

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario

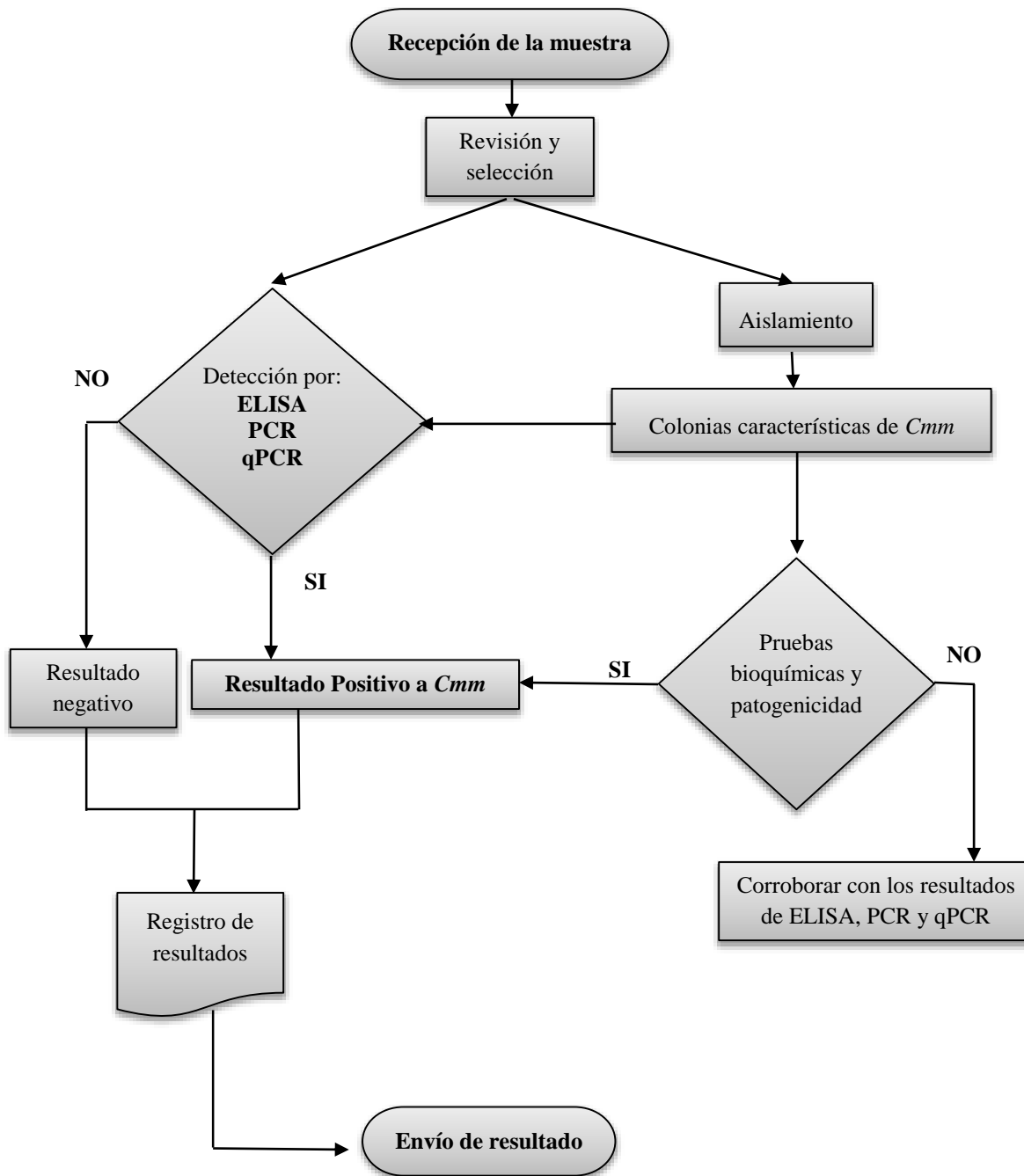
Laboratorio de Bacteriología

Protocolo de Diagnóstico:

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* corrig. (Smith 1910) Davis
et al. 1984, comb. nov.
(Cancro del tomate)

Tecámac, Estado de México, marzo 2019

2.3 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

La detección de la bacteria puede realizarse a partir de plantas infectadas sintomáticas, asintomáticas y en semillas. 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 o mediante la técnica serológica de ELISA y la PCR (Figura 7). El aislamiento de la bacteria debe concluir en cultivo puro y posteriormente corroborar la cepa aislada con ELISA, PCR y pruebas de patogenicidad en tabaco (*Nicotiana tabacum*), maravilla (*Mirabilis jalapa*) y/o plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.).

Para la emisión de un resultado positivo será indispensable contar con el aislamiento de la bacteria del material vegetal, especialmente cuando se trate de semillas. No podrán emitirse resultados positivos sin contar con la cepa bacteriana.

Se deben coleccionar y enviar 20 hojas o 10 plantas con síntomas de la enfermedad, envolverlas cuidadosamente en toallas de papel secante e introducirlas en bolsas de plástico con cierre hermético. Anotar sobre la bolsa el número de identificación de la muestra (cuidar que los datos no se borren) y enviarla en hielera con geles refrigerantes a fin de evitar la oxidación de las hojas. El envío debe realizarse el mismo día de la colecta, de no ser posible, las muestras se tienen que resguardar a 4°C y enviar al día siguiente. En caso de trabajar con semillas se recomienda trabajar con 10 000 para poder tener una probabilidad de 95% de detección (EPPO, 2016), caso contrario se recomienda trabajar con 400 semillas como mínimo.

El material vegetal recibido en el laboratorio debe ser inspeccionado para admitir o no su recepción y comenzar con el proceso de diagnóstico. El tejido debe estar en buen estado, fresco y sin oxidación excesiva o fenolizado; tampoco debe tener crecimiento de organismos saprofitos (hongos) debido al mal almacenamiento o excesivo tiempo de envío.

El tejido vegetal con síntomas, debe ser seleccionado y separado en 3 porciones para realizar las diferentes técnicas de detección mencionadas más adelante. La muestra original debe almacenarse a 4°C hasta la emisión de los resultados. En caso de recibir semillas, éstas se mantienen a temperatura ambiente (23 - 25°C) y también deben ser divididas en tres partes: una porción dirigida para el aislamiento, otra para la técnica de ELISA y la porción restante para la técnica de PCR. Si la cantidad de semilla lo permite, es recomendable inducir la germinación en cámara húmeda. El germinado resultante se usa para realizar el diagnóstico mediante ELISA y PCR.

3.1 Aislamiento a partir de tejido vegetal

La obtención de cultivos puros de *Cmm*, aunque requiere de varios días, permite la verificación de patogenicidad; además de que es la prueba definitiva para confirmar la

presencia, viabilidad y subespecie de la bacteria. Para el aislamiento es importante la selección del tejido vegetal, *Cmm* tiende a acumularse en partes específicas de la planta, los haces vasculares y los pecíolos de las hojas que muestran síntomas avanzados, son tejidos con altas concentraciones bacterianas, por lo que estos se consideran muestras de calidad para realizar los aislamientos.

Cuando se tiene la planta marchita completa, se separan sus hojas del tallo, éste se corta en trozos de aproximadamente 2.5 cm y se lava con agua corriente, se seca y se asperja con alcohol al 70%. En la cámara de transferencia y utilizando un bisturí estéril, se separa la epidermis del tallo en busca de haces vasculares de color amarillo o necrosados (Figura 4) a la altura de los nudos, en esa región se realizan un corte longitudinal al tallo y diferentes cortes transversales sobre los haces vasculares, secciones de 0.5 cm de profundidad y 1 cm de separación. Posteriormente se separan estos cortes y asépticamente se transfieren a un pequeño volumen de agua destilada estéril, se deja reposar durante 10 minutos, mediante un asa flameada previamente, se toma una muestra de la suspensión y se siembra por estría cruzada en agar nutritivo (Anexo) o medios semiselectivos (NBY, SCM, TGA) y selectivos (mSCM, D2ANX); también porciones similares de material vegetal infectado se deben procesar en forma directa por ELISA o PCR.



Figura 1. Haces vasculares necrosados en planta de tomate
(CNRF, Laboratorio de Bacterias).

En el caso de contar con hojas, pecíolos y frutos; con un bisturí estéril realizar cortes finos en la zona de avance de las lesiones y desinfectar con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, posteriormente enjuagar tres veces con agua destilada estéril; el material vegetal se corta en porciones más pequeñas y se transfiere a un tubo de ensayo con agua destilada

estéril, se deja incubar por 10 o 15 minutos hasta que se forme una suspensión bacteriana. Posteriormente con un asa bacteriológica estéril se siembra por estría cruzada en los medios de cultivo. Las cajas de Petri con las siembras se incuban a 26 o 28 °C y se revisan después de 48 horas.

3.2 Aislamiento a partir de semilla

Colocar 12 gramos de semilla en un matraz que contenga 100 mL de buffer de fosfatos (0.05 M, pH 7.5, Na₂HPO₄ + KH₂PO₄ + 0.02% Tween) estéril e incubar las semillas por 3 horas a 4 °C. Posteriormente agitar la muestra a temperatura ambiente durante una hora.

En una caja Petri con medio de cultivo colocar 100 µL del buffer y con la ayuda de un triángulo de vidrio dispersar la solución en todo el medio de cultivo, para este caso se puede utilizar cualquier medio de aislamiento (PDA, B de King, AN) o bien medios selectivos como es el caso del medio SCM. Las cajas Petri con la bacteria sembrada se dejan incubar por 48 horas a 72 horas a 28 °C. Una vez transcurrido este tiempo, seleccionar colonias con morfología parecida a las bacterias del género *Clavibacter* (Figura 5 c y d).

En agar nutritivo glucosa (ANG), las colonias de *Cmm* crecen en un periodo de 5 a 8 días de incubación, presentando tamaños de 1 a 3 mm, son lisas, enteras, convexas, semifluidas, pero se vuelven butirosas con subcultivos prolongados; cuando las cepas son virulentas su coloración es amarillo pálido a naranja claro, conforme pierden su virulencia se tornan naranja y opacas (Rodríguez, 2006). Después de 5 a 7 días de incubación en el medio D2ANX se presentan colonias de color amarillo, convexas y de consistencia mucoide. En el medio SCM las colonias crecen después de 7 a 10 días de incubación; son de consistencia mucoide, color beige y de forma irregular, además las colonias presentan manchas internas de color amarillo a naranja (Figura 5).

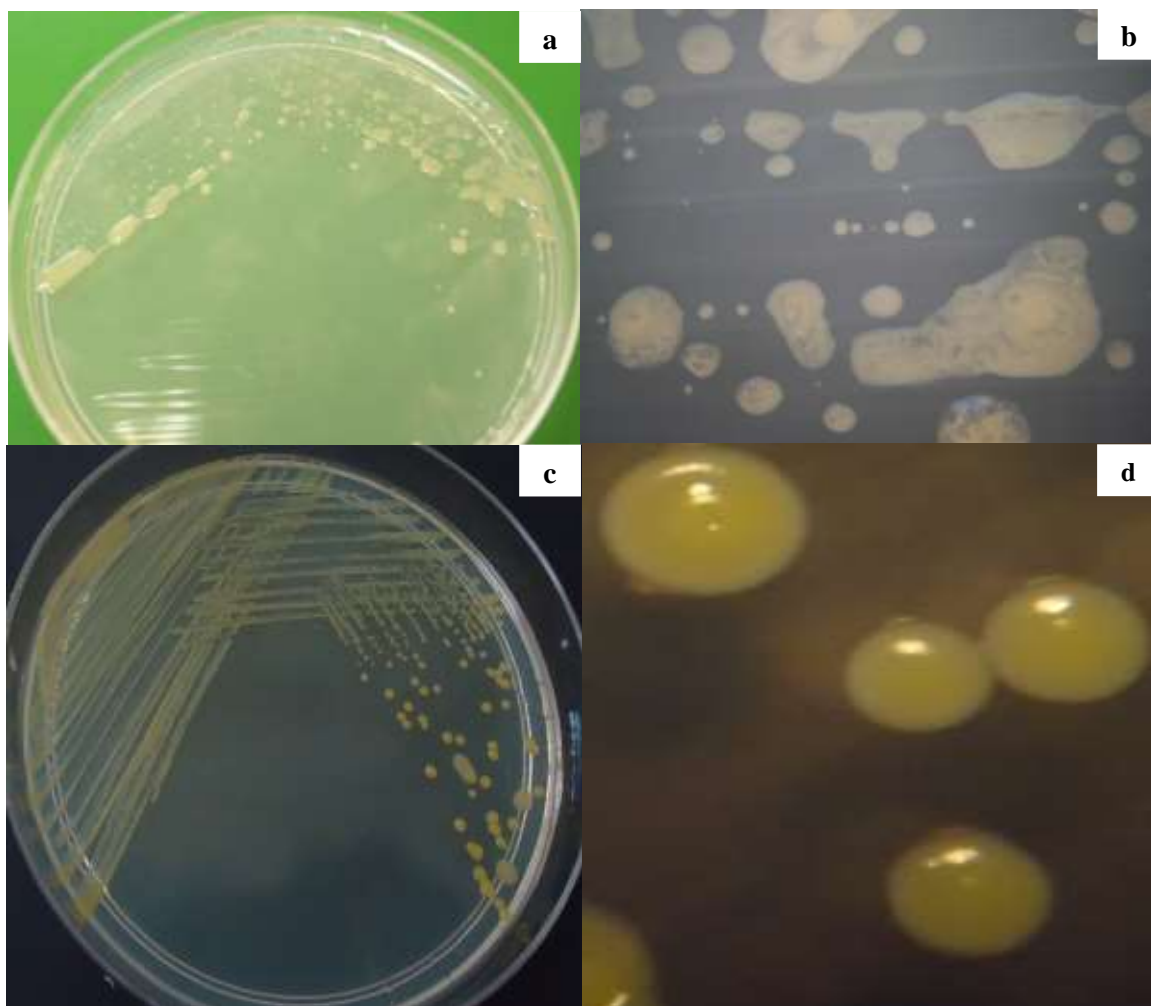


Figura 2. Colonias de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. a y b) *Cmm* en medio SCM, c y d) *Cmm* en medio BK. (CNRF, laboratorio de bacteriología).

Las colonias puras se deben procesar por pruebas bioquímicas, conforme a los cuadros de identificación de especie y subespecie de este género (Cuadro 1) así como por las técnicas de ELISA y PCR para emitir el diagnóstico.

3.3 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 después de

24 horas de la inoculación. En este caso *Cmm* también provoca hipersensibilidad en plantas de maravilla.

Las cepas obtenidas se purifican para realizar las pruebas de patogenicidad, inoculando en plantas de tabaco y maravilla (Figura 6).

- 1) 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 1×10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). Inocular por inyección en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y maravilla (*Mirabilis jalapa*). Las plantas inoculadas se mantienen a temperatura ambiente, es decir de 20 a 30 °C, nunca a una temperatura mayor de 35 °C.
- 2) Si dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación, la zona infiltrada presenta perdida de turgencia o necrosis, la prueba se considera positiva.
- 3) La mayoría de los fitopatógenos secretan enzimas al estar en contacto con algún sustrato, algunos secretan enzimas pectinolíticas que provocan el ablandamiento y la desintegración de las sustancias de la pared celular y además permiten que el patógeno, al penetrar y propagarse en los tejidos, ocasione el colapso y la desintegración de su estructura celular.



Figura 3. Reacción de hipersensibilidad en planta de maravilla (*Mirabilis jalapa*). (CNRF, Laboratorio de bacterias).

3.4 Pruebas bioquímicas diferenciales de caracterización

Para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de *Cmm*, 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.

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

Prueba	Resultado
Tinción de Gram y/o Reacción de KOH	Gram positiva (+) / KOH (-)
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	+
Reacción de hipersensibilidad en maravilla	+
Pudrición de papa	-
Reacción de O/F	+/-
Crecimiento a 37 °C**	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
H ₂ S de peptona**	+
Hidrólisis de almidón**	-
Hidrólisis de Esculina*	+
Hidrólisis de Caseína*	-
Hidrólisis de gelatina**	-
Producción de Indol	-
Producción de ácido a partir de:	
Manosa**	+
Manitol**	-
Ribosa*	-
Sorbitol*	-
Tolerancia de NaCl al 6%	+

* Schaad *et al.*, 2001

** Rodriguez, 2006

3.5 Detección mediante la técnica de ELISA

Para esta técnica se utiliza el kit comercial de la marca Agdia con número de catálogo SRA 52000® y se siguen las instrucciones del fabricante.

3.5.1 Interpretación de resultados de ELISA

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 (Cruz y Frías, 1997).

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 (Cruz y Frías, 1997).

3.6 Técnicas moleculares

3.6.1 Extracción de DNA total con el método CTAB 2%

- 1) Revisar la muestra para localizar el daño en cualquiera de los órganos disponibles de la planta. Seleccionar los haces vasculares, cortar y pesar en balanza analítica de 300 a 500 mg de tejido. Si no se observa la zona de avance, tomar los tejidos que pudieran contener una infección latente.
- 2) Colocar el tejido vegetal en un mortero estéril y macerar con nitrógeno líquido hasta obtener una consistencia de polvo. En caso de no contar con nitrógeno, la muestra puede ser congelada a ultrabaja temperatura (-80 °C) y posteriormente macerarse. Para el caso de semillas, primero deben ser lavadas con agua destilada estéril para quitar el exceso de agroquímicos, una vez lavadas, colocarlas en papel secante para quitar el exceso de agua. Cuando las semillas estén perfectamente secas, triturarlas o macerarlas hasta obtener un polvo fino.
- 3) Depositar el polvo en un tubo estéril de 2 mL y agregar 1.5 mL de buffer CTAB 2% previamente calentado a 80°C, también adicionar 100 µL de SDS 10% y homogenizar perfectamente. Incubar los tubos con las muestras a 80°C durante 15 minutos en baño María.
- 4) Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente por 3 a 5 minutos y centrifugar 15 minutos a 13 000 g. Transferir 1 mL del sobrenadante a otro tubo estéril de 2 mL y agregar 500

μL de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), mezclar por inversión para homogenizar la muestra (este paso puede realizarse dos veces).

- 5) Centrifugar a 13 000 g por 15 minutos y transferir de 500 a 700 μL del sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 mL.
- 6) Agregar $\frac{1}{2}$ volumen de etanol: metanol: ácido acético glacial (9:3:1), mezclar por inversión y (es posible dejar toda la noche a 4°C o bien 60 min a -20 °C) centrifugar a 13 000 g por 10 minutos.
- 7) Decantar el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla y lavarla con 500 μL de etanol: agua: metanol: acetato de sodio 3M (30:9:5:1). Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos.
- 8) Decantar el sobrenadante, sin perder la pastilla y lavarla con 500 μL de etanol al 70 %. Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos.
- 9) Dejar secar la pastilla y resuspender en 50-100 μL de agua libre de nucleasas.

3.6.2 Extracción de DNA con kit PlantDNAzol®

La extracción de DNA también puede realizarse con el kit comercial PlantDNAzol™ Reagent (Invitrogen®, catalogo 10978021) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota: se puede emplear algún otro protocolo de extracción de DNA, siempre y cuando el DNA extraído cumpla con los parámetros de calidad e integridad.

3.6.3 Verificación de la calidad del DNA mediante espectrofotometría

El DNA tiene una absorbancia máxima de 260 nm, mientras que las proteínas, las cuales son las impurezas más comunes en el DNA, tienen una absorbancia máxima de 280 nm. Es por ello que esas dos longitudes de onda son utilizadas para verificar la pureza del DNA. Si la relación 260/280 está entre 1.7 y 2.0, la muestra de DNA se considera pura. Una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas.

- 1) Analizar la calidad y cantidad de DNA extraído en el espectrofotómetro.
- 2) Realizar las diluciones correspondientes llevando la concentración del DNA de 20-30 ng/ μL y verificar que la calidad se encuentre entre 1.7 y 2.0 de absorbancia.
- 3) En caso de que la muestra no se encuentre en el rango óptimo de pureza, se recomienda realizar una nueva extracción de DNA o comprobar mediante amplificación del gen endógeno que el DNA es amplificable.

3.6.4 Verificación de la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa

- 1) Preparar un gel de agarosa al 1.5% y cargar en cada uno de los pozos, 5 μ L de DNA mezclado con 3 μ L de buffer de corrida (naranja G 6X) previamente teñido con el colorante GelRed™.
- 2) Si no se cuenta con GelRed™, el gel debe ser teñido con bromuro de etidio, añadiendo 0.5 μ L por cada 100 mL de buffer TAE 1X. El manejo de este reactivo debe ser muy cuidadoso, para lo cual, se debe destinar un área del laboratorio específica y así evitar contaminaciones con este reactivo.
- 3) Correr la electroforesis a 95 volts durante 30 minutos.
- 4) Finalmente observar el gel bajo luz UV(ultravioleta).
- 4) Si se observan bandas bien definidas, sin impurezas y sin degradación puede procederse a realizar la reacción de la PCR; de lo contrario se recomienda hacer una nueva extracción de DNA o comprobar mediante amplificación del gen endógeno que el DNA es amplificable.

3.6.5 PCR punto final para la detección de *Cmm*

Los primers propuestos para la detección de esta bacteria son CMM-5 y CMM-6 (Dreier *et al.*, 1995). A continuación se muestra la secuencia de los primers específicos empleados los cuales amplifican un producto de 614 pb (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de los Primers empleados para la detección de *Cmm* propuestos por Dreier *et al.*, 1995.

Tipo	Nombre de los primers	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	CMM- 5	GCGAATAAGCCCATATCAA	614
Antisentido	CMM-6	CGTCAGGAGGTCGCTAATA	

- 1) Descongelar sobre hielo los reactivos y calcular las cantidades necesarias para cada reacción, de acuerdo al cuadro 3.

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

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
Mezcla de dNTP's	10 mM	200 μM	0.5
Primer F	10 μM (10 pmol)	0.4 μM	1
Primer R	10 μM (10 pmol)	0.4 μM	1
Taq DNA polimerasa	5 U/ μL	0.06 U/ μL	0.3
DNA	20 ng/ μL	100 ng	5
Agua grado PCR	-----	-----	13.95
Volumen final			25

- 2) Después de haberse descongelado los reactivos, preparar la mezcla (mix) de PCR, sobre hielo y en la campana de PCR. Alícuotar 20 μL de la mezcla de reactivos en tubos de 0.2 mL estériles y posteriormente adicionar 5 μL de DNA de cada muestra, así como los controles positivos y negativos de la reacción, finalmente etiquetar cada tubo.
- 3) Colocar las muestras en el termociclador, utilizando el programa correspondiente (cuadro 4):

Cuadro 4. Programa del termociclador para los primers CMM-5 y CMM-6.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
94	5:00	1
94	0:30	35
57	0:30	
72	0:45	
72	5:00	1

Nota: La estandarización se realizó en un equipo BIO-RAD modelo T100 Thermal Cycler.

- 4) Al concluir el programa, tomar 7 μL del producto de PCR y mezclarlo con 3 μL de buffer de corrida (naranja G 6X).

Nota: El buffer de corrida debe ser teñido previamente con GelRed™, adicionando 10µL del colorante a 2mL de buffer de corrida (naranja G 6X), mezclar perfectamente para su utilización. Almacenar a 4°C.

- 5) Depositar el producto de PCR en los pozos de un gel de agarosa al 1 o 1.5%.
- 6) Correr la electroforesis a 95 volts durante 60 minutos. Finalmente observar el gel en un transiluminador de luz UV y tomar la fotografía, anotar los datos de la muestra y guardar la imagen.

3.6.6 PCR tiempo real para la detección de *Cmm*

La qPCR (quantitative polymerase chain reaction) es una variante de la PCR empleada para amplificar y cuantificar simultáneamente de forma absoluta el producto de la amplificación del DNA, cuantifica la fluorescencia de una molécula reportera (sonda), la cual es medida a lo largo del tiempo de reacción.

- 1) Descongelar los reactivos que se enlistan y preparar la mezcla de reacción con las cantidades indicadas en el cuadro 5, empleando los primers y sonda correspondientes (cuadro 6).
- 2) Programar el termociclador de acuerdo al cuadro 7.

Cuadro 5. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tiempo real.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer de PCR	10X	1X	2.2
MgCl ₂	50 mM	4 mM	1.76
Mezcla de dNTP's	10 mM	0.30 µM	0.6
Iniciador F	10 pmol/ µL	0.30 µM	0.6
Iniciador R	10 pmol/ µL	0.30 µM	0.6
Taq DNA polimerasa	5 U/µL	0.09 U/µL	0.4
Sonda	10 pmol/ µL	0.09 µM	0.2
DNA	20 ng/µL	80 ng/ µL	4
Agua grado PCR			11.64
		Volumen final	22

Cuadro 6. Primers RZ_ptssk 10/ RZ_ptssk 11 para PCR tiempo real propuestos por Oosterhof & Berendsen, 2011.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	
Sentido	RZ_ptssk 10	5'-GGGGCCGAAGGTGCTGGTG-3'	
Antisentido	RZ_ptssk 11	5'-CGTCGCCCCGCCGCTG-3'	
Sonda	RZ_ptssk 12	6-FAM-TGGTCGTCCTCGGCG-IBFQ	sonda Taqman

Nota: Utilizar tubos o placas ópticas para qPCR de acuerdo al tipo/marca de termociclador utilizado. Las condiciones de este ensayo se estandarizaron en el termociclador marca Bio-Rad CFX-96 real-time thermocycler (Bio-rad Laboratories1).

Cuadro 7. Programa de termociclaje para los primers RZ_ptssk 10/ RZ_ptssk 11.

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
95	10:00	1
95	0:15	40
60	0:30	

3.6.7 Controles para las pruebas moleculares

Se deben incluir controles que permitan disminuir la incertidumbre de los resultados. Los controles corresponden a:

Control positivo: asegura la funcionalidad de los reactivos de PCR. Contiene DNA o clona de la plaga de interés y debe estar confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de matriz: este control corresponde a un extracto de planta/semilla sin la plaga. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin DNA molde o clona. Descarta falsos positivos.

3.6.8 Interpretación de resultados de PCR punto final

Primers CMM-5 y CMM-6 propuestos por Dreier *et al.*, 1995.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X, a 95 Volts por 60 minutos (Figura 7).

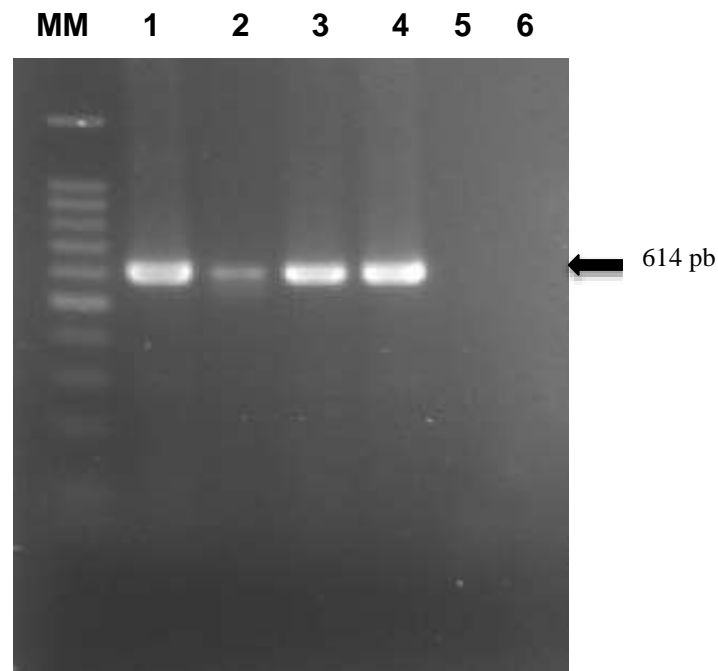


Figura 4. Electroforesis de los productos de PCR con los primers CMM-5 y CMM6. MM: Marcador Molecular 1 Kb. 1: control positivo; 2-4: muestras vegetales; 5-6: controles negativos.

3.6.9 Interpretación de resultados de PCR tiempo real

Primers RZ_ptssk 10/ RZ_ptssk 11 propuestos por Oosterhof y Berendsen, 2011.

El análisis y cuantificación de los datos se realiza en la fase exponencial de la reacción

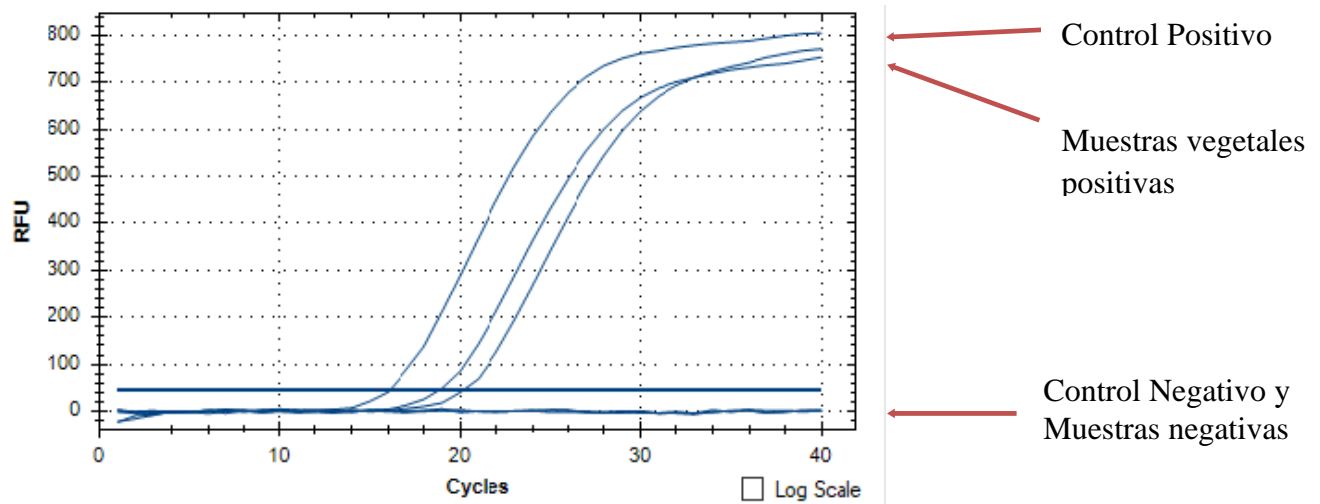


Figura 5. Curva de cuantificación para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por PCR tiempo real.

Resultado negativo: Muestras con valores de FAM Cq=0.00 o >35.00

Resultado positivo: Muestras con valores de FAM Cq <35.00

Muestras con valores de FAM Cq en el rango de 32.0 a 35 necesitaran confirmación, mediante una segunda corrida.

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo y las muestras positivas generan una curva de amplificación con los primers RZ_ptssk 10/ RZ_ptssk 11 específicos a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, así como se presenta en la figura 8.

El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben de generar una curva de amplificación con los primers específicos.

3.7 Identificación de plaga

El requisito mínimo de identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, es que al menos dos pruebas deben ser positivas, con sus controles correspondientes. En caso de controversia es recomendable enviar a secuenciar los productos amplificados y comparar la secuencia en la base de datos en BLAST del NCBI.

4. REGISTROS

Tener registros y evidencias de todo el proceso que implique el diagnóstico de la plaga conforme al Manual del Sistema de Gestión de Calidad.

- 1) La muestra de planta debe ser resguardada a 4°C hasta que el proceso de diagnóstico finalice.

- 2) Las semillas se conservan a temperatura ambiente (20 a 25°C).
- 3) El DNA obtenido de material vegetal y cepas bacterianas debe ser almacenado a -20°C o bien a -80°C, debidamente identificado.
- 4) Las cepas bacterianas deberán ser conservadas en una mezcla de caldo nutritivo con glicerol (1 parte de caldo nutritivo por 2 partes de glicerol) a -80°C.

Una vez finalizado el diagnóstico, el tejido vegetal junto con las cepas bacterianas que no se utilizaron, deben ser inactivados en autoclave a 121°C y 15 lb durante 40 minutos.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.bacteriologia@senasica.gob.mx,

Teléfono: 01 (55) 59 05 1000 Ext. 51314 y 51333.

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Bacteriología (Ana Abigail Vega Aragón, Andrés Aguilar Granados, Bárbara Hernández Macías, Lidia Guadarrama Valencia y Sandra Lourdes Moya Hernández), revisado por el Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández) y editado por el Grupo DiaFi.

7. REFERENCIAS

- Grogan, R. G. y Kendrick, J. B. (1953). Seed transmission, mode of overwintering and spread of bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense* (Abstr.) Phytopathology 43:473.
- 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.
- Dreier, J., Bermpohl, A. y Eichenlaub R (1995) Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 85:462–468.
- EPPO. (2016). PM 7/42(3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Bulletin OEPP/EPPO. 46(2):202–225.
- Hazzard, R., y Wick, R., (2012). Managing bacterial canker in tomato: key strategies. Disponible en: <http://ipm.uconn.edu/documents/raw2/Managing%20Bacterial%20Canker%20in%20Tomato/Managing%20Bacterial%20Canker%20in%20Tomato.php?display=print>. Consultado el Marzo 2019.

- Olguín P. R. J. y Vázquez J. R. (2005). Bacterial Canker Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease*. Vol. 90(12):1550.
- Ozdemir Zahide. (2005). Development of a multiplex PCR assay for concurrent detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Plant Pathology Journal* 4 (2) nm133-137.
- Ramírez V. J. y Sáinz R. R.A. (2010). Manejo Integrado de la Enfermedades del Tomate. Agrobiológica, S.A. de C.V. 162 p.
- Rodríguez M. M .L. (2010). Enfermedades Bacterianas en Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México.
- Ryu, E. 1940. A simple method of differentiating between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 17:58-36.
- Schaad N, W, Jones, J. B. y Chun W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, Third edition. APS Press. 373 p.
- Whitman, W. B. (ed.). 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & sons, Inc. ISBN: 9781118960608 DOI: 10,1002/9781118960608.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* corrig. (Smith 1910) Davis et al. 1984, comb. nov. (Cancro del tomate) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXO

8.1 Medios de cultivo

Nota: en todos los medios la cantidad de los reactivos está calculada para 1L.

Medio B de King

Reactivo	Cantidad
Proteosa de Peptona	20.0 g
Glicerol	15.0 ml
Fosfato de Potasio dibásico	1.5 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	1.5 g
Agar	15.0 g

Disolver todos los ingredientes en el agua y cocinar hasta que el medio hierva. Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Agar nutritivo Glucosa (ANG)

Reactivo	Cantidad
Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	15.0 g

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)

Reactivo	Cantidad
Caldo Nutritivo	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

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 45 - 50°C adicionar las soluciones anteriores y vaciar en cajas. Estas soluciones también se pueden esterilizar por medio de filtración Millipore.

Medio TGA (Tryptona-glucosa-agar)

Reactivo	Cantidad
Extracto de carne	3.0 g
Tryptona	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g

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

Medio CMS (SCM)

Reactivo	Cantidad
Sacarosa	10.0g
Extracto de levadura	0.1 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.25 g
Acido bórico	1.05 g
Agar	15.0 g

Disolver y esterilizar en forma habitual todos los ingredientes, dejar enfriar a 50 °C y agregar en forma aséptica por filtración los siguientes ingredientes:

200 mg de Cyclohexamida disuelta en 1 mL etanol absoluto

30mg de Ácido Nalidixico disueltos en 1mL de NaOH a 1M

1mL de solución al 1% de Telurito de potasio

100 mg de Acido Nicotínico disueltos en 4 mL de agua destilada estéril

Medio CMS modificado (mCMS)

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	0.1 g
Manosa	10.0 g
H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
Agar	15 g

Disolver todos los ingredientes y esterilizar en forma habitual, dejar enfriar a 50 °C y agregar por filtración Millipore los siguientes ingredientes:

200 mg de Cyclohexamida disuelta en 1 mL etanol absoluto

30mg de Ácido Nalidixico disueltos en 1mL de NaOH a 1M

100 mg de Acido Nicotínico disueltos en 4 mL de agua destilada estéril

Medio D2ANX

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	2.0 g
Caseína hidrolizada	4.0 g
Glucosa	10.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g
NH ₄ Cl	1.0 g
Trizma base	1.2 g
Agar	15 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 libras de presión, dejar enfriar y agregar de manera aséptica por filtración Millipore los siguientes ingredientes:

20 mg de sulfato de polymyxin disueltos en 10 mL de agua destilada estéril

100 mg de Cyclohexamida disuelta en 1 mL de etanol absoluto

2.8 mg de Ácido nalidixico disueltos en 1 ml de NaOH a 1 M

Medio para la producción de ácido a partir de carbohidratos

Reactivo	Cantidad
Peptona	10.0 g
Hidrato de carbono	10.0 g
Azul de bromotimol*	0.0003 g

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 de filtración Millipore.

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

8.2 Pruebas bioquímicas

8.2.1 Reacción de KOH (Hidróxido de Potasio)

La solubilidad del KOH (Ryu E., 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) y permite la formación de un pequeño filamento, esta reacción corresponde a las bacterias Gram (-), caso contrario ocurre cuando el asa se levanta libremente (no hay filamento) y ello es característico de las bacterias Gram (+) como es el caso de *Cmm*.

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.

8.2.2 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).

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. Considerar siempre los testigos en cada prueba.

Medio para crecimiento anaerobio (Hugh y Leifson)

Reactivo	Cantidad
Peptona	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato de potasio dibásico	0.3 g
Agar	3.0 g
Azul de bromotimol (sol. acuosa 1%)	3.0 mL

Disolver los ingredientes y ajustar el pH a 7.1, agregar 5 mL del medio basal a tubos de ensaye y esterilizar durante 20 minutos a 121°C de presión.

Preparar la solución acuosa al 10% de glucosa y esterilizar por filtración; agregar 1.5 mL de glucosa esterilizada a cada tubo que contiene el medio basal.

8.2.3 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.

- 1) 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.
- 2) 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 purpura 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.

8.2.4 Catalasa

La detección de la enzima catalasa se realiza mediante la visualización de burbujas de oxígeno formadas debido a la acción de esta enzima cuando se pone en contacto con un sustrato como los es el peróxido de hidrógeno. La liberación de O₂ indica la presencia de esta enzima, que se encuentra presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas.

Con un asa bacteriológica flameada tomar una colonia bacteriana de 24 a 48 horas de edad y colocarla sobre un portaobjetos limpio. Agregar una gota de agua oxigenada (H₂O₂) sobre la colonia bacteriana y observar si hay o no formación de burbujas sobre el crecimiento bacteriano.

Se debe tener cuidado en no invertir el orden de la reacción ya que esto podría resultar en un falso positivo. La enzima catalasa la producen todas las bacterias fitopatógenas y solo las saprófitas resultan negativas.

8.2.5 H₂S de peptona

Algunas bacterias tienen la capacidad de reducir los aminoácidos sulfurados (cisteína, metionina) y dan como resultado la formación de ácido sulfhídrico (H₂S) y su presencia puede ser fácilmente detectada al añadir proteínas como aminoácidos sulfurados al medio de cultivo y también una sal de plomo hierro, que al reaccionar con el gas producido formarán un sulfuro metálico de color oscuro.

Sembrar por estría simple cuatro tubos con medio de cultivo para la producción de H₂S e incubar por 96 horas a 28 °C. Examinar todos los tubos durante 7 días para detectar la aparición de una coloración café o negra en la superficie del medio de cultivo.

Medio para producción de H₂S

Reactivo	Cantidad
Peptona	2.0 g
Proteosa No. 3 agar	3.0 g
Dextrosa	1.0 g
Acetato de plomo	2.0 g
Tiosulfato de sodio	0.08g
Agar	14.0 g

Disolver los ingredientes en calor, vaciar en los tubos y esterilizar por 15 minutos a 121°C de presión.

8.2.6 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 con un asa, una muestra 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.

Medio para hidrólisis de Almidón

Reactivo	Cantidad
Almidón soluble	15.0 g
Agar	23.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión. Vaciar en cajas petri esterilizadas.

8.2.7 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.

- 1) Transferir a 2 tubos con medio de esculina parte del crecimiento bacteriano y deja incubar a 28 °C por 48 horas.
- 2) 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.
- 3) La prueba puede definirse también, si es positiva o negativa al observar a simple vista como el medio toma una tonalidad negruzca.

Medio para hidrólisis de esculina

Reactivo	Cantidad
Peptona	10.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico	0.5 g
Agar	15.0 g

Disolver todos los reactivos, vaciar y distribuir en tubos de ensaye, esterilizarlos 20 minutos a 115 lb de presión, en autoclave.

8.2.8 Hidrólisis de la gelatina

La gelatina es una proteína simple, obtenida de la hidrólisis del colágeno, la cual puede ser depolimerizada por todas aquellas bacterias que sintetizan la exoenzima gelatinasa.

- 1) Sembrar la bacteria en cuatro tubos de gelatina nutritiva, por el método de punción; dejar un tubo como testigo incubar a 28 °C por 4 días.
- 2) Transcurrido este periodo y antes de tomar el resultado mantener los tubos por 5 minutos a temperatura ambiente. Se ha producido hidrólisis si el medio se observa licuado (líquido), entonces la prueba es positiva.
- 3) Si los tubos se incubaron a más de 25 °C, se deben sumergir en agua helada durante 5 minutos antes de tomar resultados.

Medio para hidrólisis de Gelatina

Reactivo	Cantidad
Extracto de carne	3.0 g
Bacto peptona	5.0 g
Gelatina	120.0 g

Disolver todos los reactivos, vaciar y distribuir en tubos de ensaye, esterilizarlos 20 minutos a 115 lb de presión, en autoclave.

8.2.9 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.

- 1) 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.
- 2) Si después de siete días no se produce el cambio de coloración la prueba debe considerarse negativa.

Medio para producción de ácido a partir de carbohidratos

Reactivo	Cantidad
Peptona	10.0 g
Carbohidrato	10.0 g
Azul de Bromotimol	0.0003 g

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 estéril, y se adiciona al medio ya esterilizado, por medio de filtración Millipore.

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

8.3 Soluciones

Buffer CTAB 2%

Reactivo	Cantidad
CTAB	20.0 g
NaCl	292.0 g
Tris base	2.42 g
EDTA	1.46 g
Agua destilada	1000 mL

Mezclar bien los reactivos y agregar lentamente 750 ml de agua. Si permanecen grumos, calentar en microondas o en parrilla, hasta ebullición y seguir agitando. Aforar a un litro y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Acetato de sodio 3M

Reactivo

Acetato de sodio

Ácido acético glacial

Agua destilada

Cantidad

180.55 g

45.7 mL

1000 mL

Disolver el acetato de sodio en 500 mL de agua y posteriormente agregar lentamente el ácido acético glacial. Ajustar el pH a 5.2 y aforar a 1 L.

Buffer de corrida naranja G 6X

Reactivo

Naranja G

Glicerol

Agua

Cantidad

60 mg

18 mL

40 mL

Aforar la mezcla a 50 mL y almacenar a 4 °C.