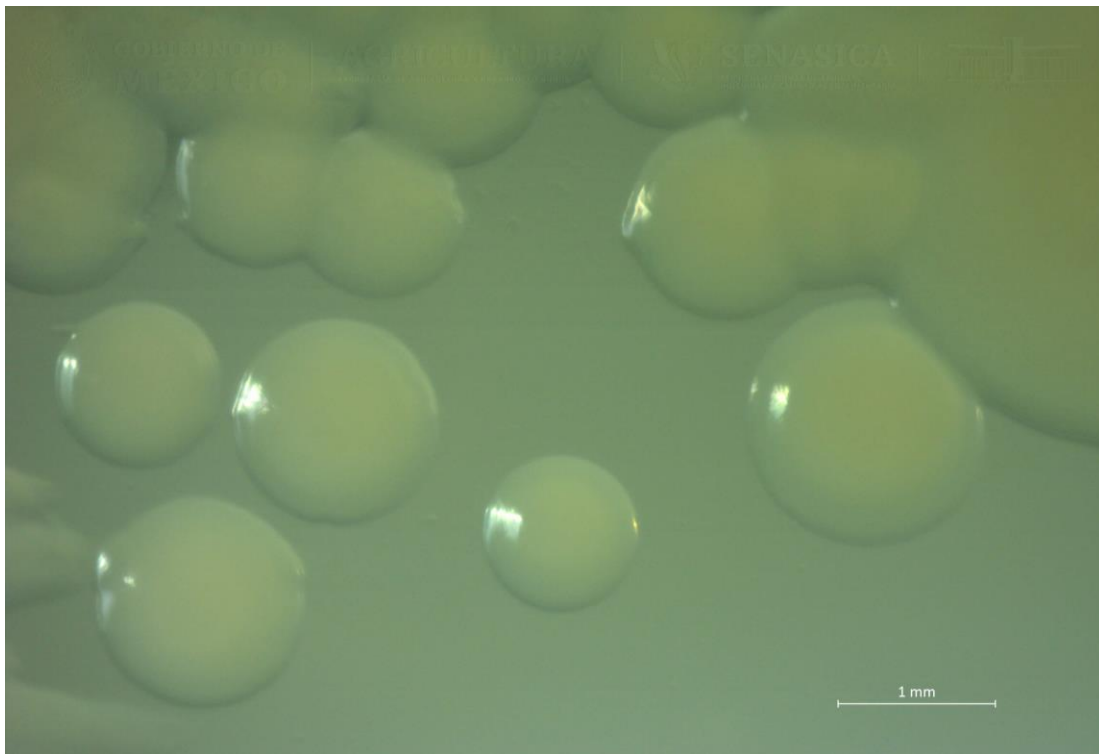


FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Acidovorax citrulli (Schaad et al., 1978),
Schaad et al., 2009 comb. nov.



SENASICA, SALUD PARA LAS PLANTAS Y ANIMALES.

"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.

Imagen de Portada: Colonias de *Acidovorax citrulli*, Laboratorio de Bacteriología, CNRF-SENASICA

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	1
Nombre científico	1
Sinonimias	1
Nombres comunes	1
Posición taxonómica	1
SÍNTOMAS.....	2
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	3
Aislamiento.....	3
A partir de tejido vegetal infectado	3
A partir de semillas.....	3
Morfología.....	4
Pruebas de patogenicidad	4
Pruebas bioquímicas.....	5
Técnica de ELISA	5
Interpretación de resultados.....	5
Técnicas moleculares.....	6
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	6
PCR tiempo real	8
Controles para las pruebas moleculares.....	9
Interpretación de resultados PCR punto final	9
Interpretación de resultados PCR tiempo real	10
Identificación de la plaga/patógeno	11
REFERENCIAS	12
AVISO	13

***Acidovorax citrulli* (Schaad et al., 1978), Schaad et al., 2009 comb. nov.**

GENERALIDADES

La bacteria *Acidovorax citrulli* es un patógeno que ocasiona la enfermedad conocida como “Marchitez bacteriana del fruto de las cucurbitáceas”, su hospedante principal es la sandía y es considerada un patógeno con alto potencial de destrucción, capaz de ocasionar pérdidas del 100 % en vivero o plantación (Elizalde, 2011). La semilla es el medio más importante de introducción de la bacteria a áreas geográficas libres de la enfermedad y su diseminación a cortas distancias puede ocurrir por salpique de agua de lluvia.

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Nombre científico

Acidovorax citrulli (Schaad et al., 1978), Schaad et al., 2009 comb. nov.

Sinonimias

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* (Schaad et al., 1978) Willems et al., 1992.

Pseudomonas avenae subsp. *citrulli* (Schaad et al., 1978) Hu et al., 1991.

Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. *citrulli* Schaad et al., 1978.

Nombres comunes

Mancha bacteriana del fruto de las cucurbitáceas (español).

Bacterial fruit blotch (inglés).

Seedling blight (inglés).

Posición taxonómica

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Comamonadaceae

Género: *Acidovorax*

Especie: *A. citrulli* (Schaad et al., 1978), Schaad et al., 2009 comb. nov.

(CABI, 2020).

SÍNTOMAS

La bacteria ataca todos los estados fenológicos de las cucurbitáceas. En plántula, los síntomas se manifiestan en hojas cotiledonales y se observan como pequeñas manchas de aspecto acuoso que se tornan oscuras conforme crecen (**Figura 1a**). En campo, los síntomas en las hojas verdaderas se presentan como pequeñas manchas acuosas amarillentas y, conforme se desarrollan, producen tejido necrótico en el centro de la lesión con halos cloróticos muy pronunciados (**Figura 1b**). En fruto, las lesiones inician en la superficie como pequeñas manchas de apariencia grasosa, a medida que crecen toman una coloración verde oscuro con márgenes irregulares y aspecto acuoso (**Figura 1c y d**).

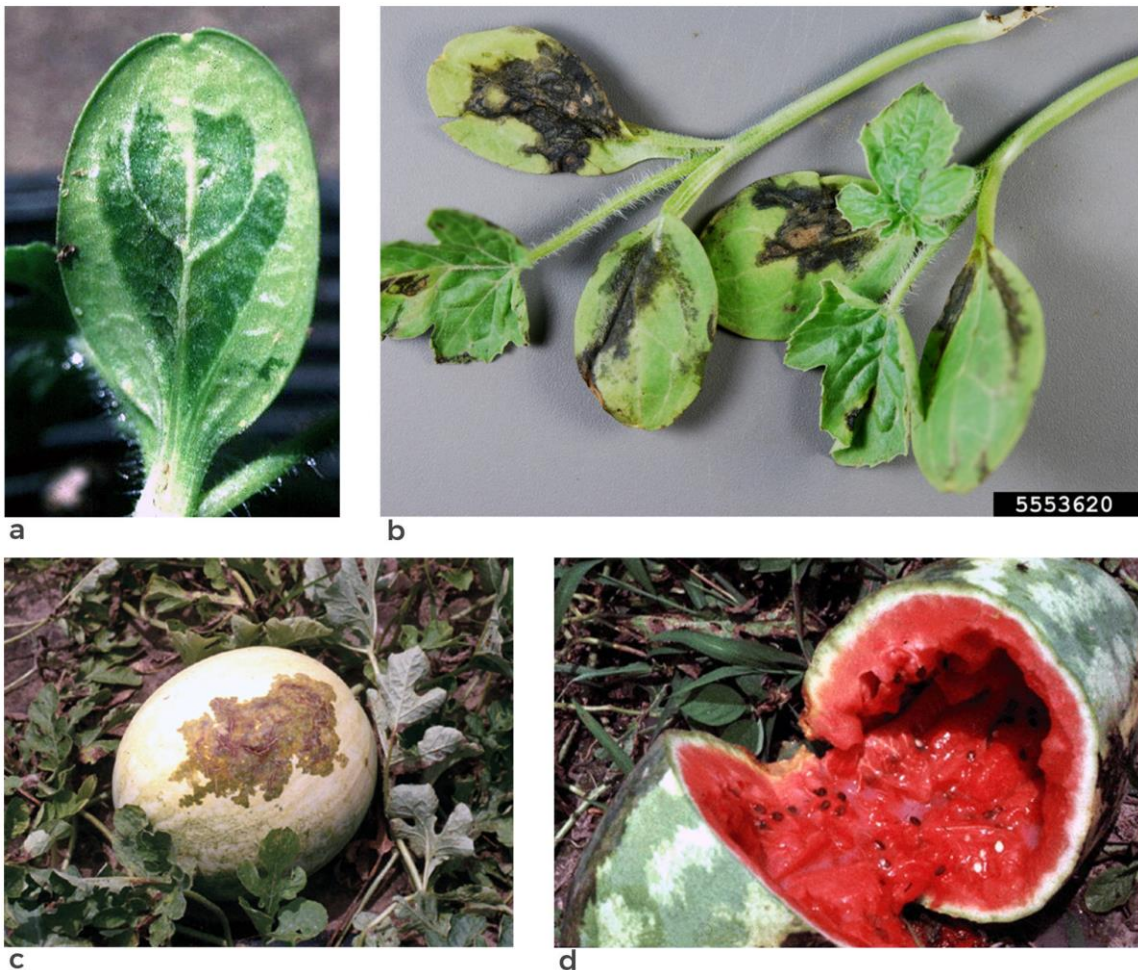


Figura 1. Síntomas de *Acidovorax citrulli* en cucurbitáceas. a) Manchas acuosas en plántula. b) Tejido necrótico en hojas de sandía. c) Mancha grasosa en fruto de sandía. d) Pudrición del fruto de sandía. a), c) y d) Walcott, R. R. (2005), b) University of Delaware (2017).

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

El diagnóstico debe basarse en un método integrado para dar mayor confiabilidad a los resultados, por ello la detección de esta enfermedad implica el reconocimiento de los síntomas característicos, aislamiento, caracterización morfológica y bioquímica de las cepas bacterianas, determinación patogénica de los aislamientos y el empleo de técnicas serológicas y moleculares.

Aislamiento

A partir de tejido vegetal infectado:

Para el aislamiento es importante la selección del tejido vegetal. En hojas 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 (BK) y Agar nutritivo (AN).

A partir de semillas:

El protocolo de la Federación Internacional de semillas indica partir de una muestra de mínimo 10 000 semillas y, si la cantidad de semilla lo permite, hasta 30 000 semillas por lote (ISF, 2018). Cuando no se disponga de la cantidad mínima recomendada, se sugiere pesar el total de la semilla, dividirla en dos partes y utilizar una parte para el aislamiento, siguiendo la metodología descrita a continuación:

- 1) Lavar las semillas con agua destilada estéril para retirar los agroquímicos con los que viene tratada (cuando sea el caso) y dejar secar sobre papel absorbente.
- 2) En condiciones de asepsia, desinfectar las semillas con hipoclorito de sodio al 1 % y enjuagar tres veces con agua destilada estéril.
- 3) Colocar las semillas en un matraz esterilizado y añadir medio de cultivo BK líquido en un volumen equivalente al doble del peso de la semilla. Incubar a 28 °C por 48 h.
- 4) Realizar cuatro diluciones seriadas en tubos con medio de cultivo líquido (BK) o agua destilada estéril. Tomar 60 µL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , colocarlos en cajas Petri con medio de cultivo sólido (BK o AN), dispersar con ayuda de una varilla e incubar a 28 °C durante 72 h.

Transcurridos tres a cinco días de incubación deben observarse colonias de color blanco a crema.

Morfología

El género *Acidovorax* lo conforman bacterias Gram negativas de 0.2 a 0.8 x 1.0 a 0.5 μm , con 1 a 2 flagelos polares, desarrollan colonias blancas circulares, convexas, de bordes lisos y consistencia húmeda, no producen pigmento fluoresceína en medio de cultivo BK (Figura 2).

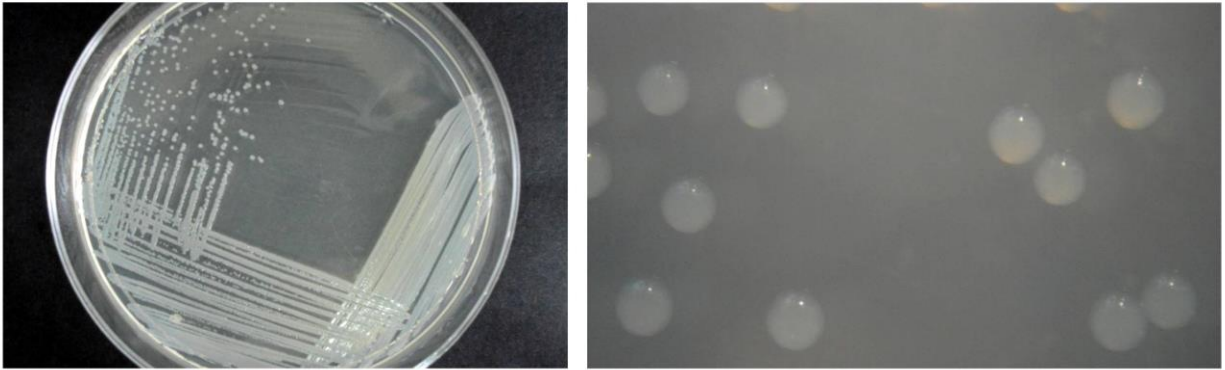


Figura 2. Colonias de *Acidovorax citrulli* en medio B de King

Prueba de patogenicidad

La prueba se debe realizar a partir de una cepa pura, preparar una suspensión bacteriana (1×10^8 UFC) e inocular por infiltración hojas de tabaco o plántulas de sandía, pepino, melón o calabaza.

La prueba se considera positiva si dentro de las 24 a 48 h posteriores a la inoculación la zona infiltrada presenta necrosis (Figura 3a y b).



Figura 3. Pruebas de patogenicidad. a) Hipersensibilidad en tabaco. b) Hipersensibilidad en plántula (hoja cotiledonar) de sandía.

Pruebas bioquímicas

Para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de *A. citrulli* la cepa pura se debe hacer crecer en presencia de determinadas sustancias nutritivas y/o metabolismo de algunos azúcares (Cuadro 1).

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la caracterización de *A. citrulli*

Prueba	Resultado
Tinción de Gram y/o reacción de KOH	Gram negativa /KOH (+)
Hipersensibilidad en tabaco	+
Reacción de O/F	+/-
Crecimiento a 41 °C	+
Reducción de nitratos	-
Oxidasa	+
Hidrólisis de almidón	-
Producción de ácido a partir de:	
D-xilosa	+
L-arabinosa	+
D-fructuosa	-
D-manitol	-
Sacarosa	-
Sorbitol	-

(+) = reacción positiva

(-) = reacción negativa

Tomado y traducido de Schaad *et al.*, (2001)

Técnica de ELISA

Esta técnica es una prueba complementaria (no recomendable para analizar semillas). Para realizarla se sugiere utilizar el *kit* comercial de la marca **Agdia®** con número de catálogo **SRA 14800**. Seguir el protocolo e instrucciones del fabricante.

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, y 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

La extracción de DNA total se puede realizar con alguno de los siguientes kits comerciales y seguir las instrucciones del fabricante.

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

Adicionalmente la extracción también puede realizarse con CTAB 2 %.

Nota: se puede emplear algún otro protocolo o *kit* comercial de extracción de DNA, siempre y cuando este cumpla con los parámetros de calidad e integridad (Relaciones de absorbancia: $A_{260/280} = 1.8-2.0$ y $A_{260/230} = 2.0-2.2$)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la detección de *Acidovorax citrulli* se deben emplear los siguientes pares de iniciadores:

El par de iniciadores BX-L1 y BX-S-R2 estandarizados son los propuestos por Bahar *et al.*, (2008) y son recomendados para tejido vegetal y cepas bacterianas (**Cuadro 2**).

El par de iniciadores WFB1 y WFB2 diseñados por Walcott y Gitaitis (2000) se basan en el gen 16S rRNA y puede utilizarse para cualquier tipo de material vegetal, semillas y colonias bacterianas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de iniciadores para la detección de *Acidovorax citrulli* por PCR punto final

Tipo	Nombre del iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
Sentido	BX-L1	CAGCTGGGAGCGATCTTCAT	279
Antisentido	BX-S-R2	GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA	
Sentido	WFB1	CAGCTGGGAGCGATCTTCAT	360
Antisentido	WFB2	GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA	

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.

Cuadro 3. 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	0.2 mM	0.4
Iniciadores BX-L1 o WFB1	10 μM	0.4 μM	1.0
Iniciadores BX-S-R2 o WFB2	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

Las condiciones para la amplificación se muestran en los Cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Programa de amplificación para los iniciadores BX-L1 y BX-S-R2

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	1
95 °C	30 s	30
65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1

Cuadro 5. Programa de amplificación para los iniciadores WFB1 y WFB2

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	10 min	1
95 °C	30 s	35
55 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1

Al concluir el programa de termociclaje, correr los productos de PCR mediante electroforesis.

PCR tiempo real

El par de iniciadores y sonda estandarizados están incluidos en el protocolo para la detección de *A. citrulli* en melón, sandía y calabaza de la Federación Internacional de Semillas (**Cuadro 6**).

Se recomienda preparar la mezcla de reacción de acuerdo a lo indicado en el **Cuadro 7**.

Cuadro 6. Iniciadores para la detección de *A. citrulli* por PCR tiempo real (ISF, por sus siglas en inglés *International Seed Federation*)

Tipo	Nombre del iniciador	Secuencia (5'- 3')
Sentido	2549	GAGTCTCACGAGGTTGTT
Antisentido	2550	GACCCTACGAAAGCTCAG
Sonda Taqman	2551	6FAM-TGCAGCCCTTCATTGACGG-BHQ1

Cuadro 7. Mezcla de reacción para la PCR tiempo real

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10X	1X	2.2
MgCl ₂	50 mM	4 mM	1.76
dNTP	10 mM	0.3 mM	0.6
Iniciador 2549	10 µM	0.3 µM	0.6
Iniciador 2550	10 µM	0.3 µM	0.6
Sonda 2551	10 µM	0.04 µM	0.1
Taq DNA pol	5 U/µL	0.09 U/µL	0.4
DNA	20 - 50 ng/µL	3.64 - 9 ng/µL	4.0
Agua grado biología molecular	-	-	11.74
		Volumen final	22

El programa de termociclaje se muestra en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Programa de amplificación para la PCR tiempo real

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40
60 °C	45 s	

Nota: utilizar tubos o placas ópticas para qPCR de acuerdo al tipo/marca de termociclador utilizado. Las condiciones de este ensayo se estandarizaron en un termociclador marca Bio-Rad CFX-96 real-time thermocycler (Bio-rad Laboratories).

Controles para las pruebas moleculares

Los ensayos de PCR punto final y tiempo real deben incluir los siguientes controles con una repetición:

Control positivo: está conformado por una concentración conocida de DNA (genómico o plasmídico). Asegura la funcionalidad de los reactivos de PCR.

Control negativo de matriz: corresponde a DNA extraído de tejido vegetal sin la bacteria. 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 DNA. Permite descartar falsos positivos y contaminantes de la reacción.

Interpretación de resultados PCR punto final

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo con el par de iniciadores BX-L1 y BX-S-R2, debe generar un amplicón de 279 pb (**Figura 4**).

El control positivo con el par de iniciadores WFB1 y WFB2, debe generar un amplicón de 360 pb (**Figura 5**).

Los controles negativos de matriz y reactivos no deben mostrar amplificación en ninguno de los ensayos de PCR.

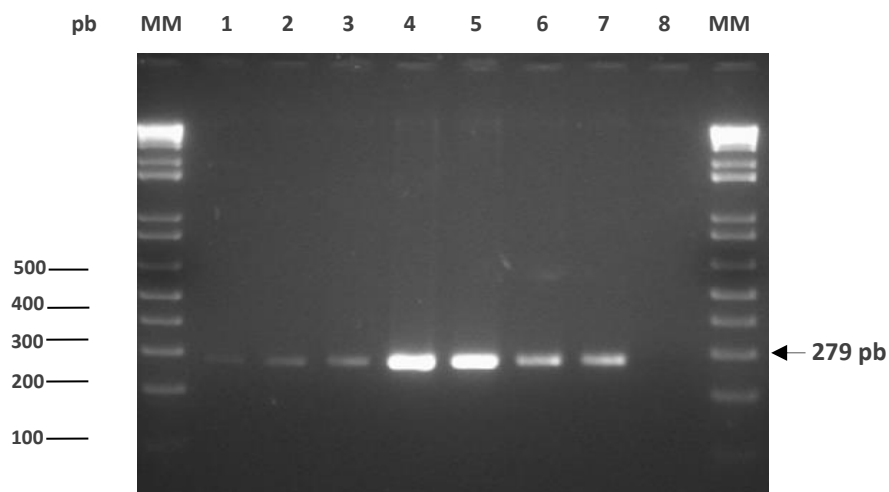


Figura 4. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores BX-L1 y BX-S-R2. 1), 2), 3), 4) y 5) Muestras. 6) y 7) Controles positivos. 8) Control negativo de reactivos. Marcador Molecular (MM) 1 Kb. Amplicón esperado de 279 pb

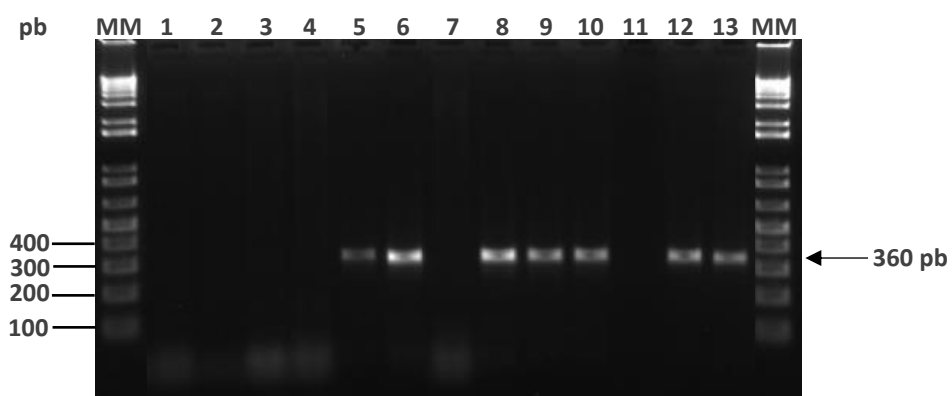


Figura 5. Amplificación de los productos de PCR con los iniciadores WFB1 y WFB2. 1) y 2) Control negativo de reactivos. 3) y 4) Control negativo de matriz. 5) y 6) Control positivo. 7), 8), 9) y 10) Muestras. 11) Sin muestra. 12) y 13) Muestra. Marcador Molecular (MM) 1 Kb. Amplicón esperado de 360 pb

Interpretación de resultados PCR tiempo real (qPCR)

El control positivo debe generar una curva sigmoidea que presente tres fases: basal, exponencial y estacionaria o platea, con un valor numérico de cuantificación (*Cycle of quantification* o *Ct* de *Cycle threshold*) $15.0 \leq Cq \leq 35.0$ (Figura 6a).

El **control negativo** de reactivos debe permanecer en la línea basal por debajo del umbral establecido "*Threshold*" y no debe presentar ningún valor de cuantificación ($Cq = N/A$ / $Cq = 0.00$) (Figura 6c).

Se considera como **resultado positivo** a aquellas muestras que generen una curva sigmoidea con un valor de $15.0 \leq Cq \leq 35$ (Figura 6b).

Se considera como **resultado negativo** a aquellas muestras que generen un $Cq = 0.00$.

Las muestras que presenten valores de Cq entre 34.99 y 36.00 deben ser confirmadas con una segunda prueba de qPCR.

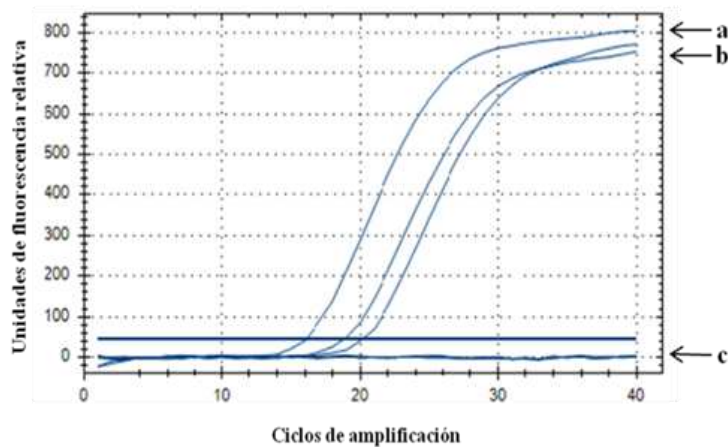


Figura 6. Amplificación de las muestras mediante qPCR con los iniciadores 2549 y 2550 y la sonda 2551. Unidades de fluorescencia relativa frente a los ciclos de amplificación. a) Control positivo. b) Muestra. c) Control negativo de reactivos. Fluoróforo FAM. Valor numérico de cuantificación (Cq) esperado < 35.0

Identificación de la plaga/patógeno

Para reportar la identificación positiva de *A. citrulli*, es necesario realizar las siguientes pruebas: aislamiento y caracterización de la colonia bacteriana, caracterización por pruebas bioquímicas, amplificación del ensayo de PCR punto final con al menos uno de los pares de iniciadores mencionados y amplificación del ensayo de PCR tiempo real.

Como prueba de corroboración, se sugiere secuenciar por Sanger el fragmento obtenido en el ensayo de PCR punto final, de al menos uno de los pares de iniciadores mencionados, a partir del extracto de DNA de cultivos puros.

En caso de realizar una detección positiva de *A. citrulli*, deberá enviar a corroboración al CNRF de acuerdo a lo especificado en la Circular 40.

REFERENCIAS

- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R. y Burdman, S. (2008). New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Pathology*. 57: 754-763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01828.x>
- CABI. Centre for Agricultural Bioscience. (2020). Data sheet *Acidovorax citrulli* (fruit blotch). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/2676>
- Elizalde, A., Jiménez, J. y Leyva S. (2011). Evaluación del Riesgo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* asociada a semilla de Sandía de Importación a México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 29(2).
- ISF. International Seed Federation. (2018). Method for the detection of *Acidovorax citrulli* on melon, watermelon, squash and squash rootstock seed. <https://worldseed.org/our-work/phytosanitary-matters/seed-health/ishi-veg-protocols/>
- Schaad *et al.* (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third edition. APS PRESS.
- University of Delaware. (2017). (Nancy Gregory) bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* ssp. *citrulli*) (Schaad *et al.* 1978) Willems *et al.* 1992. <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5553620>
- Walcott, R. R. y Gitaitis, R. D. (2000). Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Watermelon Seed Using Immunomagnetic Separation and the Polymerase Chain Reaction. *Plant disease*. 84: 470-474. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.470>
- Walcott, R. R. 2005. Bacterial fruit blotch of cucurbits. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2005-1025-02

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de *Acidovorax citrulli* (Schaad *et al.*,1978) Schaad *et al.*, 2009 comb.nov. tiene 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. Detección de *Acidovorax citrulli*. Versión 1.0. Tecámac, México: Autor.

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

Dr. Angel 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 M. en C. Sandra Lourdes Moya Hernández 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”