en arándano imagen inferior (Tomada de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/manejo-de-enfermedades-en-arandanos>)



Figura 2. Exudados bacterianos en cerezo (Tomada de <https://www.redagricola.com/cl/dinamica-invernal-de-poblaciones-de-pseudomonas-syringae-pv-syringae-en-yemas-de-cerezo/>)

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Aislamiento a partir de tejido vegetal

La obtención de cultivo puro de las *Pseudomonas* permite la verificación de viabilidad y patogenicidad de la cepa aislada. Para el aislamiento es importante la selección del tejido vegetal, en caso de contar con hojas, ramas y frutos, seleccionar de preferencia tejido fresco con manchas y la zona de avance de la infección. Realizar la técnica de inmersión de tejido en agua destilada estéril y sembrar por estría cruzada en medio B de King y Agar nutritivo.

Pruebas de patogenicidad. Las colonias purificadas se inoculan en hojas de tabaco y rodajas de papa.

Pruebas bioquímicas. *Pseudomonas syringae* pertenece al grupo de las fluorescentes, se recomienda realizar inicialmente las pruebas de LOPAT. *P. syringae* se ubica en el Grupo I: producción de Levana (+), reacción de oxidasa (-), pudrición de papa (-), producción de Arginina (-) e hipersensibilidad de tabaco (+), (Goszczyńska *et al.*, 2000). Para determinar las características bioquímicas de las *Pseudomonas*, realizar las pruebas del Cuadro 1.

Morfología

Las *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, con un tamaño que va de 0.5 -1 μm de ancho por 1.5-4 μm de largo. Son móviles por uno o varios flagelos polares (Rodríguez, 2006 y Schaad, 2001). El género forma colonias blanco grisáceas, transparentes, blanco lechosas y opacas, algunas generan pigmentos fluorescentes en medio B de King (Figura 3 a y b).

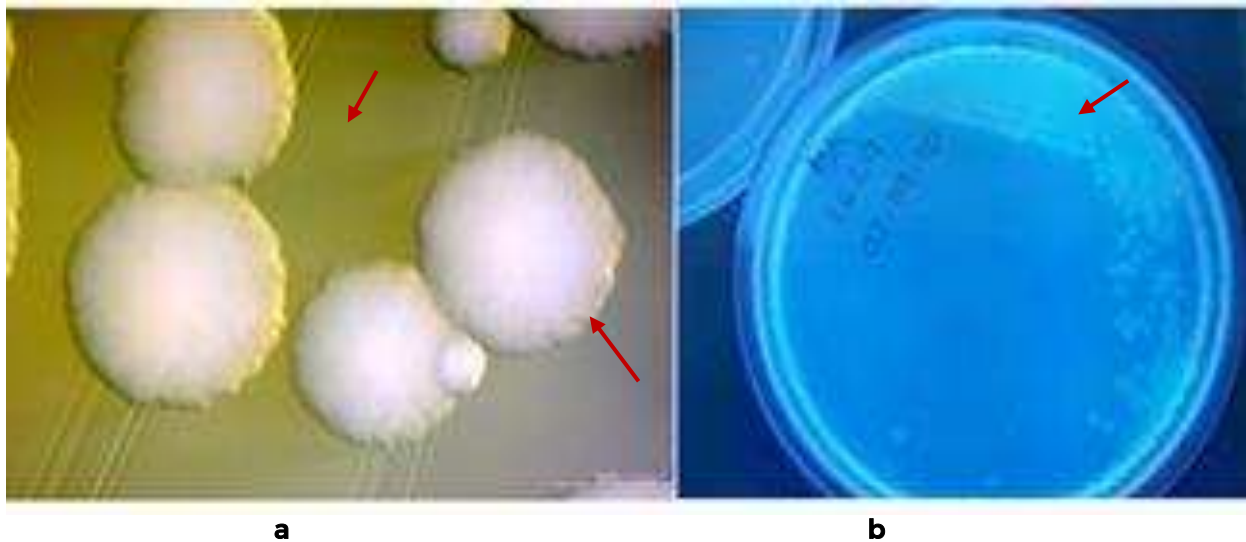


Figura 3. Morfología colonial. a) Colonias de *Pseudomonas syringae*, circulares, opacas, blancas con borde rugoso, observe la producción de la pigmentación fluorescente verde amarillo, difusible en medio B de King. b) Colonias de *Pseudomonas* bajo luz UV observe la fluorescencia.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la caracterización de *P. syringae*

Prueba	<i>P. syringae</i>
Gram	-
Pigmentación fluorescente	+
Levana	+
Oxidasa	-
Hidrolisis de arginina	-
Actividad pectolítica	-
Hipersensibilidad en tabaco	+
Crecimiento a 37 °C	-
Nitrato a partir de N ₂	-
Hidrolisis de gelatina	V
Utilización de:	
2-ketogluconato	+
Mannitol	V
Geraniol	-
Celobiosa	-
Sorbitol	+
Trealosa	-
Sucrosa	+
Meso-tartrato	+
D(-)-tartrato	-
D-arabinosa	-
L-rhamnosa	-
D-aspartate	-
Nucleación del hielo	+

(+) = reacción positiva, (-) = reacción negativa, ND (No determinada), V= variable

Tomado y traducido de: Schaad *et al.*, 2011

Prueba Serológica ELISA

Se recomienda utilizar el *kit* comercial de la marca Nano Diagnostics LLC (BS19-K1) que detecta a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Se considera una prueba complementaria. Nota: seguir las instrucciones del fabricante. Utilizar los controles positivo y negativo que incluye el *kit*.

Interpretación de resultados

Las lecturas se realizan cada 15 min después de adicionar el sustrato y los resultados se interpretan de acuerdo a los siguientes criterios:

La reacción se considera positiva (presencia de la bacteria) si la lectura de la densidad óptica es mayor o igual a 3 veces el valor de la media del testigo negativo (muestra sana o solución amortiguadora). Si el testigo negativo presenta en promedio valores de densidad óptica menores de 0.03, solo se consideran positivas aquellas muestras con densidades ópticas mayores a 0.100.

Cuando solo uno de los pozos de las muestras es positivo y/o si la diferencia con su repetición es mayor o igual al 50% de su valor, la muestra debe procesarse nuevamente para determinar la presencia de la bacteria.

Técnicas moleculares.

Se recomienda realizar la extracción de DNA total con alguno de los siguientes *kits* comerciales y seguir las instrucciones del fabricante.

- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
- PlantDNAzol™ Reagent

La extracción de DNA total también puede realizarse con CTAB 2 %.

Nota: Se puede emplear algún otro protocolo de extracción de DNA total, siempre y cuando este cumpla con los parámetros de calidad e integridad (Relación $A_{260}/_{280}$ entre 1.8 y 2.0 y relación $A_{260}/_{230}$ entre 2.0 y 2.2).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR punto final es una variante de la PCR, en la cual, el producto final es visualizado en un gel de agarosa, ésta proporciona evidencia cualitativa de la presencia de un fragmento de DNA de interés en la muestra analizada.

Para la detección de las *Pseudomonas* se deben emplear los siguientes pares de iniciadores *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* OWB575(S)/OWB576(A) (Margreet et al., 2003), y *Pseudomonas syringae* Psy F/ Psy R (Guilbaud, et al. 2016), (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de iniciadores empleados para la detección de *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* por PCR punto final

Bacteria	Tipo	Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño (pb)
<i>P. syringae</i>	Sentido	Psy F	ATGATCGGAGCGGACAAG	61	144
	Antisentido	Psy R	GCTCTTGAGGCAAGCACT		
<i>P. syringae</i> subsp. <i>syringae</i>	Sentido	OWB575 (S)	AACTGAAAAACACCTTGGGC	58	303
	Antisentido	OWB576 (A)	CCTGGGTTGTTGAAGTGGT		

Se recomienda preparar la mezcla de reacción de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 3, se deben realizar dos repeticiones por muestra por reacción. Las condiciones y programa de amplificación (Cuadro 4) se debe elegir de acuerdo con el par de iniciadores empleados.

Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.16 mM	0.4
Iniciador sentido	10 µM	0.4 µM	1.0
Iniciador antisentido	10 µM	0.4 µM	1.0
Taq DNA Pol	5 U/µL	0.06 U/µL	0.3
DNA	20 - 50 ng/µL	4 - 10 ng/µL	5.0
Agua grado biología molecular	-	-	14.05
		Volumen final	25

Cuadro 4. Programa de amplificación para los iniciadores PsyF/PsyR y OWB575(s)/OWB576(A)

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	4 min	1
94 °C	30 s	35
*	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	∞

*La temperatura de alineamiento para cada par de iniciadores se especifica en el Cuadro 2

Al concluir el programa de termociclaje, correr los productos de PCR mediante electroforesis durante 60 min a 95 V en un gel de agarosa 1-1.5 %, sumergido en *buffer* TAE 1X. Finalmente, observar el gel en un transiluminador de luz UV, tomar la fotografía, anotar los datos de la muestra y guardar la imagen.

Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final es necesario incluir los controles con una repetición:

Control positivo: provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos de las muestras, en caso de haberlos. El control positivo está conformado por una concentración conocida de DNA genómico o DNA plasmídico.

Control negativo de matriz: corresponde a DNA extraído de tejido vegetal sin *P. syringae* subsp. *syringae*. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos: material que contiene todos los componentes de la reacción, pero sin ácidos nucleicos adicionales a los oligonucleótidos. Permite descartar falsos positivos y contaminantes en la reacción de PCR.

Interpretación de resultados de PCR punto final

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo con el par de iniciadores Psy F/Psy R, debe generar un amplicón de 144 pb (Figura 4).

El control positivo con el par de iniciadores OWB575 (S) y OWB576 (A), debe generar un amplicón de 303 pb (Figura 5).

Los controles negativos de reactivos y de matriz no deberán presentar amplificación en ninguno de los ensayos de PCR.

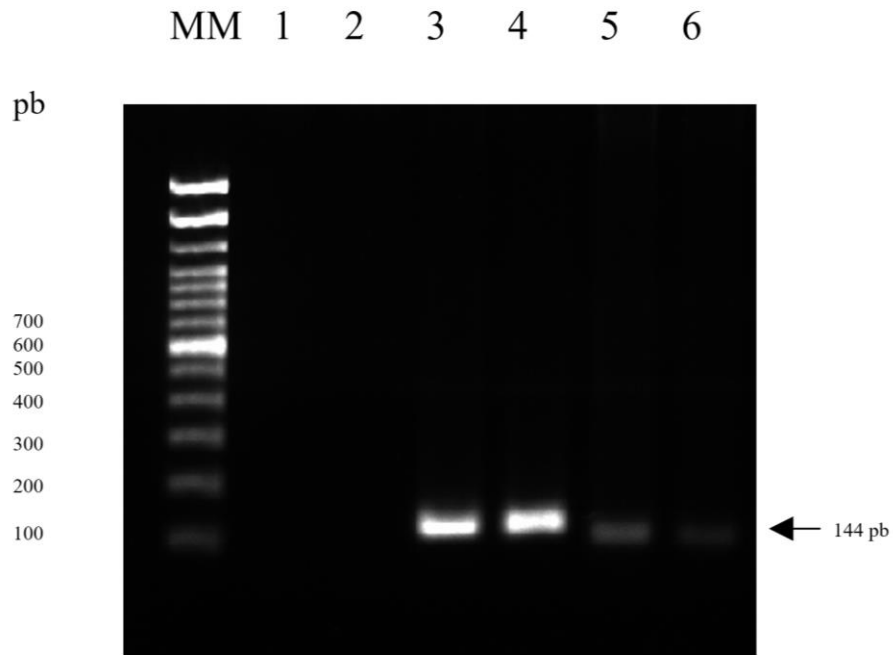


Figura 4. Productos de PCR con los iniciadores Psy F/Psy R. Marcador molecular (MM) 1 Kb Plus DNA Ladder (marca Invitrogen). 1 y 2) Control negativo. 3 y 4) Control positivo. 5 y 6) Muestras. Amplicón esperado de 144 pb

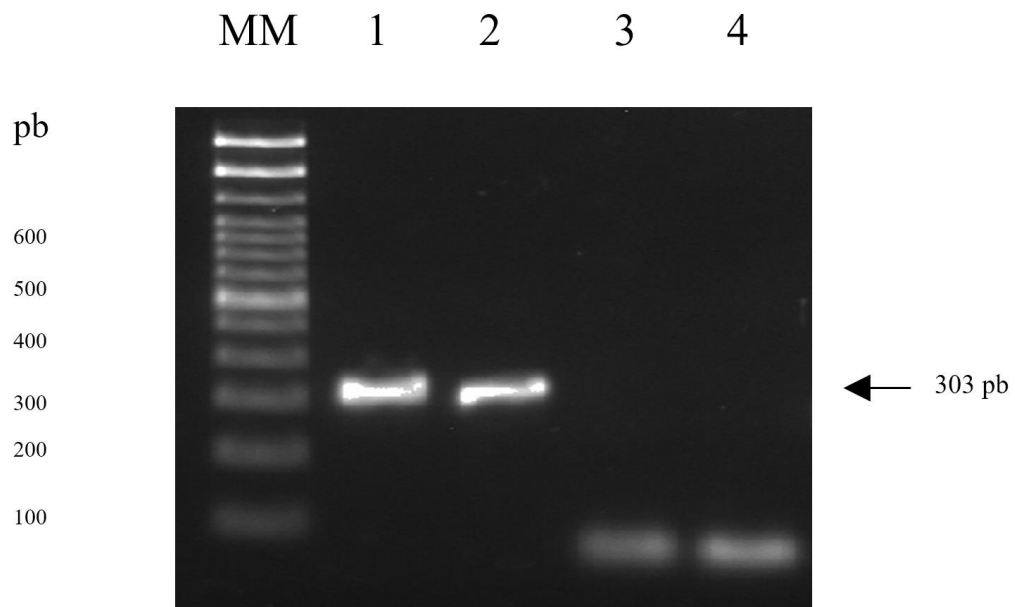


Figura 5. Productos de PCR con los iniciadores OWB575(S)/OWB576 (A). Marcador molecular (MM) 1 Kb Plus DNA Ladder (marca Invitrogen). 1 y 2) Control positivo. 3 y 4) Control negativo. 5 y 6) Muestras. Amplicón esperado de 303 pb

Identificación del patógeno

Para reportar la identificación de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, es necesario la detección en conjunto de las siguientes pruebas: aislamiento de la bacteria y pruebas LOPAT, prueba de ELISA positiva y amplificación positiva del ensayo de PCR punto final.

Como prueba de corroboración, se sugiere secuenciar el fragmento obtenido en el ensayo de PCR punto final, a partir del extracto de DNA de cultivos puros.

Conservar las muestras de acuerdo a su Sistema de calidad, en caso de resultados positivos: evidencia fotográfica de síntomas y signos, preservación del tejido vegetal y ácidos nucleicos. Registro de resultados de pruebas moleculares (geles).

Requerimientos para corroboración: Informe técnico, muestra problema, ácidos nucleicos con valores de calidad y concentración, fotografía de geles, secuencias genéticas generadas por el secuenciador y su respectivo electroferograma, así como evidencia de alineamiento y/o análisis filogenético cuando aplique.

REFERENCIAS

- Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Taxonomic Outline. (2017)
- Donoso, E., Caballero, J.M., Bratti, J., Garcia, C. Fitnova SPA
<https://www.redagricola.com/cl/dinamica-invernal-de-poblaciones-de-pseudomonas-syringae-pv-syringae-en-yemas-de-cerezo/>
- Goszczynska, T., Serfontein, J.J. and Serfontein, S. 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology . Bacterial diseases unit ARC-PPR. South Africa. 82p.
- Guilbaud C., Morris C. E., Barakat M., Ortet P. and Berge O. 2016. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. FEMS Microbiology Ecology.92.fiv146.
- Brouwer, M., B. Lievens, W. Van Hemelrijck, G. Van den Ackerveken, B.P.A. Cammue, B.P.H.J. Thomma. 2003. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR, FEMS Microbiology Letters, Volume 228, Issue 2, November 2003, Pages 241-248, [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00759-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00759-6)
- Rodríguez Mejía M. L. 2006. Manual para la Identificación de Bacterias Fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo. México. 146 p.
- Rodríguez M. M .L. 2010. Enfermedades Bacterianas en Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México.
- Schaad N.W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria APS Press. 373 p.
- Vaseghi A., Safaei N., Bakhshinejad B., Mohsenifar A., and Sadeghizadeh M. 2013. Detection of *Pseudomonas syringae* pathovars by thiol-linked DNA-Gold nanoparticle probes. Sens Actuators B Chem, 181:644-651

Referencias electrónicas de consulta:

- <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/manejo-de-enfermedades-en-arandanos->
<https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>
<https://lpsn.dsmz.de/species/pseudomonas-syringae>

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el procedimiento de forma correcta.

Forma recomendada de citar

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2021. Ficha técnica para el diagnóstico de: *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*. Tecámac, México: Autor.

Esta ficha técnica fue elaborada, revisada y validada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Dr. Ángel Ramírez Suárez Subdirector Técnico	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández Jefa del Departamento de Fitopatología	Revisó
Biol. Bárbara Hernández Macías Coordinador del Laboratorio de Bacteriología Dr. Andrés Aguilar Granados Técnico del Laboratorio de Bacteriología	Elaboraron

CONTACTO

lab.bacteriologia@senasica.gob.mx
Teléfono y extensión (55) 59051000 ext. 51314, 51333

Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoonosanitarias
- Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

800 987 9879

Quejas • Denuncias
Órgano Interno de Control
en el Senasica

55 5905.1000

Ext. 51648

gob.mx/agricultura

gob.mx/senasica



“Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa”