



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

Protocolo de Diagnóstico

***Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
(van der Wolf et al., 2005).**

**(Aislamiento e identificación morfológica,
Pruebas bioquímicas, de ELISA y RT-PCR)**

Versión 00

Junio 2014

INDICE

| | Pág. |
|---------------------------------|-------------|
| I. Antecedentes | 4 |
| 1.- Posición taxonómica | |
| 2.- Objetivo | |
| 3.- Origen y distribución | |
| II. Rango de Hospedantes | 4 |
| III. Síntomas y signos | 5 |
| IV. Transmisión y vector | 6 |
| V. Importancia | 7 |
| VI. Protocolo de Diagnóstico | 7 |
| 1.- Envío-recepción | |
| 2.- Recepción e inspección | |
| 3.- Almacenamiento | |
| 4.- Técnicas de detección | |
| 5.- Destrucción de las muestras | |
| VII. Referencias | 28 |

I. ANTECEDENTES

Nombre: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (van der Wolf *et al.*,2005).

Nombre Común: Pudrición anular de la papa

1.- Posición Taxonómica:

Reino: Bacteria

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Familia: Microbacteriaceae

Género: *Clavibacter*

Especie: *michiganensis*

Cms es una bacteria Gram positiva, no móvil, su tamaño oscila entre 0.3–0.6 µm de ancho y 0.5–1.5 µm de largo. En la mayoría de los medios de cultivo crece en forma de bastones corineformes pleomorficos y puede o no encapsularse (Schaad, 2001).

El crecimiento de la bacteria es lento, varía desde 5 a 30 días en temperaturas entre 18 y 21 °C. Las colonias típicas son lisas, redondeadas, de color blanco-crema o marfil (Figura 1), en forma de capsula convexa, con bordes lisos, oscilando su tamaño de 1 a 3 mm de diámetro.

2.- Objetivo:

Describir los procedimientos o metodologías aplicados a la identificación morfológica *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (van der Wolf *et al.*,2005) y su corroboración mediante técnicas moleculares.

3.- Origen y distribución



Fig. 1 *C. michiganensis* sp. *sepedonicus*
Fuente: www.epandi.com

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (van der Wolf *et al.*,2005), (*Cms*) es el agente causal de la “pudrición anular de la papa”, fue encontrada por primera vez en Alemania en 1913, de donde aparentemente fue introducida a Canadá en 1931, extendiéndose rápidamente mediante semilla - tubérculos infectados.

Se encuentra distribuida en Asia, Europa y América del Norte. Esta bacteria ocasiona la destrucción de los tejidos vasculares, marchitez y una subsecuente muerte de las plantas, así como la pudrición secundaria de los tubérculos (Rodríguez, 2010).

Cms se encuentra en los listados A1 de plagas y enfermedades cuarentenarias. Afecta al cultivo de la papa causando los mayores daños en tubérculos ya que estos resultan comercialmente inservibles.

II. RANGO DE HOSPEDANTES



Fig. 3 Papa afectada por *C. michiganensis* sp. *s.*
Fuente: J.D. Janse, Plant Protection Service .

Su hospedante natural es la papa (*Solanum tuberosum* L.).

El betabel (*Beta vulgaris*) se ha descrito como un hospedante asintomático, la bacteria coloniza las raíces.

El jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.), la berenjena (*Solanum melongena* L.) y el toloache (*Datura stramonium* L.) son susceptibles al inocularlas artificialmente (Kado, 2010).

III. SÍNTOMAS Y SIGNOS

Las plantas afectadas por esta bacteria muestran síntomas entre los 80 y 120 días después de la plantación, debido al lento desarrollo de la enfermedad.

La infección se inicia con tubérculos infectados por la bacteria, la cual migra hacia el tallo vía haces vasculares y a su vez hacia los estolones; las plantas pueden mostrar ciertos síntomas iniciales característicos, tales como, enanismo, entrenudos cortos y de aspecto aterciopelado, malformaciones terminales y necrosis marginal de los folíolos. La bacteria provoca marchitez de las hojas y tallos a partir de la mitad del periodo vegetativo de la planta. Primero se marchitan las hojas inferiores, éstas se enrollan ligeramente en los márgenes hacia arriba y su interior, y adquieren un color verde pálido, luego se tornan amarillas, marrones y finalmente necróticas (**Fig. 3**).



Fig. 3 Marchitez en planta y hojas de papa causadas por *Cms*

Fuente: Spieckermann & Kotthoff, www.ziraatciler.com y www.bitkisagligi.net

En ciertas ocasiones los folíolos muestran un amarillamiento que comienza en los bordes y avanza hacia la nervadura central (Figura 3), en otras, se observa una marchitez parcial o total de una o más hojas inferiores o sus secciones, además el follaje puede estar necrosado marginalmente (Rodríguez, 2010).



Fig. 4 Amarillamiento y necrosis de los folíolos causado *Cms*

Fuente: S. H. de Boer

En los tallos se observa una marchitez ascendente, comenzando por la base, afectando a uno o varios tallos de la misma planta, e incluso a un solo sector del mismo tallo. Además en algunos casos se presenta una ligera de coloración al pie de las plantas.

En tubérculos, el síntoma más precoz es una ligera transparencia de los tejidos que rodean al sistema vascular, especialmente en la zona próxima al estolón. En un estado de infección más avanzado se observa una separación definitiva del anillo vascular y los tejidos adyacentes, al presionar ligeramente emergen fibras de los vasos y un exudado de los tejidos colindantes (Fig. 5a). Finalmente, el anillo vascular se oscurece y los tejidos adyacentes comienzan a descomponerse, llegando a veces a separarse de la corteza del tubérculo. Cuando la infección está muy avanzada las bacterias pueden salir de la región vascular al exterior del tubérculo, originando hinchamientos y deformaciones externas, a modo de hoyos, cráteres, fisuras y hendiduras irregulares (Fig. 5b y 5c), cuyos bordes adquieren una coloración rojiza.



Fig. 5 a Exudado bacteriano en tubérculo, b y c fisuras y hendiduras en tubérculo de papa, causadas por Cms.
 Fuente: Dr. S. H. de Boer

IV. TRANSMISIÓN Y VECTOR

El agente causal puede sobrevivir de una temporada a otra principalmente en tubérculos infectados, los cuales pueden manifestar síntomas o, por el contrario, presentar una apariencia totalmente normal (infección latente). También puede permanecer viable por nueve meses o más como mucosidad seca adherida a bolsas, canastos, etc.

La transmisión de planta a planta puede ser por heridas, a través de los estomas o las lenticelas, pero se conoce que también por “mordeduras” realizadas por insectos, principalmente por el escarabajo de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata* Say, Coleoptera: Chrysomelidae, **Fig. 6a**) y por picaduras realizadas por el pulgón verde del durazno (*Myzus persicae* Sulzer, Homoptera: Aphididae, **Fig. 6b**).

También puede diseminarse mediante la maquinaria o equipo, con herramientas que han estado en contacto con planta, tubérculos o suelo contaminados, es importante mencionar que también el transporte es un medio de diseminación.

En los estados iniciales de la enfermedad la diseminación es favorecida por el manejo que se le da a los tubérculos durante la siembra, traslado y almacenamiento; en el cultivo en desarrollo, la bacteria pasa de los tubérculos madre a los tubérculos hijos a través del sistema vascular de los estolones. También la diseminación puede darse por agua de riego, lo que favorece el contacto de las raíces entre plantas contiguas (Rodríguez, 2010).

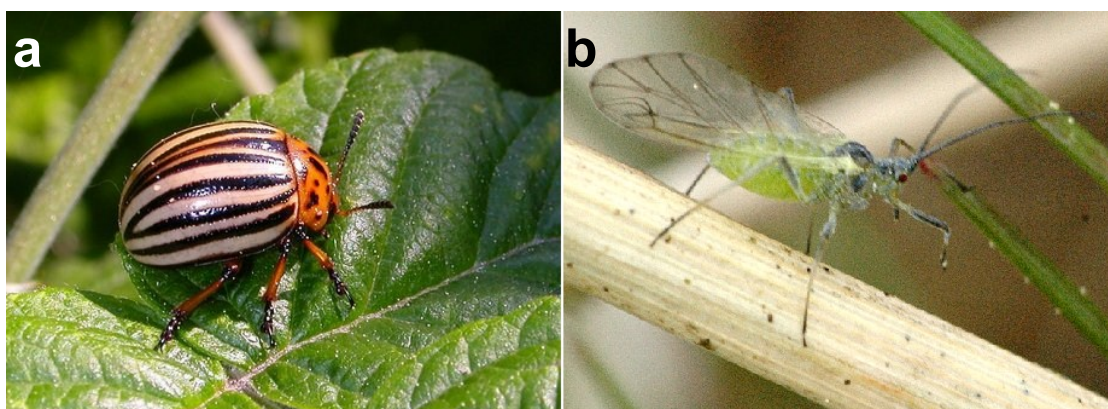


Fig. 6 a *Leptinotarsa decemlineata* Say, Coleoptera y b *Myzus persicae* Sulzer, Homoptera
 Fuente: Václav Hanzlík y James K. Lindsey.

V. IMPORTANCIA

La pudrición anular de la papa (*Solanum tuberosum* L.) causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, es una de las enfermedades bacterianas de más alto riesgo para este cultivo por los daños directos en campo y en almacén, aunado a los gastos implicados en la desinfección de contenedores y utensilios involucrados en el proceso de producción, distribución y almacenamiento. Durante muchas décadas esta fue la principal enfermedad en papa en los Estados Unidos, donde se han reportado pérdidas anuales de entre 10 y 15% de la producción anual total (Rodríguez, 2010).

Se han reportado pérdidas del 50% en Norteamérica (Easton, 1979), en Rusia del 47% (Muller & Ficke, 1974), en Europa la enfermedad se ha presentado esporádicamente y con niveles bajos de infección, Francia ha reportado pérdidas de hasta el 30% de su producción (Landsade, 1950). Las pérdidas económicas se deben a la marchitez y a la pudrición de los tubérculos tanto en campo como en almacén. Indirectamente las pérdidas se incrementan al tener que aplicar medidas de control como lo es la desinfección de contenedores, maquinaria, almacenes, la prohibición de siembra y la restricción o prohibición de exportaciones (EPPO/CABI 1996).

La presencia de esta bacteria implica medidas cuarentenarias estrictas y cuenta con cero tolerancia para procesos de certificación de semilla. El patógeno es de carácter sistémico y puede afectar el tejido foliar de la papa, sin embargo, el daño principal lo ocasiona en el tubérculo al destruir el anillo vascular, existe además un riesgo latente de dispersión porque existen plantas y tubérculos asintomáticos, razón por lo que como profesional de la fitosanidad se debe poner énfasis especial para su diagnóstico.

La medida de cero tolerancia en los programas mundiales de certificación de semilla-tubérculo ha ayudado favorablemente en el control de la diseminación de esta enfermedad (Kado, 2010).

En los últimos años México ha importado tubérculos de papa de Canadá y Estados Unidos, lugares donde esta enfermedad es muy común, por lo que la SAGARPA estableció cero tolerancia en los lotes, debido a que es muy contagiosa (Rodríguez, 2010).

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. Para el caso de papa para consumo se muestrean 200 tubérculos.

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

La muestra se debe dividir en submuestras de 50 tubérculos cada una, identificarlas apropiadamente, indicando el número de muestra, remisión, lote y fecha.

Del tubérculo, 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 (Fig. 7).

Cada submuestra debe congelarse para posteriormente macerarse y homogeneizar ese material, posteriormente se separa en porciones iguales en bolsas plásticas; 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 Cms por la técnica de ELISA y otra para realizar la PCR (Fig. 8).

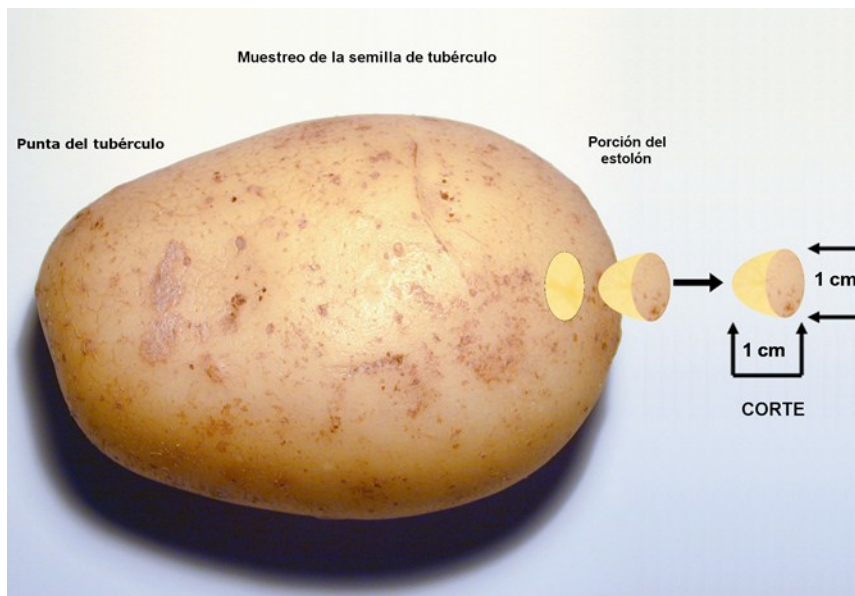


Fig. 7 Muestreo del tubérculo.

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

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 necrosis en los vasos vasculares. Se coloca dentro de una bolsa de plástico, si presenta síntomas característicos 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.



Fig. 8 Separación del macerado de las muestras.

Fuente: Laboratorio de Bacteriología/CNRF

3.- Almacenamiento

Las muestras se conservan a 4°C y a -20°C los macerados 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 dos técnicas alternas por lo menos: aislamiento del patógeno en medio de cultivo, pruebas bioquímicas y mediante la técnica serológica de ELISA y la PCR (Fig. 9). 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*).

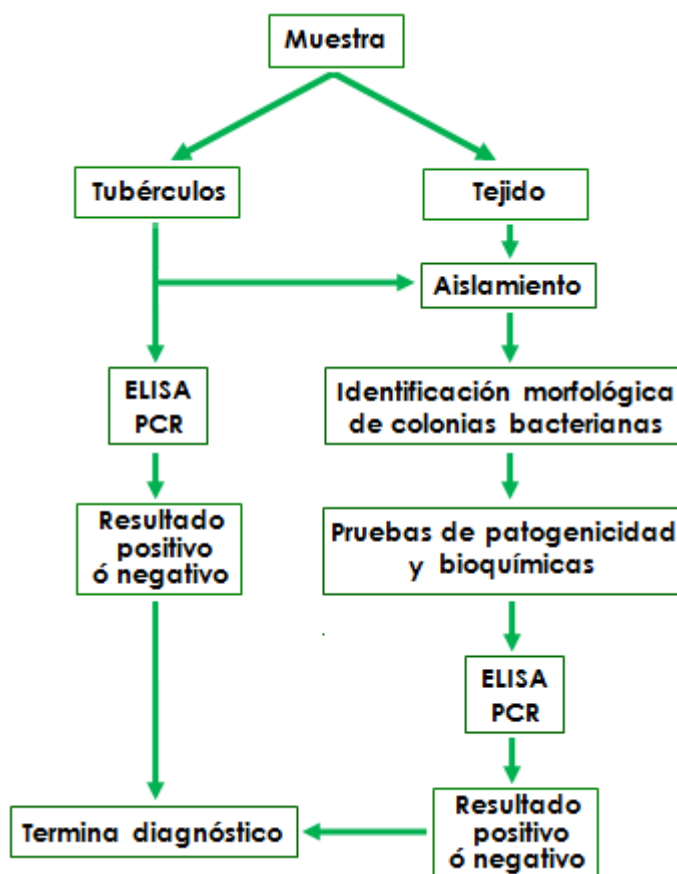


Fig. 9 Esquema de trabajo

1. Aislamiento e identificación morfológica de la bacteria

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 los haces vasculares y peciolo de las hojas, que presentan síntomas avanzados, por lo que se consideran muestras muy buenas para realizar los aislamientos. Los tallos y tubérculos que muestren síntomas iniciales de la enfermedad, estos deben cortarse longitudinalmente y separarse las porciones que presenten coloración. En los casos de posible infección latente se extrae la zona del anillo próxima al estolón (Fig. 10).

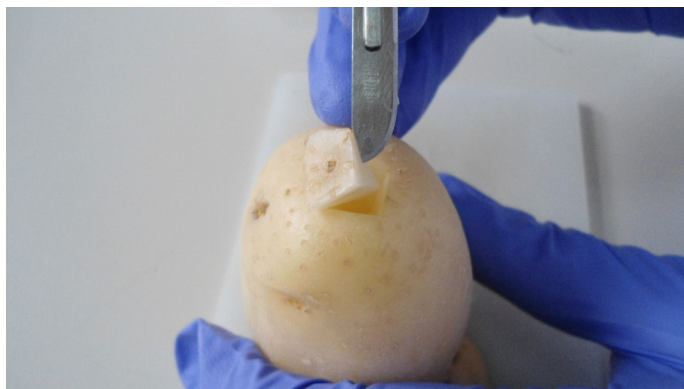


Fig. 10 Separación del macerado de las muestras.

Fuente: Laboratorio de Bacteriología/CNRF

Los fragmentos se colocan en una placa petri estéril, se cortan porciones más pequeñas con un bisturí, se transfieren a un tubo de ensaye con 1 ml de agua estéril y se dejan reposar durante 30 minutos (Fig. 11). Una gota del extracto se extiende sobre un medio de cultivo apropiado (YGM modificado o NCP-88) y se incubó a 21-25° C.

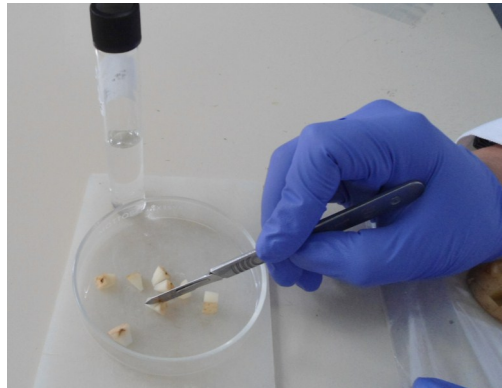


Fig. 11 Segmentación de los estolones para siembra.

Fuente: Laboratorio de Bacteriología/CNRF

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.

El crecimiento de la bacteria es lento, varía desde 5 a 30 días en temperaturas entre 18 y 21 °C. Las colonias típicas son pequeñas, lisas, redondeadas, no producen pigmentos son traslúcidas, de color blanco-crema o marfil (**Fig. 12**) dependiendo del medio de cultivo empleado, semifluidas en forma de capsula convexa, con bordes lisos, oscilando su tamaño de 1 a 3 mm de diámetro.

En general el crecimiento en medios artificiales es lento va de 5 a 7 días, se recomienda incubar a temperatura ambiente (23°C), se desarrollan colonias, blancas, crema o amarillas pálidas.

Para su crecimiento requiere de biotina, tiamina, ácido nicotínico, histidina, purinas y pirimidinas.

En el medio YGM modificado las colonias bacterianas son visibles a los 4-6 días, estas son pequeñas, ligeramente plateadas y con una leve apariencia azulada.

En medio NCP-88 a 25° C las colonias son visibles a los 5 días, llegando a un diámetro de 0.5 – 1.5 mm, a los 7 días estas colonias son redondeadas a irregulares, con márgenes enteros, de color blanco a crema, levantadas y usualmente mucoides y brillantes. Después de 10 a 12 días las colonias toman un color amarillo pálido.



Fig. 12 Crecimiento de *C. michiganensis* sp. *sepedonicus*.

Fuente: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=306, S/D

2. Pruebas Bioquímicas.

Para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de *Cms*, 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. La siguiente tabla muestra las pruebas que deben realizarse a los aislamientos obtenidos.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

| Prueba | Resultado |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Crecimiento en NBY | Blanco/translúcido |
| Crecimiento en CNS y TTC | - |
| Tinción de Gram y/o Reacción de KOH | Gram positiva (+) / KOH (-) |
| Prueba de patogenicidad en berenjena | + |
| Reacción de O/F | +/- |
| Crecimiento a 30 °C | + |
| Crecimiento a 37 °C | - |
| Oxidasa | - |
| Ureasa | - |
| Hidrólisis de almidón** | + |
| Hidrólisis de Esculina* | + |
| Hidrólisis de Caseína* | - |
| Utilización de Acetato*** | + |
| Utilización de Succinato*** | + |
| Producción de ácido a partir de: | |
| Manitol** | + |
| Ribosa* | - |
| Sorbitol* | + |
| Tolerancia de NaCl al 7% | - |

V= Resultado variable

* Schaad *et al.*, 2001

** Rodríguez, 2006

*** De la Cruz *et al.*, 1992

Reacción de KOH

La solubilidad del KOH (RYU, 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 liberan DNA que es un compuesto muy viscoso.

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

- Es importante que la solución de KOH al 3% sea preparada máximo con 3 días de anticipación para la realización de la prueba, así como utilizar colonias jóvenes, de lo contrario se pueden producir resultados erróneos.

Crecimiento a 35 °C.

El crecimiento a 35 °C de temperatura de igual manera se determina en medio de cultivo YDC. La temperatura de crecimiento de los medios de cultivo con las cepas bacterianas se debe de mantener en 35°C durante 5 días. Poniendo a prueba la resistencia de las bacterias. Si hay crecimiento, la prueba se considera positiva, de no haber crecimiento se considera negativa.

Pruebas de Patogenicidad

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.

- 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 $1 \times 10^8 - 10^9$ UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). Inocular por inyección en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun). Las plantas inoculadas se mantienen a temperatura ambiente (23 °C).
- Se evalúa la reacción dentro de las 48 horas posteriores a la inoculación, si la zona infiltrada presenta pérdida de turgencia o necrosis (**Fig. 13**), la prueba se considera positiva, cuando la reacción es rápida indica que la cepa probada es altamente virulenta (Nissinen *et al.*, 1997).
- También se utilizan como plantas indicadoras la berenjena (*Solanum melongena* L.) y el toloache (*Datura stramonium* L.) al inocularlas en una etapa de 4 a 6 hojas (Kado, 2010)



Fig. 13 Reacción de hipersensibilidad en tabaco
Fuente: Laboratorio de Bacteriología/CNRF

Reacción de oxidación y fermentación

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).

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* es una bacteria estrictamente aerobia.

- 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. Por ejemplo esta reacción se puede utilizar para diferenciar bacterias de género *Pseudomonas*, donde generalmente las fitopatógenas son negativas, mientras que las saprófitas son positivas.

- 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 rosa o roja la prueba es positiva. Si no se presenta dicha coloración a los 60 segundos la prueba es negativa.
- 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.

Ureasa.

Esta es una prueba taxonómica importante dentro de la bacteriología. Las bacterias que presentan esta enzima, utilizan el nitrógeno de la urea, hidrolizándola en dos moléculas de amoníaco produciendo álcalis, los cuales se ponen de manifiesto por un cambio de pH en el medio de cultivo.

- Sembrar la bacteria masivamente en dos tubos con medio de ureasa en incubar a 27 °C durante 14 días y de ser posible con agitación constante.
- Un incremento en la alcalinidad indica una reacción positiva y se hace evidente por la aparición de un color rojo magenta.

Prueba de tolerancia al Cloruro de Sodio (NaCl %).

La prueba de tolerancia a la sal (NaCl %) permite diferenciar las subespecies de éste Género.

- Sembrar la bacteria masivamente en dos tubos para cada concentración de NaCl (1-10 %) con caldo nutritivo e incubar a 25 °C durante 14 días y de ser posible con agitación constante.
- La turbidez del medio de cultivo indica el crecimiento de la bacteria y por lo tanto es una reacción positiva de tolerancia a la concentración de la sal.

Si no hay crecimiento después del tiempo de incubación, la prueba es negativa.

Hidrólisis de almidón.

El almidón es un polímero de glucosa, ampliamente distribuido en el reino vegetal como sustancia de reserva. Ciertas bacterias fitopatógenas, son capaces de depolimerizar el almidón por medio de enzimas extracelulares, conocidas como β y α amilasas, las cuales hidrolizan el almidón de la maltosa.

- Transferir una asada de la cepa bacteriana pura a una caja con medio de almidón y sembrar por medio de estría simple, incubar por 4 días a 28 °C. Pasado este periodo observar la caja a contra luz y agregar unas gotas de solución de lugol a todo el medio de cultivo.
- Si después de adicionar el lugol se forma un halo transparente por abajo o alrededor del crecimiento bacteriano, considerar la prueba positiva, en cambio, si el medio de cultivo adquiere una coloración morada significa que el almidón no ha sido degradado y por lo tanto la prueba es negativa.
- Cuando se utiliza este medio de cultivo, se puede evaluar la actividad amilolítica de las bacterias, simplemente con su crecimiento, si hay buen crecimiento bacteriano y se observa a contra luz se podrá distinguir un halo más claro en el medio de cultivo que circunda la bacteria.

Hidrólisis de esculina.

La producción de glucosidasas de las bacterias permite la hidrólisis de la esculina al reaccionar con el Fe³⁺ 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.
- La prueba puede definirse también, si es positiva o negativa al observar a simple vista como el medio toma una tonalidad negruzca.

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.
- 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.

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 ₂ HPO ₄ | 1.5 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ 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 NBY (Caldo nutritivo-extracto de levadura-agar)

| | |
|---------------------------------|---------|
| Caldo Nutritivo (Difco) | 8.0 g |
| Extracto de levadura | 2.0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.50 g |
| Glucosa | 2.5 g |
| Agar | 15.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Esterilizar por separado 50 mL de solución glucosa al 10% y 1 mL de solución de MgSO₄ x 7 H₂O a 1M. Cuando el medio tenga una temperatura de 50-45 °C adicionar las soluciones anteriores y vaciar en cajas. Estas soluciones también se pueden esterilizar por medio de filtración millipore.

Medio YGM

| | |
|--|---------|
| Extracto de levadura | 2.0 g |
| D (+) Glucosa x H ₂ O | 2.5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0.25 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.25 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.1 g |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 0.015 g |
| NaCl | 0.05 g |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.005 g |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.005 g |
| Agar | 15.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Este medio permite el desarrollo de *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Disolver todos los ingredientes en el agua hasta hervir el medio y esterilizar en forma habitual

Medio YGM modificado

Al medio YGM indicado anteriormente se adicionan los siguientes inhibidores:

| | |
|---|----------|
| Polymyxin B sulfato (SIGMA P-1004) | 30 mg/ |
| Acido nalidixico (SIGMA N-8874) | 2 mg/l |
| S-0208 (Sumuto no Chen Co. Osaka Japón) | 125 mg/l |

Disolver el ácido nalidixico en NaOH, diluido 100 veces en agua destilada. Los inhibidores se aplican por filtración Millipore, cuando el medio alcance una temperatura de 50° C, en un volumen de 0.5% del volumen final del medio.

Medio NCP-88

| | |
|--|---------|
| Agar nutriente Difco | 23.0 g |
| Extracto de levadura | 2.0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.50 g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0.25 g |
| D-manitol | 5.0 g |
| Agar | 15.0 g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Esterilizar en forma habitual y dejar enfriar hasta 50° C para adicionar por filtración los siguientes inhibidores (por litro): 300 µg de polymyxyn B-sulfato stock (7.900 U por mg, 10 mg/ml stock); 800 µ de ácido nalidixico stock (sal de Na, disuelto en 10 mM NaOH, 10 mg/ml stock), y 2 ml de cyclohexamida stock (disuelto en 47.5% de etanol, 100 mg/ml stock).

Medio para la producción de ácido a partir de carbohidratos

| | |
|--------------------|----------|
| Peptona | 10.0 g |
| Hidrato de carbono | 10.0 g |
| Azul de bromotimol | 0.0003 g |
| Agua | 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 ensaye previamente esterilizados.

Medio para la producción de Ureasa

| | |
|--|---------|
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 0.5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g |
| MgSO ₄ • 7H ₂ O | 0.2 g |
| NaCl | 5 g |
| Extracto de levadura | 1 g |
| Rojo de cresol | 0.016 g |
| Urea | 20 g* |
| Agua destilada | 800 mL* |

Preparación: Disuelva los reactivos excepto la urea. Esterilice a 121°C por 15 minutos. *Disuelva 20 g de urea en 180 mL de agua destilada y esterilice por filtración. Adicione la urea asépticamente al medio basal. Volumen final: 1 litro. Mezcle y vacíe en tubos estériles.

Medio para probar la tolerancia al Cloruro de sodio (NaCl)

| | |
|-------------------|---------|
| Extracto de carne | 3 g |
| Peptona | 5 g |
| Glucosa | 2.5 g |
| Agua destilada | 1000 mL |

Preparación: Adicione NaCl para obtener concentraciones de 1-10%. Esterilice a 121°C por 15 minutos. Vacíe en tubos estériles.

3. Técnica de ELISA

Para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se utiliza la técnica serológica ELISA que está basada en la relación inmunológica, entre anticuerpos que reconocen y se unen a un antígeno específico siendo este el patógeno. Es una técnica confiable y rápida para la detección de fitopatógenos.

Se han desarrollado algunas variantes, pero hasta el momento el método directo de DAS-ELISA (Double Antibody Sándwich) es el más utilizado (Salazar, 1990). Consiste en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno, en la que, posteriormente se añade el antígeno que reacciona con los anticuerpos adheridos a la placa, complementado con la adición de un conjugado enzimático (segundo anticuerpo) para formar el complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo.

El protocolo que se emplea es el desarrollado por la Compañía Agdia, DAS ELISA /SRA 70002/1000 conjugado con fosfatasa alcalina, que se describe a continuación.

Procedimiento:

1. Sensibilizar la placa. Preparar la dilución del suero en la solución amortiguadora de Cobertura de acuerdo a la concentración indicada en el juego de antisueros. Colocar mediante una micropipeta, un volumen de 100 µl de la mezcla de la dilución en cada pozo de la placa que se requiere para el ensayo (se toma en cuenta que cada muestra se corre por duplicado y se deben considerar los controles o testigos tanto negativos como positivos) sensibilizar en base al diseño previamente realizado en el formato de distribución de muestras, se deben asignar 2 pozos como blancos y no agregar ningún reactivo excepto en el último paso (revelado de la placa). Incubar toda la noche a 4 ± 1°C en refrigerador o 4 horas a temperatura ambiente.

2. Lavar la placa de poliestireno 8 veces mínimo con solución amortiguadora de lavado (PBST 1X), dejar reposar 4 minutos y sacudir la placa en papel secante.
3. Preparar la muestra. Seleccionar el tejido vegetal adecuado como son los estolones y separar en bolsas específicas para Cms. Adicionar la solución amortiguadora de extracción indicada (MEB) en una relación 1:10 (peso/volumen) y macerar (**Fig. 14**).

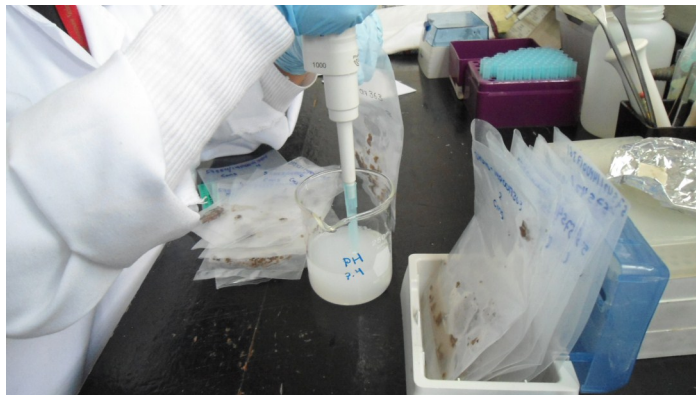


Fig. 14 Separación del macerado de las muestras.

Fuente: Laboratorio de Bacteriología/CNRF

4. Adicionar el extracto de la muestra vegetal que se va a probar en cada uno de los pozos. Preparar los controles y colocar en los pozos designados para testigos negativos 100 μ l de solución amortiguadora de extracción con muestra o liofilizado de planta sana. Preparar la dilución del testigo positivo (liofilizado de bacteria diluida en solución amortiguadora) y colocar 100 μ l por pozo.
5. Incubar la placa en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en refrigeración.
6. Lavar la placa de poliestireno mínimo 8 veces seguidas y dejar reposar 4 minutos.
7. Preparar la dilución del antisuero conjugado en la solución amortiguadora de conjugado (ECM) de acuerdo a la concentración indicada en el juego de antisueros.
8. Adicionar la dilución del antisuero conjugado en cada uno de los pozos utilizados.
9. Dejar incubar la placa en cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente.
10. Lavar la placa de poliestireno de 5 a 8 veces.
11. Adicionar el sustrato indicado para este juego de antisueros (PNP). Colocar 100 μ l en todos los pozos incluyendo los blancos. Incubar en cámara húmeda en condiciones de obscuridad de 15 a 30 minutos.
12. Realizar la valoración de la caja; observar si hay coloración en los pozos, registrar esta información y leer la placa en el Lector de placas de ELISA.

Interpretación de resultados

La medición de la reacción se hace con la ayuda de un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 405nm o como lo indique el instructivo que acompaña al kit de anticuerpos ya que en algunos casos utiliza diferente solución amortiguadora para revelar y puede dar otra coloración.

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

La reacción se considera positiva (presencia de la fitobacteria) 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 la 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.

Soluciones amortiguadoras

Para preparar todas las soluciones amortiguadoras se debe contar con: probetas, vasos de precipitado, balanza, espátulas, barras magnéticas, termoagitador magnético, potenciómetro, micropipetas, puntas para micropipetas, papel secante y refrigerador.

Para ajustar el pH de las soluciones se utiliza Ácido clorhídrico al 50% para acidificar la solución e Hidróxido de sodio 3M para basificarla.

a) Solución amortiguadora de cobertura

- 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.
- Pesarse en una balanza analítica las cantidades de los siguientes reactivos.

| | |
|------------------------------|--------|
| Carbonato de Sodio (anhidro) | 1.59 g |
| Bicarbonato de Sodio | 2.93 g |
| Azida de sodio* | 0.2 g |

- Agregar cada uno de los reactivos en el vaso con agua para que se disuelvan.
- Vaciar el resto del agua en el vaso (100mL), para homogeneizar la mezcla.
- Ajustar el pH a 9.6 (+/- 0.02).
- Para ajustar el pH de las soluciones se utiliza Ácido clorhídrico 30% e Hidróxido de Sodio 3M.
- Guardar la solución en un frasco para reactivo debidamente etiquetado.
- Almacenar a 4°C

*** Nota: La Azida de Sodio inhibe la respiración celular. Evite el contacto con la piel.**

b) Solución amortiguadora de Fosfatos (Lavado) PBST (1X)

Medir 1000 ml de agua destilada en probeta:

- Vaciar 900 ml de agua en un vaso de precipitado de 1000 ml y colocar una barra magnética.
- Colocar el vaso sobre una parrilla de agitación y encenderla.
- Pesarse en una balanza analítica las cantidades de los siguientes reactivos:

| | |
|--|----------|
| Cloruro de sodio | 8.0 g |
| Fosfato de Sodio, dibásico (anhidro) | 1.15 g |
| Fosfato de Potasio, monobásico (anhidro) | 0.2 g |
| Cloruro de Potasio | 0.2 g |
| Tween 20 | 0.5 g/ml |

- Agregar cada uno de los reactivos en el vaso con agua para que se disuelvan.
- Vaciar el resto del agua en el vaso para homogeneizar la mezcla.
- Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.02) mediante un potenciómetro.
- Guardar la solución en un frasco para reactivo debidamente etiquetada.
- Almacenar a 4°C (en refrigeración)

La solución de lavado puede prepararse concentrada (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 (+/- 0.02)

c) Preparación de 1000 ml de Solución amortiguadora de Extracción-MEB (Macerado de muestras vegetales).

- Medir 250 ml de solución amortiguadora de Fosfatos 1X (PBST) en una probeta.
- Vaciar el PBST en un vaso de precipitado y colocar dentro una barra magnética.
- Colocar el vaso sobre una parrilla de agitación y encender.
- Pesarse en una balanza analítica las cantidades de los siguientes reactivos:

| | |
|-----------------------|--------|
| Leche libre en grasas | 1 g |
| Tween 20 | 1.25 g |

- Agregar cada uno de los reactivos en el vaso con PBST para que se disuelvan.
- **Agitar por 30 minutos** antes de su empleo.
- Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.02) mediante un potenciómetro.
- Este buffer contiene leche baja en grasa la cual provee proteína para bloquear, por lo que solo se debe preparar la cantidad requerida para la prueba y no se podrá reutilizar.

d) Preparación de la solución amortiguadora para diluir el antisuero conjugado (ECM)

- Medir 100 ml de la solución amortiguadora de Fosfatos 1X (PBST).
- Vaciar el PBST en un recipiente.
- Pesarse en una balanza analítica la cantidad del siguiente reactivo:

| | |
|-----------------------|-------|
| Leche libre en grasas | 0.4 g |
|-----------------------|-------|

- Agregar cada uno de los reactivos en el vaso con PBST para que se disuelvan
- **Agitar por 30 minutos** antes de su empleo
- Ajustar el pH a 7.4 (+/- 0.02) con un potenciómetro.
- Este buffer contiene leche baja en grasa la cual provee proteína para bloquear, por lo que solo se debe preparar la cantidad requerida para la prueba y no se podrá reutilizar.

e) Preparación de la solución amortiguadora para diluir el antisuero conjugado (ECM)

- Medir 80 ml de agua destilada en una probeta de 100 ml.
- Vaciar el agua en un vaso de precipitado de 250 ml y colocar una barra magnética.
- Colocar el vaso sobre una parrilla de agitación y encender.
- Medir 9.7 ml de dietanolamina en una probeta de 10 ml
- Vaciar la dietanolamina en el agua y disolver.
- Pesarse en una balanza analítica: Azida de Sodio 0.02 g
- Agregar al vaso y disolver.

- Agregar el resto del agua para completar 100 ml.
- Ajustar el pH a 9.8 (+/- 0.02) con ácido clorhídrico, mediante un potenciómetro.
- 10. Vaciar la solución en un frasco oscuro para reactivo debidamente etiquetada.

Nota: La Dietanolamina, es un agente cancerígeno. Evite el contacto con la piel.

f) Preparación del sustrato

Diluir la pastilla de P - nitrofenilfosfato (PNP) en solución amortiguadora de revelado se recomienda diluir en una relación 1: 1 (peso –mg / volumen -ml) preparar la cantidad necesaria a utilizar. Es necesario evitar la incidencia de la luz sobre la solución amortiguadora así como en la mezcla, por lo que se recomienda cubrir con papel aluminio el recipiente.

g) Dilución del testigo positivo

Al vial que contiene la bacteria liofilizada que pertenece al kit comercial agregue 2 ml de solución amortiguadora de extracción mezclar perfectamente y preparar alícuotas de 120 µl como lo indica el protocolo, mantener en congelación. Posteriormente a un vial que contiene la dilución de la bacteria liofilizada (120µl), agregue 100 µl de solución amortiguadora de extracción mezcle. De esos 220 µl colocará 100 µl en un pozo y otros 100 µl en lo que es su repetición.

h) Dilución del testigo negativo

Al vial que contiene la muestra vegetal (tejido de papa) liofilizada que pertenece al kit comercial agregue 2 ml de solución amortiguadora de extracción mezclar perfectamente y preparar alícuotas de 120 µl como lo indica el protocolo, mantenerlas en congelación. Posteriormente a un vial que contiene la dilución de la bacteria liofilizada (120µl), agregue 100 µl de solución amortiguadora de extracción mezcle perfectamente. De esos 220 µl colocará 100 µl en un pozo y otros 100 µl en lo que es su repetición.

4. Técnica PCR

PCR es un método de detección altamente sensible y específico (Minsavage *et al.*, 1994), se han desarrollado iniciadores específicos que amplifican ADN de Cms: Cms 6, Cms 7.

Extracción de los ácidos nucleicos totales

- Revisar la muestra para localizar algún tipo de daño en cualquiera de los órganos disponibles de la planta. Si hubiera daño, seleccionar zona de avance de la enfermedad, si no hay, toma el o los órganos que pudieran tener una infección latente. Pesar en balanza analítica de 50 a 100 mg y colocar el tejido en un mortero estéril y congelado a ultrabaja temperatura.
- Triturar la muestra hasta obtener una consistencia de polvo. Depositar el polvo en un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 a 2.0 ml, en el cual, previamente han sido colocados 500 µl, de la solución de lisis Concert®. Se utiliza esta solución ya que por lo regular el tejido que se emplea contiene alta cantidad de inhibidores (vid, frambuesa etc.).
- Agitar en vortex y dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugar por 2 minutos a 13 000 r.p.m. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 a 2.0 ml.
- Adicionar 100 µl de cloruro de sodio 5M para clarificar el extracto y agitar por inversión. Adicionar 300 µl de clorofórmico y mezclar en vortex. Centrifugar por 10 minutos a 13 000 rpm, para separar las fases. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 a 2.0 ml. PCR es un método de detección altamente sensible y específico (Minsavage *et al.*, 1994), se han desarrollado iniciadores específicos que amplifican ADN de Cms: Cms 6, Cms 7.

Si la pastilla presenta un aspecto de amarillento a café; dar un lavado con una solución de lavado de la siguiente manera:

- Desechar cuidadosamente el sobrenadante y adicionar 300 μl de Etanol al 70 % y centrifugar y por 5 minutos a 13,000 r.p.m. Desechar cuidadosamente el sobrenadante y deja secar la pastilla como mínimo 20 minutos a temperatura ambiente.
- Resuspender la pastilla en 50 μl de agua libre de nucleasas y almacenar de 4 a 20°C hasta su uso.

Verificación de la integridad de los ácidos nucleicos extraídos

- Preparar un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE o TBE 1X y teñir antes de solidificar con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio o con GelRed.
- Mezclar 2 μl de buffer de carga (Loading buffer 1X) con 2 μl de las extracciones obtenidas y colocar en el gel que debe estar sumergido en buffer TBE o TAE 1X. Correr la electroforesis de 75 a 80 voltios por 10 minutos y ± 100 voltios por 20 minutos.
- Observar la integridad en transluminador de luz ultravioleta.
- Nota: la integridad es aceptable cuando solo se observa una banda de alto peso molecular. La cantidad se puede evaluar de manera cualitativa, esto es banda ancha buena cantidad, banda estrecha poca cantidad.
- Tomar las lecturas del espectrofotómetro. Hacer la dilución pertinente con el objetivo final de tener $\pm 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en agua libre de nucleasas.

Verificación de la calidad y cantidad del ADN por espectrofotometría

- Leer la calidad y cantidad de ADN en el espectrofotómetro.
- Hacer la dilución pertinente llevando la concentración del ADN a $1 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ en agua estéril libre de nucleasas y verificar que la calidad de la muestra se encuentre entre 1.8 y 2.0 de pureza.

Para el caso de organismos con genoma de ADN 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 realizar una PCR para la detección de *Cms*.

Pasos para realizar la PCR para gen endógeno 16S

- Descongelar sobre hielo los reactivos para la PCR y calcular las cantidades necesarias por tubo de reacción, de acuerdo al siguiente cuadro:

Cuadro 2. Concentraciones de reactivos para la PCR de gen endógeno 16S

| | Reactivo | Concentración inicial (invitrogen) | Concentración final | Volumen 1 tubo |
|----------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| 1 | Buffer | 10X | 1X | 5.0 μL |
| 2 | MgCl ₂ | 50mM | 1.5mM | 1.5 μL |
| 3 | dNTP's | 10mM | 200 μM | 1.0 μL |
| 4 | 16s1 | 10pmoles/ μL | 20 pmoles | 2.0 μL |
| 5 | 16s2 | 10pmoles/ μL | 20 pmoles | 2.0 μL |
| 6 | Taq polimerasa | 5U/ μL | 1.5 U | 0.3 μL |
| 7 | DNA | | 50 - 100 ng | 2.0 μL |
| 8 | Agua grado PCR | | | 36.2 μL |
| Volumen Final | | | | 50.0 μL |

- Primers usados para gen endógeno 16s, amplificando un producto de 315 pb, cuyas secuencias son:

Cuadro 3. Secuencia de primers para la amplificación del endógeno 16S (Trejo, 2002).

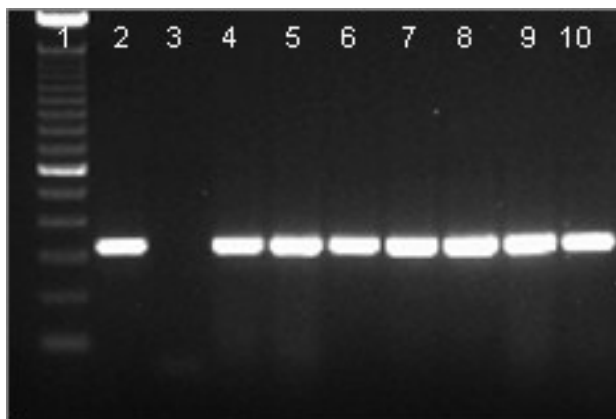
| Iniciadores | Secuencia | Fragmento pb |
|-------------|------------------------------|--------------|
| 16s1 | 5'- TgAgAATggATAAgAggCTC -3' | 315 |
| 16s2 | 5'- TgTTgTTCCCCTCCCAAggg -3' | |

- Después de haberse descongelado los reactivos preparar el master mix de PCR, sobre hielo y en la campana de seguridad (área blanca). Alicuotar 48 μ L de la mezcla de reactivos en tubos de PCR estériles, previamente etiquetados.
- Colocar 2 μ L del ADN de la muestra en el área gris (previamente diluido a 1 μ g/mL \pm 0.5 μ g/mL) y los controles de la reacción de PCR (control positivo y negativo) y agregar si es necesario 25 μ L de aceite mineral a cada tubo.
- Colocar la muestra en el termociclador y el programa de acuerdo al siguiente cuadro.

Cuadro 4. 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 |

- Sacar los tubos del termociclador (reacción de PCR), tomar 10-15 μ L del producto de PCR y mezclar con 3 μ L de buffer de carga sobre papel parafilm. Depositar en los pozos del gel de agarosa al 1.5 %. teñido con 1 μ L de bromuro de etidio (0.5mg/mL) en buffer TAE o TBE 1X.
- Colocar las muestras de la siguiente manera:



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

Fig. 15 Amplificación de gen endógeno 16S (315 pb)

Fuente: Laboratorio de Bacteriología/CNRF

- Correr la electroforesis 5 min a 80 volts y posteriormente 60 minutos a 100 volts. Transcurrido el tiempo apagar la fuente de poder y observar sobre un transluminador de luz UV un fragmento de 315 pb y tomar la fotografía correspondiente (Figura 15).
- Del resultado obtenido, si se observan bandas (producto amplificado) se procede a realizar el PCR para la detección de la bacteria.

En caso que no se observen las bandas, indica que el ADN presenta algún inhibidor y será necesario hacer diluciones de este en una proporción de 1:25. Será necesario volver a realizar la PCR 16s, sí al final se observan las amplificaciones se utilizan las diluciones para realizar la PCR de *Cms*.

RT-PCR en punto final para *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

- Descongelar sobre hielo los reactivos de PCR (buffers, MgCl₂, dNTPs, primers) y realizar los cálculos con los siguientes reactivos para obtener las concentraciones finales indicadas.

Cuadro 5. Concentraciones de reactivos para la PCR de *Cms*

| Reactivo | Concentración inicial | Concentración final | Volumen 1 tubo |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------|
| Buffer de PCR | 10 X | 1X | 5 µL |
| MgCl ₂ | 25 mM | 1.5 mM | 1.25 µL |
| dNTP's | 10 mM | 250 mM | 0.625 µl |
| Cms 6 | 10 picomoles/µl | 20 picomoles | 2 µl |
| Cms 7 | 10 picomoles µl | 20 picomoles | 2 µl |
| Taq DNA polimerasa | 5 U/µl | 2.5 U/µl | 0.5 µL |
| DNA | | | 5 |
| Agua libre de RNAasa y DNAasa | | | 33 µL |
| Volumen final | | | 50 µL |

- Primers específicos usados, amplificando un producto de 258 pb, cuyas secuencias son:

Tabla 6. Secuencias de los primers empleados para la amplificación de *Cms*

| Nombre del primer | Secuencia | Fragmento pb |
|-------------------|--------------------------|--------------|
| Cms 6 | 5'CGCTCTCCCTCACCAGACTC3' | 258 |
| Cms 7 | 5'TCCCGTGCTTGCCTGCGTTG3' | |

- Realizar la mezcla de reacción sobre hielo y finalmente adicionar la enzima DNA Taq polimerasa (siempre almacenada a - 20°C) como se indica en el cuadro. Alicuotar la mezcla de reacción en tubos de microcentrifuga de 500 o 250 µl los cuales previamente deben ser etiquetados con la clave de la muestra.
- Colocar la cantidad requerida del ácido nucleico por tubo, el cual fue previamente diluido y los controles de la reacción (positivo y negativo). Dar un pulso de centrifuga y colocar los tubos en el termociclador previamente programado con el programa específico:

Cuadro 5. Programa de temperaturas para la PCR de *Cms*

| Temperatura | Tiempo | Ciclos | PCR |
|-------------|--------|--------|------------|
| 95 °C | 5 min. | 1 | |
| 95 °C | 1 min. | | |
| 60 °C | 1 min. | 35 | |
| 72 °C | 1 min. | | |
| 72 °C | 4 min. | 1 | |

Verificación de los fragmentos amplificados por PCR mediante electroforesis

- Transcurrido el tiempo de termociclaje; de los tubos de reacción tomar 10 μ l, mezclarlos con Loading buffer 1X y cargar la mezcla en un gel de agarosa al 2% el cual debe estar sumergido en buffer TBE o TAE 1X. Correr la electroforesis a \pm 80 voltios por 10 minutos y \pm 100 voltios por 20 minutos. Como referencia utilizar un marcador de peso molecular de 100 o 50 pb. Observar en transluminador de luz ultravioleta y si es necesario tomar la fotografía en el analizador de imágenes.
- Tomar los resultados en base a la presencia o ausencia de un fragmento del peso molecular indicado por el autor que diseñó los primers. En éste caso se debe observar un producto de 258 pares de bases (Figura 16). Si el control positivo no amplificara o el control negativo amplificara un fragmento, es necesario volver a correr la reacción.

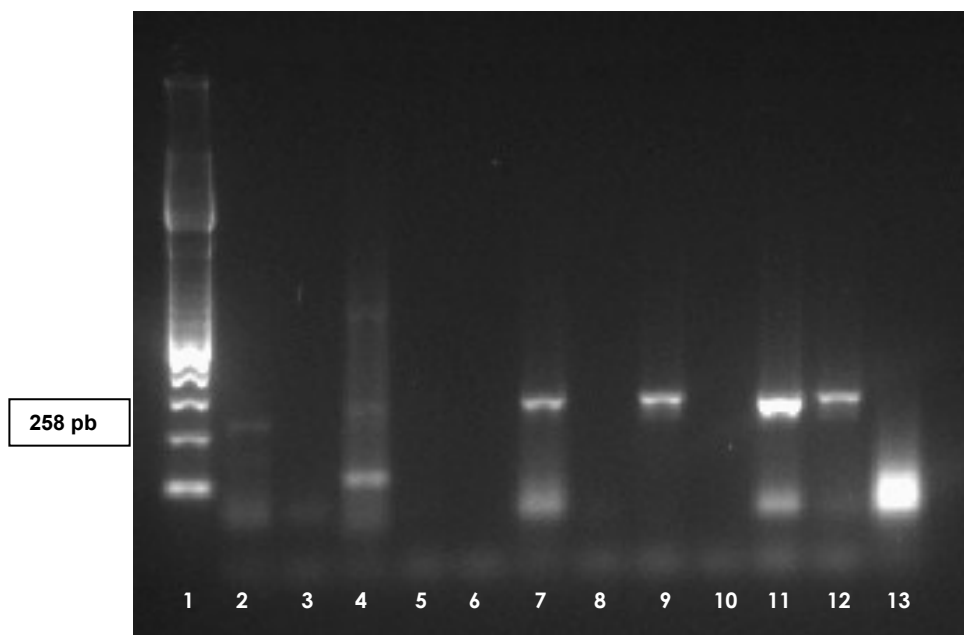


Fig. 16 Amplificación Fragmento amplificado. Carril 1, Marcador molecular 100pb. Carril 2, 4, 7, 9, 11 y 12 controles positivos de Cms 258 pb. Carril 3 control negativo agua PCR. Carril 5 y 6 Tejido vegetal sano.

Fuente: Laboratorio de Bacteriología/CNRF

Preparación de soluciones de PCR

Preparación 100 ml de una solución etanol 70%.

- Medir 70 ml de etanol grado biología molecular en probeta de 100 ml.
- Vaciar la solución en matraz aforado de 100 ml y aforar hasta la marca con agua destilada estéril.
- Guardar la solución en frasco para reactivo debidamente etiquetada, almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de 30 ml de una solución de agarosa al 1%.

- Pesar 0.3 g de agarosa en el vaso de precipitados de 100ml.
- Adicionar 30 ml de Buffer TAE 1X. Cubre la "boca" del vaso.
- Disolver la agarosa por calentamiento ya sea en una termoplancha, en baño María, en horno de microondas, o en autoclave.
- Asegurarse de que las partículas de agarosa estén completamente disueltas antes de continuar.
- Dejar que la solución de agarosa se enfríe aproximadamente a 50 o 60°C.

Si se desea correr la electroforesis con bromuro de etidio en el gel, adicionar el colorante a una concentración final de 5mg/ml en este tiempo.

El bromuro de etidio es un poderoso agente mutagénico y debe ser manipulado con cuidado. Siempre usar guantes impermeables cuando se manipulen los geles o soluciones conteniendo este colorante

Preparación de una solución de Cloruro de Sodio 0.5 M.

- Pesar 2.922 de Cloruro de Sodio (NaCl) en un vaso de precipitados de 100ml.
- Disolver en 50 ml de agua destilada.
- Vaciar la solución en matraz aforado de 100 ml y aforar hasta la marca.
- Vaciar la solución en un frasco para reactivo debidamente etiquetada.
- Esterilizar la solución en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (PSI). Almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de 1000 ml de una solución buffer TAE 10 X.

- Pesar 48 g de EDTA.
- Disolver en 500 ml de agua destilada estéril
- Medir 11.42 ml de ácido acético glacial en probeta de 100 ml.
- Adicionar y disolver con agitador magnético en termoagitador.
- Medir 50ml de 0.5 M de EDTA (pH. 8.0) en probeta de 100 ml.
- Adicionar y disolver con agitador magnético en termoagitador.
- Vaciar la solución en matraz aforado de 1000 ml y aforar hasta la marca con agua destilada estéril.
- Guardar la solución en frasco para reactivo debidamente etiquetada, almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de 1000 ml de una solución buffer TBE 10 X.

- Pesar 108 g de de EDTA,
- Disolver en 500 ml de agua destilada estéril.
- Medir 55.18 ml de ácido bórico en probeta de 100 ml.
- Adicionar y disolver con agitadores magnéticos en termoagitador.
- Medir 400ml de 0.5 M de EDTA (pH. 8.0) en probeta de 100 ml.
- Adicionar y disolver con agitadores magnéticos en termoagitador.
- Vaciar la solución en matraz aforado de 1000 ml y aforar hasta la marca con agua destilada estéril.
- Guardar la solución en frasco para reactivo debidamente etiquetada.

Preparación de 1000 ml de una solución buffer TAE o TBE 1x a partir de una 10x.

- Medir 100 ml Buffer TAE o TBE 10xr en probeta de 100 ml.
- Vaciar la solución en matraz aforado de 1000 ml y aforar hasta la marca con agua destilada estéril.
- Guardar la solución en frasco para reactivo debidamente etiquetada. Almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de 1ml de una solución "azul" de corrida 6X.

- Pesar 75 mg de Azul de bromofenol en balanza analítica.
- Disolver en 500 μ l de agua destilada estéril en tubo de centrifuga de 1.5 a 2.0 ml
- Pesar 75 mg de Xilene cyanol en balanza analítica.
- Adicionar y disolver en vortex.
- Medir 180 μ l de glicerol con la ayuda de micropipeta de 1000 ml.
- Adicionar e integrar en vortex.
- Completar el volumen final con la adición de 170 μ l de agua destilada estéril.
- Guardar la solución en refrigeración.
- Evitar que la solución este expuesta a la luz.

Preparación 1ml de una solución "naranja" de corrida 6X.

- Pesar 75 mg de naranja G en balanza analítica.
- Disolver en 500 μ l de agua destilada estéril en tubo de centrifuga de 1.5 a 2.0 ml
- Adicionar y disolver en vortex.
- Medir 180 μ L de glicerol con la ayuda de micropipeta de 1000 ml.
- Adicionar y e integrar en vortex
- Completar el volumen final con la adición de 245 μ l de agua destilada estéril.
- Guardar la solución en refrigeración
- Evitar que la solución este expuesta a la luz o para reactivo debidamente etiquetada.

Preparación una solución buffer de PCR 1x a partir de una 10x para un volumen final de 50 μ l.

- Descongelar el buffer de PCR 10x en hielo
- Medir 5 μ L de Buffer PCR 10xr con micropipeta de 2-10 μ l.
- Adicionar al tubo de la mezcla de reacción la cual tendrá un volumen final de 50 μ l por cada una de las muestras a probar.
- Mantener la solución en el tubo de centrifuga de 1.5 a 2.0 ml debidamente etiquetado en hielo hasta la adición de los otros reactivos.

Preparación de una solución MgCl₂ 1.5 mM a partir de una 25 mM en un volumen final de 50 μ l.

- Descongelar el MgCl₂, 50 mM en hielo.
- Medir 1.5 μ L MgCl₂, μ l mM con micropipeta de 2-10 μ l.
- Adicionar al tubo de la mezcla de reacción, la cual tendrá un volumen final de 50 μ l por cada una de las muestras a probar.
- Mantener la solución en el tubo de centrifuga de 1.5 a 2.0 ml debidamente etiquetado en hielo hasta la adición de los otros reactivos.

Preparación una solución de dNTP's a 200 μ M a partir de una a 10 mM en un volumen final de 50 μ l.

- Descongelar los dNTP's 10 mM en hielo.
- Medir 1 μ L de los dNTP's 10 mM con micropipeta de 0.5-10 μ l.
- Adicionar al tubo de la mezcla de reacción la cual tendrá un volumen final de 50 μ l por cada una de las muestras a probar.
- Mantener la solución en el tubo de centrifuga de 1.5 a 2.0 ml debidamente etiquetado en hielo hasta la adición de los otros reactivos.
- **Medir la cantidad de *Taq* DNA polimerasa (1U/ μ l) a adicionar, a una concentración final de 2.5 U/ μ l en un volumen final de 50 μ l.**
- Medir 0.5 μ l de *Taq* DNA polimerasa (2.5U/ μ l) con micropipeta de 0.5-10 μ l.
- Adicionar al tubo de la mezcla de reacción la cual tendrá un volumen final de 50 μ l por cada una de las muestras a probar.
- Mantener la solución en el tubo de centrifuga de 1.5 a 2.0 ml debidamente etiquetado en hielo
- Adicionar 33 μ l de agua libre de nucleasas para completar a 45 μ l.

5.- Destrucción de la muestra

Concluido el diagnóstico, la muestra se esteriliza en autoclave antes de ser desechada, en caso de que el diagnóstico resulte Positivo. En caso contrario, la muestras únicamente se almacenaran a 4°C para ser desechadas posteriormente.

VII. REFERENCIAS

- Cruz, F. M. y Frías, T. G.** 1997. Guía Ilustrada de la prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. Subsecretaría de Agricultura y Ganadería - CONASAG
- Chomzysnsky, P.** (1997) DNAzol. A reagent for rapid isolation of genomic DNA. *Biotechnics* 22:550-553.
- De la Cruz, et al**,1992. A semiselective agar médium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* from potato tissues. *Plant Dis.* 76: 725-729.
- Fahy, P., Persley, G.** 1983. *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide.* Academic Press. Sponsored. Australasian Plant Pathology Society.
- Hu X, et al** 1995. Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* By competitive Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* 85(12) : 1468-1473
- Kado, I.C.** 2010. *Plant Bacteriology.* The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- 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.
- Nissinen, R., et al.** 1997. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* elicits a hypersensitive response in tobacco and secretes hypersensitive response –inducing protein(s). *Phytopathology* 87: 678-684.
- 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.

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

Citar:

Dirección General de Sanidad Vegetal - Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF). 2012. PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (van der Wolf et al.,2005). Estandarizado en proceso de revisión. SAGARPA -SENASICA.