



Senasica

SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN

SAGARPA



**Dirección General de Sanidad Vegetal  
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria**

# **Protocolo de Diagnóstico**

***Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896)  
Yabuuchi *et al* 1995**

**(Identificación morfológica, ELISA y PCR)**

**Versión 00**

**Junio 2014**

**INDICE**

	<b>Pág.</b>
I. Antecedentes	<b>4</b>
1.- Posición taxonómica	
2.- Objetivo	
3.- Origen y distribución	
II. Rango de Hospedantes	<b>4</b>
III. Síntomas y signos	<b>6</b>
IV. Transmisión y diseminación	<b>8</b>
V. Importancia	<b>8</b>
VI. Protocolo de Diagnóstico	<b>8</b>
1.- Envío-recepción	
2.- Recepción e inspección	
3.- Almacenamiento	
4.- Técnicas de detección	
5.- Destrucción de las muestras	
VII. Referencias	<b>28</b>

## I. ANTECEDENTES

**Nombre:** *Ralstonia solanacearum*

**Nombre Común:** Marchitez bacteriana de la papa

### 1.- Posición Taxonómica:

*R. solanacearum* E. F. Smith se clasifica:

**Dominio:** Bacteria

**Phylum:** Proteobacteria

**Clase:** Betaproteobacteria

**Orden:** Burkholderiales

**Familia:** Ralstoniaceae

**Género:** *Ralstonia*

**Especie:** *Ralstonia solanacearum*, (NCBI, 2011).

### 2.- Objetivo:

Describir los procedimientos o metodologías aplicados a la identificación morfológica de *Ralstonia solanacearum* y su corroboración mediante técnicas moleculares.

### 3.- Origen y distribución

La Marchitez bacteriana o podredumbre parda de la papa provocada por *Ralstonia solanacearum*, es la segunda enfermedad más importante de este cultivo a escala mundial después del Tizón Tardío causado por *Phytophthora infestans*, reduce siempre la productividad del cultivo y puede ocasionar grandes pérdidas. Dicha bacteria puede infectar los tubérculos de papa en forma latente, es decir, sin que se presenten síntomas de la enfermedad.

La bacteria está adaptada para sobrevivir en climas fríos (menor a 18°C) y a grandes altitudes (mayor a 2,500 m.s.n.m.) donde se desarrolla muy lentamente o permanece en estado de latencia dentro de la planta y tubérculos infectados, sin que los síntomas se manifiesten, convirtiéndose en un peligro potencial, ya que puede ocasionar la pérdida total del cultivo si éstos tubérculos, aparentemente sanos son usados como semilla en zonas libres del patógeno.

Los tubérculos semilla infectados constituyen una amenaza para el cultivo por las pérdidas directas de producción que puede ocasionar y por la capacidad de la bacteria de infectar, propagarse y perpetuarse en el suelo, en el agua de riego y en otras plantas hospedantes.

## II. RANGO DE HOSPEDANTES

Su hospedante natural es la papa (*Solanum tuberosum* L.), el jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.), el chile (*Capsicum vulgare*) el betabel (*Beta vulgaris*) se ha descrito como un hospedante asintomático, la bacteria coloniza las raíces, la berenjena (*Solanum melongena* L.) y el toloache (*Datura stramonium* L.) son susceptibles al inocularlas artificialmente (Kado, 2010).

*Ralstonia solanacearum* difiere en el rango de hospedantes, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas. Por esta razón, durante las últimas tres décadas han sido utilizadas las razas y los biovars como una clasificación informal a nivel infrasub-específico, el cual no se rige por el Código de Nomenclatura de Bacterias.

La raza 1 (biovars 1, 3 o 4) atacan a un gran número de plantas incluyendo papa, tomate y solanáceas en general, la raza 2 (biovars 1 o 3) afecta plátano, banano y heliconias, la raza 3 (biovar 2) es considerada

específica de la papa, tomate, chile y geranio, la raza 4 (Biovar 4) ataca jengibre y la raza 5 ataca mora (Hayward, 1991).

**Tabla No. 1** Diferenciación de las Razas de *Ralstonia solanacearum*

Razas	Biovares	Hospedantes	Distribución Geográfica
1	1,3,4	Tabaco Jitomate Papa	Zonas bajas de los trópicos
2	1,3	Musáceas (plátano)	América y Asia Tropical
3	2 <sup>a</sup>	Papa, Jitomate, Geranio	Zonas Frías
4	4	Jengibre	
5		Mora	
No conocida	2T	Numerosos	Principalmente en zonas bajas de Sudamérica

Las pruebas de laboratorio estandarizadas han permitido clasificar inicialmente a *Ralstonia* en 5 razas y 5 biovares (Cuadro 1) basándose en el rango de hospedante (Buddenhagen y Kelman, 1964), la diferencia en la reacción de hipersensibilidad al ser inoculadas las cepas en plantas de tabaco (Cuadro 4) (Janse, 1991) y la capacidad para oxidar varios disacáridos y hexosa (Hayward, 1964, He *et al.* 1983). Cuadro 5.

Actualmente se tiene la propuesta para la caracterización de la especie la cual se basa en una nueva clasificación del filotipo/secuevar con la raza/biovar como referencia (NAPPO, 2010). Este esquema nuevo de clasificación intraespecífico se basa en el análisis de la secuencia de los nucleótidos de tres genes marcadores, (Fegan y Prior 2005):

- la región espaciadora intergénica del operón *rrn* (ITS, por su sigla en inglés)
- la endoglucanasa (*eg*)
- el gen regulador transcripcional (*hrpB*)

Lo cual nos permite distinguir las cepas de *R. solanacearum* en cuatro filotipos que acomodan los secuevares como subgrupos.

El filotipo con la clasificación secuevar es bastante constante con la raza y el sistema de biovar, y en algunos casos, proporciona una indicación del origen geográfico o de la patogenicidad de las cepas (Cuadro 2).

**Tabla No. 2** Clasificaciones interespecies e intraespecies del complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*

Filotipo	Secuevar	Raza	Biovar	Rango de hospedante	Origen geográfico
I	12-18	1,4,5	3,4,5	Rango de hospedante amplio	Asia, Australia y Américas
II a*	1-2	3	2,2T	Papa, geranio y otras solanáceas	Sudamérica
	3-4	2	1	Banano y otras plantas musáceas	Caribe, Brasil y Filipinas
II b	5-7	1-2	1	Rango de hospedante amplio	Américas
III	19-23	Indefinido	1,2T	Rango de hospedante amplio	África
IV	9-11	Indefinido	1,2,2T,BDB, RG**	Clavo, papa o banano	Indonesia y Asia

\* El filotipo II se ha dividido en subgrupos distintos(a y b) según los autores (Fegan y Prior 2005, Denny 2006, Castillo y Greenberg 2007, Cellier y Prior, 2010).

\*\* BDB: mancha rojiza del seudotallo del banano; RG: *Ralstonia syzygii*

La raza 1 afecta una gran variedad de plantas incluyendo la papa, tomate, tabaco, banano, maní, particularmente solanáceas, los síntomas ocasionados por la raza 1 son clorosis marchitamiento típico es común en climas cálidos y en regiones bajas.

La raza 3 afecta papa y tomate particularmente en ambientes fríos, pero no es altamente virulenta en otros cultivos de solanáceas el síntoma ocasionado por esta raza es solamente clorosis a diferencia de la raza 1 es mas común en altitudes o en latitudes mayores (Goszczyńska *et al.*, 2000).

### III. SÍNTOMAS Y SIGNOS

*R. solanacearum* es una bacteria sistémica por lo que provoca el taponamiento de los tejidos vasculares, las plantas infectadas muestran disminución en el crecimiento, presentan amarillamiento, marchitez repentina en hojas más jóvenes durante las horas más calurosas del día. Por la noche, con las temperaturas frescas, las plantas enfermas recuperan su turgencia, hasta que llegan a la etapa de marchitez permanente.

Los síntomas se pueden presentar en uno o pocos tallos de la planta, ocasionalmente se observa clorosis intervenal y arrugamiento marginal de las hojas hasta que todo el tallo se marchita, si se realiza un corte de los tallos se observa un oscurecimiento en el anillo vascular y un exudado blanquecino.

En el caso de los tubérculos infectados, estos muestran el daño en el anillo vascular, oscurecimiento de esos tejidos y en ocasiones de infección severa se puede observar la producción del exudado bacteriano de aspecto lechoso, razón por la cual se le ha dado otro nombre común de la enfermedad conocida como "vaquita de la papa". Cuando la enfermedad avanza, el exudado sale por los ojos o el ombligo de la papa, donde suele quedar adherido el suelo.



**Fig.1** Marchitez o en planta de papa ocasionada por *Ralstonia solanacearum*.

Fuente: Mauritius Sugar Industry Research Institute



**Fig.2** Planta afectada por *Ralstonia solanacearum*. En detalle, colonias de *Ralstonia solanacearum* en medio de cultivo (Kelman).

Fuente: <http://www.agrounica.com/2012/08/enfermedades-de-la-papa.html>



**Fig. 3** Daños en Tubérculos, anillo vascular y exudado bacteriano ocasionados por *R. solanacearum*.  
Fuentes: <http://www.agrounica.com/2012/08/enfermedades-de-la-papa.html> y CNRF ( Laboratorio de Bacteriología)

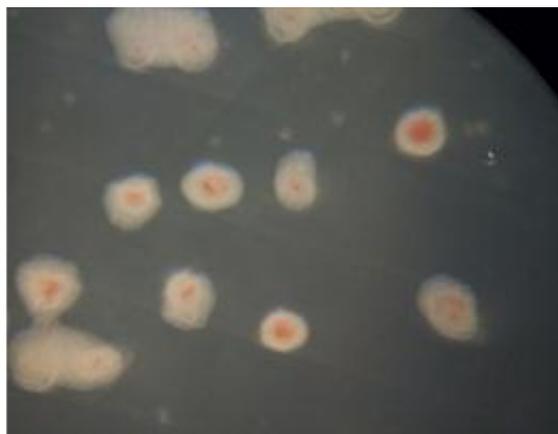
Es una bacteria Gram-negativa en forma bacilo de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de longitud, con un solo flagelo polar (Sneath *et al.*, 1986), positivo a oxidasa y catalasa, acumula Poly- $\beta$  hydroxibutirato (PHb) y reduce nitratos.

Es un organismo aeróbico obligado; se desarrolla desde temperaturas de 10 °C, la óptima es de 35°C (Kelman, 1953) y no crece a 40° C, presenta poco o ningún crecimiento en medio con 2% de NaCl, y los aislamientos son negativos para hidrólisis de arginina, licuefacción de gelatina, e hidrólisis de almidón o esculina.

Las colonias son inicialmente suaves, brillantes y opalescentes, pero llegan a ser oscuras con el tiempo. Dos tipos de colonias pueden desarrollarse en medios semiselectivos y que contienen 0.5% de glucosa o sucrosa; un tipo se observa como colonias fluidas (mucoideas) debido a la producción copiosa de polisacáridos extracelulares (EPS) (**Fig. 4**), mientras que el otro tipo es seca (butirosa). Las colonias no son fluorescentes, pero se produce un pigmento marrón difusible en medios selectivos, como es en el medio que contiene Cloruro de Tetrazolio (TTC), este permite detectar diferencias de la virulencia de *R. solanacearum* al observar la diferencia de pigmentación de las colonias, mientras más pigmento producen nos indica que la cepa es menos virulenta (**Fig. 5**).



**Fig.4** Colonia de *Ralstonia solanacearum* en medio CPG.  
Fuente: CNRF (laboratorio de Bacteriología 2011).



**Fig. 5** Colonia de *Ralstonia solanacearum* en medio TTC.  
Fuente: CNRF (laboratorio de Bacteriología 2011).

Su crecimiento en medios de cultivo artificiales es de 2 a 4 días y la pérdida de su patogenicidad ocurre en 3-4 trasferencias.

#### IV. TRANSMISIÓN Y/O DISEMINACIÓN

El principal medio de transmisión es la semilla tubérculo de papa contaminada. Se presenta latencia ya que tubérculos aparentemente sanos pueden estar infectados por la bacteria. Si se presentan las condiciones adecuadas de humedad y temperatura estos tubérculos se pudrirán en el almacén o enfermarán durante el desarrollo de una nueva plantación. También puede propagarse con la tierra adherida a la maquinaria (tractores), material de siembra (azadas, horquetas, rastrillos), al calzado, con el agua de riego, con animales (granjas, conejos, ratas, perros, insectos, nematodos). La bacteria puede vivir en la planta y en los tubérculos de papa, y en otras plantas cultivadas o malas hierbas sin producir síntomas. También puede mantenerse en el suelo, en el agua y en restos vegetales.

En suelos contaminados la bacteria penetra a las plantas hospederas a través de la raíz y coloniza los vasos del xilema en el sistema vascular.

#### V. IMPORTANCIA

*Ralstonia solanacearum* afecta más de 30 familias de plantas. Entre las más susceptibles se encuentran la papa, el tabaco, el tomate, la berenjena, el chile, el pimiento y el cacahuate. Es mucho más dañina en las regiones de climas tropicales, subtropicales y templados donde puede ocasionar severas pérdidas en los cultivos. No obstante, también puede ocurrir en altitudes o latitudes relativamente mayores, y en climas más fríos

#### VI. PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO

##### 1.- Envío/Recepción de muestras

De acuerdo con el Plan de trabajo para la importación de semilla de papa de Canadá a México se debe procesar la semilla - tubérculo, en donde la muestra consta de 400 tubérculos en un saco o caja cerrada con los datos de identificación correspondientes por cada 20 toneladas de semilla de papa destinada a embarque. Sin embargo para realizar la detección en cualquier otra muestra no es necesario un número exacto.

En caso de recibir follaje, la muestra debe estar en buen estado, es decir, que no presente necrosis, hongos, que no esté deshidratada y que el tejido esté lo más fresco posible.

El tejido vegetal óptimo para realizar la detección debe incluir: brotes, peciolas, hojas con síntomas y lesiones en el tallo.

##### 2.- Recepción e inspección del material

En caso de que la muestra corresponda a semilla-tubérculo se debe dividir en submuestras de 50 tubérculos, identificarlas apropiadamente, indicando el número de muestra, remisión, lote y fecha.

De cada uno de los tubérculos, extraer de la zona del anillo próximo al estolón un trozo equivalente a 0.4 – 1 g de tejido con la ayuda de un pelapapas, sacacorchos o cualquier otro objeto que permita extraer esa zona del tejido en buenas condiciones, procurar que sean homogéneos los trozos. Cada submuestra debe congelarse para posteriormente macerarse y homogeneizar ese material, posteriormente se separa en porciones homogéneas en bolsas plásticas diferentes, dependiendo de la solución amortiguadora necesaria para realizar el macerado para cada análisis y detección de las diferentes bacterias, una parte se utiliza para el diagnóstico de *R. solanacearum* para realizar las pruebas de ELISA y PCR.

Si se trata de tallos, se deben cortar porciones de 0.5 – 1.5 cm de longitud, principalmente cortar la región cercana a la corona entre la raíz y el tallo, o en aquella zona que presente daño o necrosis en los vasos vasculares, se toman 0.2 gramos y se separa para realizar aislamiento, otra porción para ELISA y una tercera para PCR la cual debe congelarse preferentemente.

### 3.- Almacenamiento

Las muestras (los macerados) se conservan a 4°C Y -20°C en caso de requerir un segundo diagnóstico.

### 4.- Técnicas de detección

La detección de la bacteria puede realizarse a partir de plantas y tubérculos infectados sintomáticos o bien asintomáticos. Debido a la importancia del patógeno, el análisis debe realizarse utilizando cuando menos dos técnicas alternas: aislamiento del patógeno en medio de cultivo y pruebas bioquímicas, mediante la técnica serológica de ELISA y la PCR (Figura 6). El aislamiento de la bacteria debe concluir en cultivo puro, realizarle las pruebas bioquímicas correspondientes para género, especie y subespecie, y posteriormente corroborar la cepa aislada con ELISA, PCR y pruebas de patogenicidad en tabaco (*Nicotiana tabacum*).

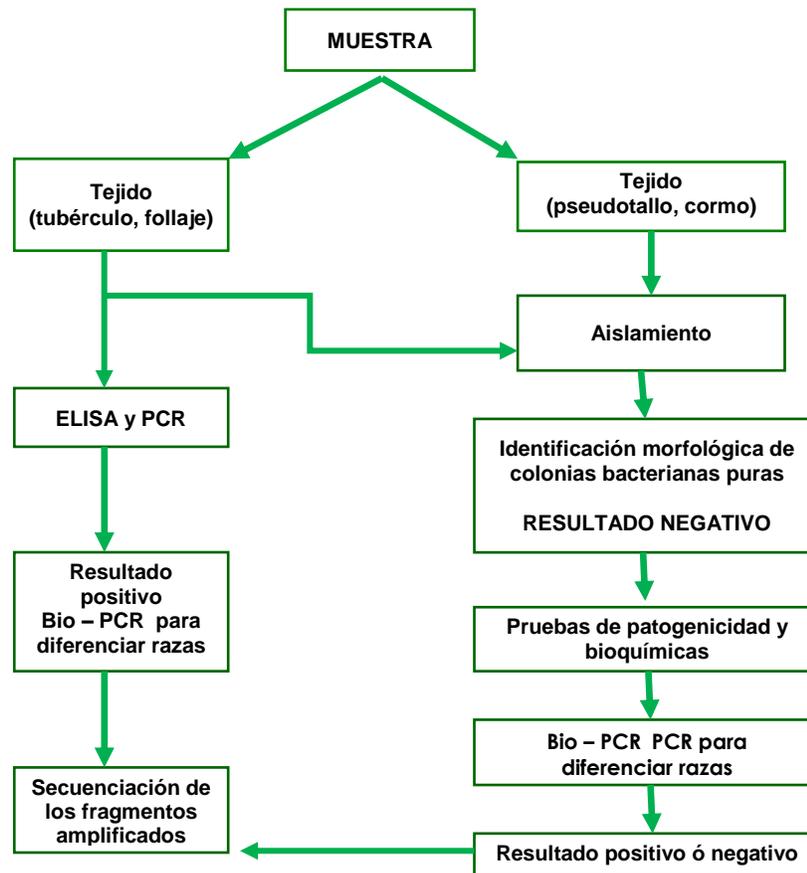
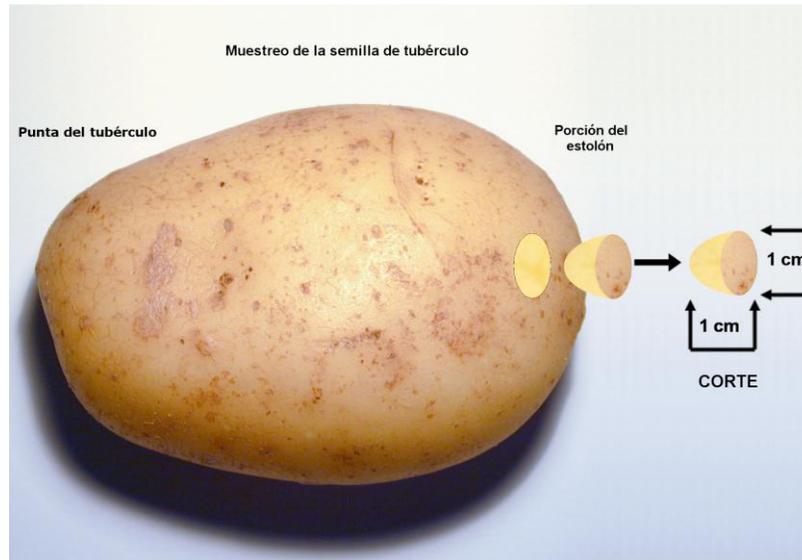


Fig.6 Diagrama de flujo para el diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* 

#### Aislamiento e identificación morfológica

Un factor importante en el éxito del aislamiento es la selección del tejido a partir del cual se pretende aislar la bacteria. Éste debe contener una alta población bacteriana; las bacterias tienden a acumularse en partes específicas de la planta como las venas y pecíolos de las hojas, que presentan síntomas avanzados, por lo que se consideran muestras muy buenas para realizar los aislamientos.

Al aislar a partir de tallos y tubérculos que muestren síntomas iniciales de la enfermedad, estos se cortan longitudinalmente y se separan porciones de haces vasculares que presenten coloración. En los casos de posible infección latente se extrae la zona del anillo próxima al estolón (Figura 7).



**Fig. 7** Muestreo del tubérculo.

Fuente: <http://old.padil.gov.au>

Los fragmentos se colocan en una placa petri estéril, se cortan con un bisturí, se transfieren a un tubo de ensaye con 1 ml de agua estéril y se dejan reposar durante 30 minutos. Una gota del extracto se extiende sobre un medio de cultivo apropiado (Bk,NBY,TTC) y se incuba a 21-25° C.

En el caso de contar con hojas o pecíolos, estos se esterilizan con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, después se enjuagan tres veces con agua destilada estéril y se cortan en porciones más pequeñas que se transfieren a un tubo de ensaye con agua destilada estéril. Se deja incubar por 10 minutos, para formar una suspensión bacteriana y posteriormente con un asa bacteriológica se siembra en medios de cultivo por estría cruzada.

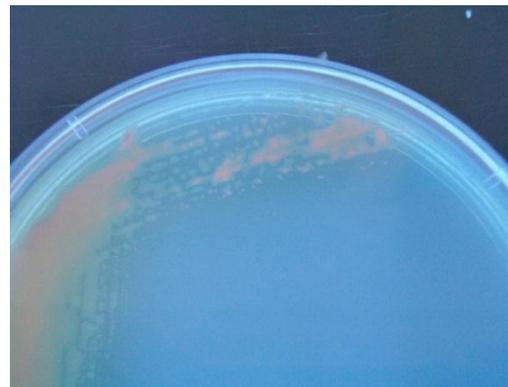
### De suelo

A partir del total de suelo (1Kg) pesar 10 submuestras de un gramo, mezclar cada una con buffer de fosfato 0.05 M, posteriormente realizar diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , y  $10^{-3}$ , medir 100  $\mu$ L de cada dilución y sembrar en medio de aislamiento. Incubar las cajas a una temperatura de 28° C por un periodo de tres a cinco días.

Después de 2 a 3 días de incubación en los medios de cultivo se presentan colonias de color blanco a crema, redondas y de bordes lisos.



**Fig. 8** Colonia de *Ralstonia solanacearum* en medio BK.  
Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias 2011)



**Fig. 9** Colonia de *Ralstonia solanacearum* en medio NBY.  
Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias 2011)

## 1. Pruebas bioquímicas

Para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de *R. solanacearum*, la cepa bacteriana se debe hacer crecer en presencia de determinadas sustancias nutritivas específicas y pasado cierto tiempo, se deben examinar los cambios químicos que se llevan a cabo. El siguiente cuadro muestra las pruebas que deben realizarse a los aislamientos obtenidos.

**Tabla No. 3** Pruebas bioquímicas para la identificación de de *Ralstonia solanacearum*

Tinción de Gram y/o Reacción de KOH	Gram negativa ( + ) / KOH ( + )
Pigmento fluorescente	-
Inclusiones de PBH	+
Prueba O/F	O+/F-
Catalasa	+
Oxidasa de Kobacs	+
Reducción de nitratos	+
Utilización de citrato	+
Crecimiento a 40° C	-
Crecimiento en NaCl al 1%	+
Crecimiento en NaCl al 2%	-
Dihidrolasa de arginina	-
Licuación de gelatina	-
Hidrólisis del almidón	-
Hidrólisis de la esculina	-
Producción de Levana	-

\* Schaad et al., 2001

\*\* Rodríguez, 2006

### Reacción de KOH

La solubilidad del KOH (RYU GRAM, 1938) es una alternativa a la tinción de Gram, y se basa en que las paredes de las bacterias Gram (-) al disolverse por la acción del KOH (Hidróxido de Potasio) liberan el material citoplásmico y el DNA que es un compuesto muy viscoso.



**Fig. 10** Prueba de Ryu (KOH) positiva, por lo que *Rs* es Gram negativa  
Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias)

- Colocar una muestra de la colonia bacteriana en un portaobjetos. Adicionar una gota de Hidróxido de Potasio (KOH) al 3%; y mezclar durante unos 10 a 20 segundos con el asa bacteriológica estéril, al levantar el asa:
- Si la suspensión se torna viscosa (solubilidad positiva) y al separar el asa del portaobjetos permite la formación de un pequeño filamento, esta reacción corresponde con las bacterias Gram (-) como es el caso de *R. solanacearum*, caso contrario ocurre cuando el asa se levanta libremente y ello es característico de las bacterias Gram (+).

**Nota:** Es importante que la solución de KOH al 3% sea preparada máximo con 3 días de anticipación para la realización de la prueba, de lo contrario se pueden producir resultados erróneos.

### Reacción de Hipersensibilidad en tabaco

La reacción de hipersensibilidad determina fácil y rápidamente si una bacteria es o no fitopatógena, sobre todo para aquellas bacterias aisladas de muestras con manchas foliares y tizones, aunque también algunas que causan pudriciones pueden dar esta reacción positiva (Rodríguez, 2006).

Las bacterias fitopatógenas ocasionan necrosis del tejido en plantas susceptibles e inducen una clara reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco después de 24 horas de la inoculación (Duveiller, 1997).

- A partir de una cepa pura, preparar una suspensión bacteriana en un tubo de ensaye con agua destilada estéril y en condiciones asépticas, a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). Inocular por inyección en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), de preferencia variedad White Burley. Las plantas inoculadas se mantienen a temperatura ambiente, es decir de 20 a 30 °C, nunca a una temperatura mayor de 35 °C.
- Si dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación, la zona infiltrada presenta pérdida de turgencia o necrosis, la prueba se considera positiva.
- Esta prueba se considera importante para diferenciar las Razas de esta bacteria como podemos observar en el Cuadro 4.



**Fig. 11** A) Hoja de tabaco inoculada con *Ralstonia solanacearum* mostrando reacción de hipersensibilidad, B) Hoja de tabaco testigo infiltrada con agua  
Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias)

**Tabla No. 4** Diferenciación de razas por inoculación en tabaco o plantas diferenciales, (Janse, 1991).

Razas	Biovars	Hospedantes	Provoca:
1	1,3,4	Tabaco y Jitomate	- Marchitez generalizada en tomate y tabaco - Reacción de Hipersensibilidad al inocular en hojas (12-24 hrs) necrosis del tejido (48hrs) y marchitez (7-8 días)
2	1,3	Musáceas (plátano)	- Reacción de Hipersensibilidad al inocular en hojas de tabaco(12-24 hrs) Marchitez en <i>Musa acuminata</i>
3	2 <sup>a</sup>	Papa, Jitomate, Geranio	- Marchitez generalizada en tomate Amarillamiento- clorosis al inocular en hojas de tabaco(2-8 días)

### Reacción de oxidación y fermentación



**Fig. 12** Tubos con medio de cultivo Hugh y Leifson inoculados con *Ralstonia solanacearum* mostrando reacción-oxidación.

Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias)

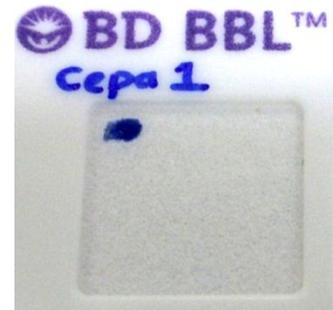
Se habla de oxidación de la glucosa, cuando bajo condiciones aeróbicas la bacteria produce ácido a partir de este carbohidrato y se presenta un cambio de color en el medio de cultivo de azul a amarillo. En la fermentación, la glucosa es metabolizada en condiciones anaerobias, es decir, el oxígeno no actúa como aceptor final de electrones y de la misma manera se produce un cambio de coloración de azul a amarillo en el medio de cultivo (Rodríguez, 2006).

- Con un asa bacteriológica esterilizada y enfriada tomar parte del cultivo bacteriano, bajo condiciones asépticas, y transferir a dos tubos de ensaye con medio de Hugh y Leifson utilizar la técnica de picadura, enseguida a uno de los tubos agregar aceite mineral estéril y dejar incubar a 28 °C de 24 a 48 horas; transcurrido este periodo observar en cuál de los tubos cambia su coloración de azul a amarillo.

### Oxidasa

Existen especies bacterianas que poseen el citocromo oxidasa dentro de la cadena respiratoria, la presencia o ausencia de este citocromo en bacterias es una característica fisiológica muy utilizada en su taxonomía. *Ralstonia solanacearum* es oxidasa positiva.

- Agregar en una tira de papel filtro dos gotas de solución acuosa al 1% de N, N, dimetil parafenil diamina o reactivo de Kovac's y con un asa bacteriológica y en condiciones asépticas depositar sobre el papel filtro un poco de crecimiento bacteriano.
- Si al cabo de 10 segundos, el crecimiento bacteriano adquiere una coloración azul o violeta la prueba es positiva. Si no se presenta dicha coloración a los 60 segundos la prueba es negativa.



**Fig. 13** Prueba de Oxidasa positiva

Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias)

### Notas:

La solución de N, N, dimetil parafenil diamina debe ser de preparación reciente, es decir, máximo 5 días antes, ya que este compuesto se oxida al ponerse en contacto con el oxígeno del ambiente, cuando se observe que la solución presenta una coloración púrpura no debe utilizarse; la coloración normal de la solución debe ser amarillo claro.

Este aminoácido es carcinogénico, la bacteria debe manejarse con el asa bacteriológica de platino debido a que las asas de hierro pueden catalizar la phenylenediamina.

También se puede utilizar una solución acuosa de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina o Reactivo de Kovac's, es menos tóxico y más sensible aunque su costo es más elevado. Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

### Reducción de Nitratos

Ciertas especies utilizan los nitratos como aceptores de hidrogeno y los reduce a nitritos, nitrógeno libre o amoníaco, lo cual depende del sistema enzimático de cada bacteria (Rodríguez, 2001).



**Fig. 14** Prueba de Reducción de nitratos

Fuente: CNRF (Lab. de Bacterias)

Esta prueba se realiza en tubos con medio de Reducción de nitratos, se inocula la cepa bacteriana por picadura y se incuba a 28 °C. Si la bacteria posee la enzima nitrato - reductasa, después del periodo de incubación (24 horas), los nitratos desaparecerán del medio de cultivo y al adicionar 1 ml de solución A y 1 ml de solución B para determinar si la prueba es positiva, se observa una coloración rosa, lo que nos indica que se transformaron a nitritos.

Si es negativa no se observa cambio de color, en caso de que no cambie de color se agrega una pastilla de Zinc al medio de cultivo, este reactivo reducirá los nitratos a nitritos y se formará el color rojo, para corroborar la respuesta negativa de la cepa bacteriana a esta prueba.

### Hidrólisis de esculina

La producción de glucosidasas de las bacterias permite la hidrólisis de la esculina al reaccionar con el  $Fe^{3+}$  dando como resultado compuestos negruzcos.

- Transferir a 2 tubos con medio de esculina parte del crecimiento bacteriano y deja incubar a 28 °C por 48 horas. El medio inicial presenta una fluorescencia azulada al observarse con luz UV y la prueba será positiva cuando al pasar el tiempo esta fluorescencia es perdida.

### Producción de ácido a partir de hidratos de carbono

Los hidratos de carbono se clasifican en: a) monosacáridos (Tetrosa, Eritrosa), disacáridos (Celobiosa, Lactosa, Maltosa, Melibiosa, Sacarosa, Trehalosa), polisacáridos (Arabinosa, Ribosa, Glucosa, Galactosa, Fructosa, Manosa, Rafinosa, Sorbosa) y alcoholes (Adonitol, Dulcitol, Eritritol, Glicerol, Manitol, Sorbitol). La producción de ácido a partir de estos carbohidratos es útil para la diferenciación de las diferentes especies bacterianas, ya que no todas tienen la capacidad de metabolizar los mismos azúcares.

- En 2 tubos con medio para metabolismo de hidratos de carbono sembrar la bacteria e incubar a 28 °C. Los tubos deben observarse diariamente, comparándolos con el tubo testigo.



**Fig. 15** Prueba de Producción de ácido a partir de la utilización de carbohidratos positiva.

Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias)

**Notas:** El tubo testigo debe permanecer de color azul y si los que están sembrados cambian a color amarillo, indica que la bacteria produce ácido de estos disacáridos.

Si después de siete días no se produce el cambio de coloración la prueba debe considerarse negativa

**Tabla No. 5** Pruebas bioquímicas para diferenciar biovares de *R. solanacearum* en función del empleo de disacáridos y oxidación de alcoholes (French et al., 1995).

Pruebas bioquímicas	BIOVARES				
	1	2	3	4	5
Utilización de Lactosa	-	+	+	-	+
Utilización de Maltosa	-	+	+	-	+
Utilización de Celobiosa	-	+	+	-	+
Oxidación de manitol	-	-	+	+	+
Oxidación de Sorbitol	-	-	+	+	-
Oxidación de Ducitol	-	-	+	+	-

### Medios de cultivo

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el *Medio de cultivo* y el crecimiento de los organismos es el *Cultivo*.

Para que las bacterias crezcan en un medio artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad, y oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad.

### Medio B de King

Proteosa de Peptona	20.0 g
Glicerol	15.0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1.5 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

Adicionar uno a uno todos los ingredientes y cocinar (3 minutos) en parrilla eléctrica hasta que todos se hayan disuelto perfectamente. Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

### Agar nutritivo (comercialmente disponible) – Glucosa (ANG)

Extracto de carne (Difco)	3.0 g
Peptona	5.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver todos los ingredientes en el agua y cocinar hasta que el medio hierva. Esterilizar en forma habitual.

### Medio Casaminoácidos-Peptona-Glucosa (CPG)

Casaminoácidos (caseína hidrolisada)	1.0 g
Peptona	10.0 g
Glucosa	5.0 g
Agar	17.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver todos los ingredientes en el agua, si es necesario ajustar el pH 6.5-7 y cocinar hasta que el medio hierva. Esterilizar en forma habitual.

Las colonias se observan en un periodo de 48 a 72 hr de incubación a 28°C. Las colonias “normales” o virulentas son blancas o color crema, irregularmente circulares, fluidas y opacas; las colonias no virulentas (o mutantes) son uniformemente circulares, pequeñas y butirosas (secas).

### Medios Semiselectivo TTC

Este medio permite diferenciar las colonias virulentas (blancas, fluidas, ligera pigmentación roja-vino en el centro) y avirulentas (colonias pigmentadas rojo-vino) de *R. solanacearum*.

<b>Casaminoácidos (Caseína hidrolizada)</b>	<b>1.0 g</b>
<b>Peptona</b>	<b>10.0 g</b>
<b>Glucosa</b>	<b>5.0 g</b>
<b>Agar</b>	<b>12.0 g</b>
<b>2,3,5- Trifenil Cloruro de tetrazolio (TTC)</b>	<b>0.005%</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1000 ml</b>

Disolver todos los ingredientes en el agua, ajustar el pH a 7 y cocinar hasta que el medio hierva. Esterilizar en forma habitual\*. Retirar el matraz del autoclave y cuando alcance una temperatura aproximada de 45-50°C, adicionar una solución acuosa de Cloruro de tetrazolio (TTC) al 1.0% (1g TTC/100 ml H<sub>2</sub>O) agregar por filtración Millipore, por lo que se agregan 2.5 ml de esta solución para dar una concentración final de 0.005%.

### Medio para la producción de ácido a partir de carbohidratos

<b>Peptona</b>	10.0 g
<b>Hidrato de carbono</b>	10.0 g
<b>Azul de bromotimol</b>	0.0003 g
<b>Agua</b>	1000 mL

Disolver la peptona y el indicador en 995 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.0.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión.

El carbohidrato (monosacárido, disacárido, polisacárido, alcohol) se disuelve en 5 mL de agua destilada y se adiciona al medio, ya esterilizado por medio filtración Millipore.

Mezclar muy bien el medio y distribuir en tubos de ensayo previamente esterilizados.

### Medio para la reducción de Nitratos

<b>Nitrato de Potasio</b>	1.0 g
<b>Extracto de carne</b>	3.0 g
<b>Bacto peptona</b>	5.0 g
<b>Agua</b>	1000 mL

Después de disolver los reactivos vaciar 5ml del medio en tubos de ensayo y esterilizar en la autoclave. Enfriar los tubos e inocular el cultivo fresco bacteriano con un asa, de preferencia colonias bacterianas de 24 a 36 hr de edad, se incuba a 27 ° C durante 48 horas.

### Soluciones:

#### Solución A

Disolver con un ligero calentamiento 0.8% de Ácido sulfanílico en Ácido acético al 5 N.

**Solución B**

Disolver con un ligero calentamiento 0.6 % de dimetil naftilamina en ácido 5 N o 0.5% de naftilamina en ácido acético al 5 N

**Nota:** La naftilamina es carcinogénica y deberá manejarse con cuidado.

**2. Técnica de ELISA**

La técnica **ELISA** ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" Ensayo por inmuoadsorción con enzimas conjugadas) está basada en la detección directa o indirecta de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante proteínas, conocidas como anticuerpos que en presencia de determinado sustrato producen una reacción de color que puede ser medida espectrofotométricamente.

La técnica serológica ELISA es confiable y rápida para la detección de fitopatógenos debido al alto grado de sensibilidad que posee.

El protocolo de ELISA que se realiza en el CNRF para la detección de *Rs* es el de una ELISA directa fabricada por la compañía Agdia, Inc. AGDIA / SRP 33900/500 *Ralstonia solanacearum*.

**Procedimiento**

1. Iniciar con el diseño de la distribución de las muestras en la placa de poliestireno empleada para la técnica de ELISA; realizar los cálculos de volumen requerido para la prueba y las diluciones de los antisueros en base al número de muestras, repeticiones y controles.
2. Sensibilizar la placa. Para ello se debe preparar la dilución del anticuerpo de captura en buffer de cobertura y homogeneizar perfectamente. Colocar 100µL por pozo de esa dilución en todos los pozos utilizados para la prueba y dejar incubar en cámara húmeda por 4 horas o bien, toda la noche a 4 °C.
3. Transcurrido el tiempo de incubación, lavar la placa de poliestireno de 5 a 8 veces, con solución amortiguadora de lavado (PBST 1X).
4. Preparar solución amortiguadora de bloqueo o postcobertura (El kit contiene este buffer para disolverlo en agua destilada estéril). Agregar 275 µL por pozo e incubar la placa de 1-2 horas a temperatura ambiente.
5. Lavar la placa de poliestireno de 5 a 8 veces, con solución amortiguadora de lavado (PBST 1X).
6. Muestrear el tejido vegetal a analizar, colocar en bolsas plásticas, etiquetar y macerar en buffer general de extracción (proporción 1:10 p/v) y dejar incubar por 10 minutos (Figura 16). Mientras tanto colocar en los pozos designados para controles negativos, controles de soluciones amortiguadoras, 100 µl de buffer general de extracción, en los pozos restantes para controles negativos 100 µl de macerado de tejido vegetal sano de tejido sano de plátano.
7. Preparar el testigo positivo (bacteria liofilizada del kit), diluyendo la alícuota que contiene la bacteria en buffer general de extracción y adicionar de igual manera 100 µl de la dilución en los pozos designados para controles positivos.



**Fig. 16** Macerado de tejido vegetal para la técnica de ELISA  
Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias)

8. También pueden ser analizadas las cepas bacterianas aisladas para confirmar Género y especie, para esto se colocan 500  $\mu$ l de buffer de extracción en un tubo eppendorf® y se mezcla una muestra de cada cepa que se va a analizar (Figura 17).



**Fig. 17** A. Cepa bacteriana *Rs.*, B. Preparación de tubos eppendorf® con buffer y cepa.  
Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias)

9. Depositar 100  $\mu$ L de cada muestra por duplicado (muestra y repetición) en cada uno de los pozos seleccionados en la placa de ELISA, y 100  $\mu$ L de los controles (positivos y negativos) también por duplicado.
10. Cubrir la placa y dejar incubar durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.
11. Lavar la placa 8 veces con buffer PBST.
12. El kit contiene la enzima conjugada ya preparada, por lo que el frasco que la contiene debe retirarse del refrigerador 15 minutos antes de que deba colocar en los pozos, para permitir que tenga a temperatura ambiente, colocar 100 $\mu$ L por pozo de esa solución en todos los pozos de prueba.
13. Cubrir la placa y dejar incubar durante 1 hora en cámara húmeda.
14. Lavar la placa 8 veces con buffer PBST.
15. El kit contiene la solución de sustrato para revelar, en este caso es TMB, el frasco que la contiene debe retirarse del refrigerador 15 minutos antes de que deba colocar en los pozos, adicionar 100  $\mu$ l en todos los pozos incluyendo los de los blancos. Incubar en cámara húmeda en condiciones de oscuridad de 15 a 30 minutos.
16. Realizar la valoración de la caja, observar si hay coloración de los pozos y leer la placa en el Lector de placas de ELISA.

### Interpretación de resultados

Después de aproximadamente 15 minutos, se mide la absorbancia en el lector de placas de ELISA, a una longitud de onda de 650 nm para la enzima peroxidasa. Los resultados se interpretan de acuerdo a los siguientes criterios:

- La reacción se considera como positiva (presencia del fitopatógeno) si hay reacción de color y si la lectura de la densidad óptica es mayor o igual a tres veces la media del testigo negativo. Si el testigo negativo presenta en promedio valores de densidad óptica menores de 0.030, solo se considera positivo aquellas muestras con densidades ópticas mayores a 0.100.
- Para considerar aceptable los resultados de una placa ELISA, la medida de las lecturas de densidad óptica del testigo negativo deben ser menores a 0.060.
- Cuando solo una de las muestras es positiva y/o si la diferencia con su repetición es mayor o igual al 50% de su valor, la muestra deberá procesarse nuevamente para determinar la presencia del fitopatógeno.

### Preparación de soluciones amortiguadoras

#### Preparación de la solución amortiguadora de cubrimiento (Buffer de cobertura).

1. Vaciar 900 mL de agua en un vaso de precipitado de 1000 mL, poner dentro un agitador magnético y colocar sobre una parrilla de agitación.
2. Pesar en una balanza analítica las cantidades de los siguientes reactivos.

<b>Carbonato de Sodio (anhidro)</b>	1.59 g
<b>Bicarbonato de Sodio</b>	2.93 g
<b>Azida de sodio</b>	0.2 g

3. Agregar cada uno de los reactivos en el vaso con agua para que se disuelvan.
4. Vaciar el resto del agua en el vaso (100mL), para homogeneizar la mezcla.
5. Ajustar el pH a 9.6 (+/- 0.2).

**Nota:** Para ajustar el pH de las soluciones se utiliza Acido clorhídrico 30% e Hidróxido de Sodio 3M.

6. Guardar la solución en un frasco para reactivo debidamente etiquetado.
7. Almacenar a 4°C

**Nota:** La azida de sodio inhibe la respiración celular. Evite el contacto con la piel.

#### Preparación de la Solución amortiguadora de Fosfatos PBST 1X (Buffer de lavado).

1. Vaciar 900 mL de agua en un vaso de precipitado de 1000 mL, poner dentro un agitador magnético y colocar sobre una parrilla de agitación.
2. Pesar en una balanza analítica las cantidades de los siguientes reactivos.

<b>Cloruro de Sodio (anhidro)</b>	8.0 g
<b>Fosfato de Sodio, dibásico (anhidro)</b>	1.15 g
<b>Fosfato de Potasio, monobásico (anhidro)</b>	0.2 g
<b>Cloruro de Potasio</b>	0.2 g
<b>Tween 20</b>	0.5 g

3. Agregar cada uno de los reactivos en el vaso con agua para que se disuelvan.
4. Vaciar el resto del agua en el vaso (100mL), para homogeneizar la mezcla.
5. Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.2).
6. Guardar la solución en un frasco para reactivos debidamente etiquetada.
7. Almacenar a 4° C (en refrigeración).

**Nota:** La solución de lavado (PBST), puede prepararse concentrada según su necesidad, por ejemplo (10X) y posteriormente diluirse a 1X, en base a las siguientes indicaciones:

- Para preparar una solución a 10X, solo multiplicar las cantidades por 10, disolver en 1000 mL.
- Para preparar una solución 1X a partir de una 10X. Aforar 100 mL de la solución concentrada a 1000 mL con agua destilada; ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.2).

### **Preparación del buffer general de extracción (GEB)**

1. Vaciar 900 mL de PBST 1X en un vaso de precipitado, poner dentro un agitador magnético y colocar sobre una parrilla de agitación.
2. Pesar en una balanza analítica las cantidades de los siguientes reactivos:

<b>Sulfito de sodio (anhidro)</b>	1. 3 g
<b>Polyvinylpyrrolidone (PVP)</b>	20. 0 g
<b>Azida de sodio</b>	0. 2 g
<b>Albumina de huevo grado II</b>	2. 0 g
<b>Tween 20</b>	20. 0 g

3. Agregar cada uno de los reactivos en el vaso con agua para que se disuelvan.
4. Vaciar el resto del PBST 1X en el vaso (100mL), para homogeneizar la mezcla.
5. Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.2).

**Nota:** Para ajustar el pH de las soluciones se utiliza Acido clorhídrico 30% e Hidróxido de Sodio 3M.

6. Guardar la solución en un frasco para reactivo debidamente etiquetado.
7. Almacenar a 4° C

**Nota:** La azida de sodio inhibe la respiración celular. Evite el contacto con la piel

No es necesaria la preparación del buffer de revelado

### 3. Técnica PCR en planta y colonias bacterianas

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las polimerasas del ADN para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí, tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es necesario realizar previamente la extracción de ADN de la bacteria de partes vegetales y crecimiento de bacterias en medios de cultivo procedentes de muestras de suelo, para lo cual se emplea la siguiente metodología de extracción de ADN.

La extracción de ADN se puede realizar por diversas metodologías, a continuación se describen cuatro de las más empleadas

#### **Extracción de ADN empleando Mini Kit para plantas Qiagen DNeasy®**

1. Del material vegetal picado previamente, pese 200 mg de tejido y colóquelo dentro de un tubo de 2 ml. Utilice una navaja nueva por cada muestra a fin de evitar contaminación entre las muestras.
2. Precalentar solución AE a 65 °C que será utilizado en el paso 15.
3. Agregar 800 µl de solución AP1 a cada tubo y adicionar 2 balines.
4. Homogenizar el tejido de la planta en un homogenizador de tejidos durante 1 minuto y medio
5. Incubar el tejido macerado a 65 °C durante 10 minutos.
6. Centrifugar la muestra durante 10 segundos  $\geq 10,000$  rpm para retirar el tejido de la capa superior.
7. Agregar 200 µl de la solución amortiguadora AP2 al lisado, agitar brevemente e incubar en hielo por 5 min.
8. Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos. Transferir el lisado a una columna mini de DNeasy QIAshredder (columna de color lila) y centrifugar durante 2 minutos a 14,000 rpm.
9. Agregar a un tubo de 1.5 ml etiquetado 700 µl de la solución amortiguadora AP3.
10. Transferir el sobrenadante al tubo que contiene la solución AP3 y mezclar por inversión. Centrifugar por unos segundos.
11. Transferir 700 µl de la mezcla, a la columna mini spin Dneasy (blanca). Centrifugar a  $\geq 8000$  rpm durante 1 minuto. Desechar el precipitado.
12. Repetir el paso 11 con el resto de la mezcla. Desechar el precipitado.
13. Agregar 500 µl de la solución amortiguadora AW y centrifugar  $\geq 8000$  rpm durante 1 minuto. Desechar precipitado.
14. Realizar un segundo lavado, agregar 300 µl de la solución AW a la columna y centrifugar durante 2 min a 14,000 rpm. Retirar cuidadosamente la columna para evitar que ésta entre en contacto con el precipitado.
15. Transferir la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml y agregar 85 µl de la solución AE precalentada a 65 °C sobre la membrana de la columna. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugar durante 1 minuto a  $\geq 8000$  para recolectar la elusión del ADN.
16. Repetir el paso 15.

17. El ADN genómico puede almacenarse a 4 °C solo para un uso inmediato o a -20 °C para utilizarse en el futuro.

**Extracción de ADN de colonias bacterianas empleando Kit Axygen (Qiagen #69504)**

1. Precalentar el Buffer TE a 65°C para usarse en el paso 15.
2. Raspar el crecimiento bacteriano de la caja Petri y colocarlo dentro de un tubo de 1.5 mL, agregar 300µL de PBS 1X pH 7.2, (fosfato de potasio 50mM, NaCl 150 mM), 500 µL de la solución AP1 y 100 µL de la solución AP2 y macerar con la punta.
3. Alternativamente, se puede pasar el crecimiento bacteriano a un mortero estéril y agregar 300 µL de PBS 1X, macerar y vaciar en un tubo de 1.5 mL que contenga las soluciones de extracción (AP1 y AP2). Agregar 100 µL más de PBS 1X al mortero para recuperar el resto del macerado.
4. Homogenizar las muestras por 1 min. (Si utiliza mortero, dar vortex por cinco segundos).
5. Centrifugar 8 min a 14 000 RPM.
6. Preparar la columna y etiquetar tubos de recolección.
7. Pasar el sobrenadante a la columna (alrededor de 700 µL)
8. Centrifugar 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
9. Agregar 700 µL de la solución AW1. Centrifugar 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
10. Agregar 700 µL de la solución AW2. Centrifugar 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
11. Agregar 300 µL de la solución Aw2. Centrifugar 2 min a 14000 rpm. Retirar cuidadosamente la columna para evitar que ésta entre en contacto con el precipitado. Pasarla a un tubo nuevo etiquetado.
12. Agregar 35 µL de TE precalentado a 65°C y centrifugar 1 min a 8000 rpm.
13. Agregar 35 µL de TE precalentado a 65°C y centrifugar 1 min a 8000 rpm
14. Desechar la columna y almacenar el ADN en hielo y/o a 4 °C para su uso inmediato en PCR o bien almacenar a -20 °C para su uso posterior.

**Extracción de los ácidos nucleicos totales con Plant RNA reagent**

1. Revisar la muestra para localizar algún tipo de daño en cualquiera de los órganos disponibles de la planta. Si hubiera daño, seleccionar la zona de avance de la enfermedad y pesar en la balanza analítica de 50 a 100 mg. Si no se observa la zona de avance; tomar el o los órganos y tejidos que pudieran contener una infección latente. Colocar el tejido en un mortero estéril y congelado a ultra baja temperatura (-70 °C).
2. Triturar la muestra hasta obtener una consistencia de polvo. Depositar el polvo en tubo estéril de microcentrifuga de 1.5 a 2.0 mL en el cual previamente han sido colocados 500 µL, respectivamente de la solución de lisis celular a utilizar (Plant RNA reagent).
3. Clarificar la solución, por centrifugación a 12000 rpm durante 2 minutos.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo estéril.
5. Adicionar 100µL de NaCl 5M para clarificar el extracto y se mezclar por inversión.
6. Adicionar 300µL de cloroformo y se mezclar por inversión.

7. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos. Para separar las fases. Transferir la fase superior a otro tubo estéril.
8. A la fase acuosa adicionar un volumen igual de isopropanol frío. Mezclar por inversión y dejar reposar por 10 minutos.
9. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos.
10. Decantar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el pellet.
11. Lavar la pastilla con etanol al 70%.
12. Centrifugar a 12000 rpm, y se decantar cuidando no perder el pellet.
13. Dejar secar hasta no ver gotas en las paredes del tubo, y se disolver el DNA en agua libre de nucleasas.
14. El DNA está listo para ser utilizado, y se debe almacenar a -20 °C para ser usado posteriormente.

#### **Extracción de los ácidos nucleicos totales con CTAB**

1. Revisar la muestra para localizar algún tipo de daño en cualquiera de los órganos disponibles de la planta. Si hubiera daño, seleccionar la zona de avance de la enfermedad y pesar en la balanza analítica de 50 a 100 mg. Si no se observa la zona de avance; tomar el o los órganos y tejidos que pudieran contener una infección latente. Colocar el tejido en un mortero estéril y congelado a ultra baja temperatura (-70 °C).
2. Triturar la muestra hasta obtener una consistencia de polvo. Depositar el polvo en tubo estéril de microcentrifuga de 1.5 a 2.0 y agregar 2 ml de buffer CTAB.
3. Incubar los tubos a 95 °C durante 90 minutos.
4. Transcurridos los 90 minutos dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente centrifugar a 12 000 rpm por 1 minuto.
5. Recuperar de 700-900 µL del sobrenadante y agregar 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) ó fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Agitar por inversión durante 10 minutos.
6. Centrifugar a 12 000 rpm por 10 minutos y recuperar de 700 800 µL de la fase superior, sin tocar la intermedia, y transferirlo a otro tubo.
7. Agregar ½ volumen de isopropanol al 100% (previamente enfriado a -20°C) mezclar por inversión (es posible dejar toda la noche a 4°C) y centrifugar a 12 000 por 15 minutos.
8. Decantar el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla y lavarla con 300 µl de etanol al 70 %, eliminar el alcohol y dejar secar la pastilla.
9. Resuspender en 50 µl de agua libre de nucleasas.

**Verificación de la integridad del ADN en electroforesis.**

Preparar 30 mL de agarosa al 1.0 %, en buffer TAE o TBE 1X con 1µL de Bromuro de etidio en cámara de electroforesis.

Coloca 3 µL de ADN mezclados con 1µL de buffer de carga 6X en los pozos del gel previamente sumergido en buffer TAE o TBE 1X y correr electroforesis por 30 minutos 90 volts.

Observa el gel en un transiluminador de luz Ultra Violeta (UV) y toma la foto con un analizador de imágenes. Analiza la imagen y verifica la integridad.

En caso que la muestra no se encuentre en el rango óptimo de pureza, se procede a realizar una purificación de la(s) muestra (s).

**Purificación de las muestras.**

Para la purificación de las muestras se utilizó un kit de la marca PROMEGA, wizards plus minipreps ADN purification system.

1. Agregar 250 µL de cell resuspension solution al tubo que contiene el ADN.
2. Adicionar 250 µL de cell lysis y mezclar por inversión.
3. Agregar 10 µL de Alkaline protease solution y mezclar por inversión, dejar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Adicionar 350 µL neutralizing solution y mezclar por inversión.
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
6. Pasar el sobrenadante al spin y en este insertar en el tubo.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante un minuto, y retirar el spin. Desechar el sobrenadante.
8. Colocar nuevamente el spin en el tubo y adicionar 750 µL de wash solution. Centrifuga a 13000 rpm por un minuto.
9. Decantar y volver a repetir el paso con 250 µL de wash solution. Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos.
10. Transferir el spin a un tubo de 1.5 mL y agregar 100 µL de agua libre de nucleasas. Centrifugar a 13000 rpm durante un minuto.
11. El ADN está listo para usarse, o se puede almacenar a -20 °C.

**Verificación de la amplificación del ADN mediante la PCR de gen endógeno 16S**

Realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del gen endógeno 16s con la finalidad de verificar que el ADN no tenga inhibidores y posteriormente se realiza una PCR para la detección para dicha bacteria.

1. Descongelar sobre hielo los reactivos para PCR y calcular las cantidades necesarias por tubo de reacción, de acuerdo a la siguiente tabla:

### Verificación de la amplificación del ADN mediante la PCR de gen endógeno 16S

Realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del gen endógeno 16s con la finalidad de verificar que el ADN no tenga inhibidores y posteriormente se realiza una PCR para la detección para dicha bacteria.

1. Descongelar sobre hielo los reactivos para PCR y calcular las cantidades necesarias por tubo de reacción, de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla No. 2. Concentraciones de reactivos para la PCR de gen endógeno 16S**

Reactivo (Invitrogen™)	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por tubo
Buffer	10X	1X	2.5µL
Mgcl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75 µL
dNTP's	10mM	200 mM	0.5 µL
16s1	10pmoles/ µL	20pmoles/ µL	1.0 µL
16s2	10pmoles/ µL	20pmoles/ µL	1.0 µL
Taq polimerasa	5U/ µL	1.5U	0.3 µL
ADN	-----	50-100 ng/ µL	5.0 µL
Agua grado PCR	-----	-----	13.95 µL
<b>Volumen final</b>			25.0 µl

**Nota:** Los iniciadores usados para gen endógeno (16S), amplificando un producto de 315 pb, cuyas secuencias son:

**Tabla No 3. Secuencias de los primers empleados para la amplificación de gen endógeno 16S**

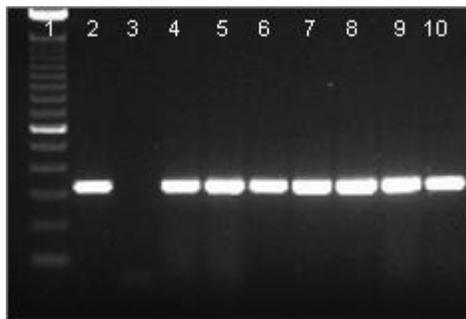
Sentido	Nombre del primer	Secuencia
<b>Sense</b>	16s1	5'- TgAgAATggATAAgAggCTC -3'
<b>Antisense</b>	16s2	5'- TgTTgTTCCCCTCCCAAggg-3'

2. Después de haberse descongelado los reactivos preparar el master mix de PCR, sobre hielo en la campana de seguridad y alícuotas de 20 µL de la mezcla de reactivos en tubos de PCR limpios, previamente etiquetados.
3. Colocar 5 µL del ADN de la muestra y los controles de la reacción de PCR (control positivo y negativo).
4. Colocar las muestras en el termociclador, utilizando el siguiente programa:

**Tabla No. Programa de temperaturas para la PCR de gen endógeno 16S**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	1 min y 30 seg	1
94 °C	40 seg	35
55 °C	40 seg	
72 °C	1 min	
72 °C	3 min	1

- Al concluir el programa, tomar 10-15 µL del producto de PCR (PPCR) y mezclar con 3 µL de buffer de carga sobre papel parafilm, y depositar en los pozos del gel de agarosa al 1.5 %. Teñido con bromuro de etidio, utilizando en la electroforesis buffer TAE o TBE 1X.
- Correr la electroforesis 5 min. a 80 volts y 35 minutos 90 volts. Posteriormente observar sobre un transiluminador de luz UV un fragmento de 315 pb y tomar la fotografía con un analizador de imágenes.
- En el resultado obtenido, se observan bandas de 315 pb y se procede a realizar el PCR para la detección de la bacteria, caso contrario de no visualizar bandas se tendrá que realizar una nueva extracción de ADN.



Carril	Muestras
1	Marcador molecular (adecuado al fragmento amplificado 100 pb)
2	Control Positivo (PCR amplificado a partir de un DNA enfermo)
3	Control negativo (PCR) amplificado a partir de un DNA sano o agua grado PCR).
4 -10	Muestras

**Fig. 18** Amplificación de gen endógeno 16S (315 pb)  
Fuente: CNRF (Laboratorio de Bacterias)

- Correr la electroforesis durante 5 minutos a 80 volts y 35 minutos a 90 volts. Correr hasta que el azul de bromofenol se encuentre a 3/4 partes del gel, apagar la fuente de poder y observar sobre un transiluminador de luz UV un fragmento de 315 pb y tomar la fotografía con un analizador de imágenes.

### Preparación de la reacción de PCR.

En caso de no haber ningún inhibidor en las muestras se procede a realizar la PCR con los iniciadores específicos. Para realizar esta prueba se utilizan los siguientes pares de iniciadores:

### PCR para la amplificación del *Ralstonia solanacearum*

La secuencia de los iniciadores para *R. solanacearum*, que amplifican la región 16S del ARNr.

Nombre del primer	Secuencia	Fragmento (pb)
pehA#3:	5'CAG CAG AAC CCG CGC CTG ATC CAG 3'	504 pb
pehA#6:	5'SATC GGA CTT GAT GCG CAG GCC GTT3'	

- Descongelar los reactivos para PCR y mantenerlos sobre hielo.
- Preparar la cantidad de mezcla para la cantidad de muestras a procesar e incluir control positivo y negativo, con el fin de evitar el error de pipeteo, realizar los cálculos considerando una muestra de más.

3.- Adiciona los siguientes reactivos en un tubo de PCR, teniendo un volumen final de 25  $\mu$ L.

Reactivos	Concentración final	1x (25 $\mu$ L)
Agua	-----	13.95 $\mu$ L
Buffer 10 X	1X	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5 mM	0.75 $\mu$ L
dNTP's 10mM	0.2 mM	0.5 $\mu$ L
Primer 759 (2 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ M	1.0 $\mu$ L
Primer 760 (2 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ M	1.0 $\mu$ L
Taq DNA polimerasa	1 Unidad	0.3 $\mu$ L
ADN	-----	5.0 $\mu$ L

4.- Colocar la muestra en cada tubo de PCR y agregar el templado (ADN), mezclar y centrifugar por 2 segundos.

5.- Coloca las muestras en el termociclador, con el siguiente programa:

**Programa de PCR (Primers pehA#3/ pehA#6 )**

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94 °C	5 min	1
95 °C	1 min	35
70 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1

**Ralstonia solanacearum (Raza3/Biovar2)** (Fegan, et al. 1998)

Nombre del primer	Secuencia	Fragmento (pb)
F: 630	5'ATA CAG AAT TCG ACC GGC AC 3'	280
R: 631	5' ATT CAC ATG CAA TTC GCC TAC 3'	

6.- Una vez finalizado el programa con la siguiente mezcla de reacción agrega el producto de PCR de la primera reacción como templado en la siguiente mezcla:

**Reacción para detección de Rs Raza2/Biovar2**

Reactivos	Concentración final	1x (25 $\mu$ L)
Agua	-----	13.95 $\mu$ L
Buffer 10 X	1X	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5 mM	0.75 $\mu$ L
dNTP's 10mM	0.2 mM	0.5 $\mu$ L
Iniciador F 630	0.1 $\mu$ M	1.0 $\mu$ L
Iniciador R 631		1.0 $\mu$ L
Taq DNA polimerasa	1 Unidad	0.3 $\mu$ L
ADN (Producto de PCR anterior)	-----	5.0 $\mu$ L

7.- Coloca las muestras en el termociclador con el siguiente programa:

**Programa de PCR (Primers)**

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94 °C	5 min	1
94 °C	30 seg	35
59 °C	30 seg	
72 °C	45 seg	
72 °C	10 min	1
4 °C	∞	

8.- Después de concluir el programa térmico del termociclador se analizan los productos de PCR mediante electroforesis en agarosa al 1% teñido con 1 µL bromuro de etidio (0.5mg/mL) y observar en el transiluminador de luz ultravioleta (UV). Mezclar 5 µL del producto de PCR amplificado con 1 µL de buffer de carga (6X) (apéndice 2) sobre papel parafilm y deposita en los pozos del gel de agarosa al 1.0 % en buffer TAE o TBE 1X. Utilizar el marcador de 100 pares de bases.

9.- Realizar la electroforesis a 90 volts por 40 minutos o hasta que el azul de bromofenol se encuentre a 3/4 partes del gel, apaga la fuente de poder y observa sobre un transiluminador de luz UV un fragmento de 280 pb para los primer 750/760 y de 372 pb para los primers Nmult21:2F/ Nmult22: RR, toma la fotografía con un analizador de imágenes.

10.- Se toma nota del resultado obtenido, si el resultado es positivo se corrobora una segunda vez, y registrar el resultado en una bitácora. El análisis concluye con la emisión del dictamen.

**Buffer de carga 6X**

Reactivo	Concentración	Gramos/ mL
<b>Azul de Bromofenol</b>	0.25%	0.125 g
<b>Xylencianol</b>	0.25%	0.125 g
<b>Glicerol</b>	30%	15 mL

Mezclar el glicerol con 35 mL de agua hasta homogenizar, posteriormente se agregan los reactivos, se mezcla bien y esteriliza en un frasco grande para evitar derrames. Guardarlo de 4 a -20° C.

**5.- Destrucción de la muestra**

Concluido el diagnóstico, la muestra se esteriliza en autoclave antes de ser desechada, en caso de que el diagnóstico resulta positivo. En caso contrario, las muestras negativas también se esterilizan y son desechadas posteriormente.

**VII. REFERENCIAS**

**Agrios G. N. (2005).** Plant Pathology. 5<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego. CA. USA. 922 p.

**Chomzysnsky, P. (1997)** DNAzol. A reagent for rapid isolation of genomic DNA. Biotechnics 22:550-553.

**Cruz, F. M. y Frías, T. G. 1997.** Guía Ilustrada de la prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatogenos. Subsecretaría de Agricultura y Ganadería - CONASAG

**Denny, T.P. 2006.** Plant pathogenic *Ralstonia* species. Page 573-644 in Plant-Associated Bacteria. Gnamamanickam, S.S. ed. Springer, Netherlands.

Fahy, P., Persley, G. 1983. Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Academic Press. Sponsored. Australasian Plant Pathology Society.

**Fegan, M., Holoway, G, Hayward, A.C., and Timmis, J. 1998.** Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. In: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 34-43.

**Fegan M., and P. Prior (2005).** How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex” pp. 449-461. In: Allen C, P Prior y A C Hayward (Eds.). Bacterial Wilt: the Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. APS Press, St.Paul, MN. (Consultado en: <http://espace.library.uq.edu.au/eserv/UQ:71427/Ariel DocRQF2.pdf>) (15/05/2011).

**García Estrada, R.S. 2013.** Enfermedades Bacterianas Asociadas a Solanáceas y en Especial *Ralstonia solanacearum* en Tubérculo de Papa. Memorias del curso-taller “Bacterias de importancia económica y cuarentenaria en productos agrícolas” XV Congreso Internacional Y XL Congreso Nacional De Fitopatología. Huatulco, Oaxaca.

**Hayward A.C. (1991.)** Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology. 29: 64-87.

**Kado,C.I. 2010.** Plant Bacteriology.APS PRESS

**Kelman A. (1953).** The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: A literatura review and bibliography. North Carolina Agric. Exp. Stration Tech. Bull. 99:194.

**Klement Z., Rudolph, K., Sands, D. 1990.** Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest. H. Stillman Publishers.

**Lelliott, A., Otead, D. 1987.** Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Methods in Plant Pathology Volume 2. International Maize and Wheat Improvement Centre.

**NAPPO.** ANEXO10 Detección e identificación de *Ralstonia solanacearum* filotipo II, secuevar 1 (raza 3 biovar 2).Documento en revisión por los países miembros de la NAPPO.

**NCBI (2001)** *Ralstonia solanacearum*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser> (consultado 30/05/2011).

**Pastrik, K.H., Elphinstone, J.G. y Pukall, R. 2002.** Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. Eur. J. Plant Pathol. 108:831-842

**Perea Soto J. M., y Cols. 2011.** Identificación de Razas y Biovares de *Ralstonia solanacearum* Aisladas de Plantas de Tomate. Revista Mexicana de Fitopatología. 29 (2): 98-108

**Rodríguez, M. M. L. 2006.** Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Edo. de México. 146p.

**S. A. Weller, J. G. Elphinstone, N. C. Smith, N. Bonham and D. E. Stead, 2000.**Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. p. 2853-2858

**Schaad et al. 2001.** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third edition. APS PRESS.

**Schaad et al. 2008.** Memorias del Primer Simposio Internacional y Segundo Nacional de Bacterias Fitopatógenas, Guadalajara, Jal. México.

**Sneath P. H., Bread R. S., Murray E. G., and R. Smith N. (1986).** Bergeys manual of determination bacteriology. William and Wilkins Co., London, 232 p.

**Torres Aguilar V. M. 2005.** ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Ralstonia solanacearum* RAZAS Y BIOVARES Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología Dirección General de Sanidad Vegetal SENASICA

**Yabuuchi E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa (1992)** Proposal of *Burkholderia* gen nov and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) *Comn Nov Microbiol Immunol* 36:1251-1275.

**Yabuuchi E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, and Y. Nishiuchi (1995)** Transfer of two *Burkholderia* and a *Alcali* genes species to *Ralstonia* Gen Nov: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston *et al.*, 1973) *Comb Nov Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) *Comb Nov* and *Ralstonia eutropha* (Davis, 1969) *Comb Nov Microbiol Immunol.* 39:897-904.

<http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/Pest/Main/136654/4945>

[www.redepapa.com.mx](http://www.redepapa.com.mx)

[www.NCBI.com.mx](http://www.NCBI.com.mx)

Citar:

Dirección General de Sanidad Vegetal - Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF). 2013. **PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO DE *Ralstonia solanacearum* (Smith,1896)Yabuuchi et al 1995 Marchitez bacteriana de la papa.** Estandarizado en proceso de revisión. SAGARPA -SENASICA