



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
SEIS AISLADOS VENEZOLANOS DE *Xanthomonas* sp.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
presentado ante la ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Maybeling Coromoto Junco Solórzano
como requisito para optar por el título
de Licenciada en Biología

Tutora: Dra. Maira Oropeza

Caracas, Venezuela

Agosto-2015

I. RESUMEN

La identificación de bacterias patógenas de plantas es uno de los pasos más importantes y necesarios para el control práctico de las enfermedades bacterianas. No se pueden aplicar las medidas de control apropiadas sin la identificación rápida y precisa del agente patógeno, y la comprensión de la epidemiología de la enfermedad. Las bacterias del género *Xanthomonas* incluyen más de 100 especies y patovares. Se realizó la purificación y el cultivo de *Xanthomonas* adquiridas en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM); así como también se identificó a una bacteria aislada de una planta de geranio (LMV14) como *X. hortorum* pv. *pelargonii*, cuya patogenicidad fue comprobada siguiendo los postulados de Koch. Se utilizaron métodos bioquímicos y moleculares para identificar cada especie bacteriana objeto de estudio. La caracterización bioquímica se llevó a cabo mediante el crecimiento en agar YDC, análisis de motilidad, hidrólisis de esculina, oxidación-fermentación para glucosa y lactosa, producción de la enzima catalasa, utilización del citrato, utilización de la enzima oxidasa, licuefacción de la gelatina, producción de indol, Kligler, hidrólisis del almidón, crecimiento en agar MacConkey y utilización de la enzima ureasa. Mediante pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con iniciadores universales y específicos diseñados para identificación de estas bacterias patógenas, se corroboró la identificación y caracterización de algunos de estos patógenos. Los postulados de Koch se cumplieron a cabalidad con el aislado patogénico de plantas de geranio.

I. FINANCIAMIENTO

El desarrollo de este trabajo especial de grado fue posible gracias al financiamiento obtenido por el Proyecto PEII N° 2012001357: *“Identificación molecular de patógenos y propagación masiva de plantas como herramientas útiles para el programa de certificación de semillas en Venezuela”*, así como por la infraestructura proporcionada por el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

II. AGRADECIMIENTOS

A mi madre, que además de amarla profundamente la admiro, por ser ejemplo para mí de constancia, superación y tenacidad. Gracias por apoyarme siempre y confiar en mí.

A mi tutora, Maira, sólo nosotras sabemos el gran esfuerzo que ambas tuvimos que hacer para que este sueño se hiciera realidad, no tengo palabras para agradecerle tanto compromiso y cariño; por todos los consejos, el apoyo, por enseñarme tanto y sobretodo hacerme reír con su personalidad única. Por todo eso y mucho más, la quiero y la respeto muchísimo.

A mi familia, que siempre estuvieron pendientes de mi carrera y dispuestos a ayudarme. A mis sobrinos por llenarme la vida de alegría.

A mis amigos, especialmente a mi apéndice Raiza, mi cómplice, compañera, amiga, hermana. Vivir la última etapa de mi carrera contigo fue una bendición.

A Ricardo, que siempre estuvo allí con una palabra de aliento, aguantando mis caídas y celebrando mis logros, apoyándome siempre y dispuesto a ayudarme en todo y hasta se convirtió en experto fitopatólogo en el proceso.

A mis compañeros del LMV, el mejor Laboratorio del planeta. Mi familia LMV siempre estará en mi corazón.

III. ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Características de las bacterias fitopatógenas del género <i>Xanthomonas</i> .	5
2.1.1 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	8
2.1.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	10
2.1.3 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> .	12
2.1.4 <i>Xanthomonas albilineans</i> .	13
2.1.5 <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	15
2.2 Diagnóstico de enfermedades bacterianas	17
2.2.1 Postulados de Koch y pruebas de patogenicidad	17
2.2.2. Técnicas de identificación bacteriana mediante pruebas morfológicas, microbiológicas y bioquímicas	20
2.2.3. Técnicas moleculares para la caracterización e identificación de bacterias fitopatógenas.	23
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo General	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Material vegetal	31
4.2 Medios de cultivo para la identificación de la bacteria	31
4.3 Cepas bacterianas. Aislamiento de <i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	33
4.4 Identificación morfológica y características culturales	35
4.5 Caracterización bioquímica	36
4.6 Caracterización molecular	38
4.7 Demostración de los postulados de Koch	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 Aislamiento del agente causal de bacteriosis en geranio	54
5.2 Caracterización morfológica de todos los aislados bacterianos	55
5.3 Caracterización bioquímica	58
5.4 Caracterización molecular	66
5.5. Postulados de Koch para <i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	77
6. CONCLUSIONES	84
7. RECOMENDACIONES	85
8. BIBLIOGRAFÍA	86

IV. INDICE DE TABLAS

Tablas	Pág.
Tabla 1 Identificación microbiológica y bioquímica del género <i>Xanthomonas</i> .	22
Tabla 2 Tabla 2: Resultado de la morfología observada de las cepas en medios LB y YDC.	58
Tabla3 Resultado de pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas.	66
Tabla 4. Concentración y pureza de los DNAs de las cepas bacterianas en estudio	67

V. INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. Pruebas bioquímicas presuntivas para la identificación de bacterias patógenas.	22
Figura 2. Hojas de geranio con sintomatología de clorosis, necrosis y marchitamiento.	55
Figura 3. Tinción de Gram de microorganismos observados al microscopio óptico con aceite de inmersión	56
Figura 4. Morfología de las cepas bacterianas en agar	57
Figura 5. Prueba de (O-F); metabolismo oxidativo de <i>Xanthomonas</i>	59
Figura 6. Resultado negativo de la prueba de hidrólisis de urea en todas las cepas estudiadas	60
Figura 7. Resultado de la prueba citrato de las cepas de <i>Xanthomonas</i> estudiadas y de la cepa control negativo <i>E.coli</i>	61
Figura 8. Resultado prueba de hidrólisis de gelatina de las cepas estudiadas.	61
Figura 9. Resultado de la prueba de Indol realizada a las cepas bacterianas	62
Figura 10. Resultado prueba nitrato	63
Figura 11. Registro fotográfico de electroforesis de los extractos de DNA total.	67
Figura 12 Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR, empleando los iniciadores universales U1 y U2	68
Figura 13. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR, empleando los iniciadores específicos PGBL1 y PGBL2.	69
Figura 14. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR, empleando iniciadores específicos P1 y P2.	71
Figura 15. Registro fotográfico de electroforesis de la amplificación de la rep-PCR realizada por Tsygankova y colaboradores (2004) con los iniciadores KRP2+KRP8	71
Figura 16. Registro fotográfico de electroforesis de la amplificación de rep-PCR, empleando el iniciador KRPN2	72
Figura 17. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones	74

por ERIC-PCR (a) y BOX-PCR (b), empleando los iniciadores universales ERIC1-ERIC2 y BOAX1 respectivamente.

- Figura 18.** Contaminación presentada en los microesquejes de geranio cultivados *in vitro*. 77
- Figura 19.** Establecimiento del patosistema en cámaras húmedas con hojas de geranio inoculadas con el aislado LMV14 78
- Figura 20.** Discos de hojas de geranio en cámaras húmedas, las cuáles fueron inoculadas al cortarlas con un sacabocado impregnado en la solución bacteriana 78
- Figura 21.** Necrosis observadas en hojas de geranio inoculadas con *X. hortorum* pv. *pelargonii*. 79
- Figura 22.** Lesiones típicas de bacteriosis presentes en discos de hojas de geranio inoculadas con la bacteria LMV14 identificada como *X. hortorum* pv. *pelargonii* . 79
- Figura 23:** Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a la bacteria reislada de las hojas de geranio inoculadas con el aislado LMV14 80
- Figura 24.** Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR, empleando iniciadores específicos P1 y P2. 81

VI. SIGLAS Y ABREVIATURAS

23s	Subunidad ribosomal mayor de procariotas
Abs	Absorbancia
Alc/Alc	Alcalino/ Alcalino
AN	Agar nutritivo
BA	Benziladenina
BNG	Bacilos Gram negativos
BOX	Elemento REP tipo "caja"
CENICAÑA	Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar
CMDL	Centro Médico Docente la Trinidad
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CVCM	Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos
D5	Medio 5 serie D Kado y Heskett, 1970
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Dinucleótidos Trisfosfato
DO	Densidad optica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERIC	Secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias
FD	Factor de dilución
GYCA	Glucosa. extracto de levadura Carbonato de calcio.
IBE	Instituto de Biología Experimental
ITS	Espaciador transcrito interno
IVIC	Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
KIA	agar con hierro de Kligler
LAC	Lactosa
LB	Medio Luria Bertoni
LMV	Laboratorio de Mejoramiento Vegetal
MS	Medio Murashigue y Skoog
OF	Medio de oxidación-fermentación
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
RAPD	Amplificación de DNA polimórfico al azar
REP	Secuencias palindrómicasrepetitivas de enterobacterias
rep-PCR	Amplificación por PCR de elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
TTC	Cloruro de tetrazolio
YDC	Carbonato de Calcio, dextrosa, extracto de levadura
YSP	Peptona, Sacarosa, extracto de levadura

1. INTRODUCCIÓN

Las cosechas enfermas tienen poco valor en el mercado, y no son adecuadas para el almacenamiento. Entre los principales agentes causantes de enfermedad en plantas, se encuentran las bacterias fitopatógenas, las cuales pueden causar enfermedades graves y dañinas, ocasionando desde manchas, mosaicos o pústulas en hojas y frutos; podredumbres malolientes de tubérculos, hasta la muerte de las plantas; lo que se traduce en graves pérdidas económicas (Vidhyasekaran, 2002). La mayoría de las plantas silvestres y cultivadas, tienen inmunidad innata o resistencia a muchos patógenos; sin embargo, muchas plantas pueden hospedar fitopatógenos sin desarrollar síntomas (Vidaver y Lambrecht, 2004).

Las características morfológicas de las células bacterianas son poco variables y se han establecido técnicas biológicas, bioquímicas, fisiológicas, inmunológicas y genómicas para la identificación fiable significativa y la clasificación de los agentes patógenos bacterianos (Vidaver y Lambrecht, 2004).

Las bacterias del género *Xanthomonas* incluyen más de 100 especies de fitopatógenos y patovares pertenecientes a la subdivisión de las proteobacterias. Las *Xanthomonas* son bacterias Gram-negativas, con forma de bastones, cuyo tamaño aproximado va de 0.4-1.5 μm de ancho por 1.2-4.0 μm de largo, móviles por medio de un flagelo polar, producen un pigmento amarillo cuando crecen en medio sólido y la mayoría tienen un crecimiento lento, todas son patógenos vegetales y se encuentran asociadas sólo a plantas o materiales vegetales (Rivera, 2007). Las especies y patovares de

Xanthomonas fueron clasificados taxonómicamente de acuerdo a su capacidad de infectar diferentes tipos de cultivos vegetales. Como ejemplos pueden citarse: *X. campestris* pv. *vesicatoria* en Pimentón, *X. hortorum* pv. *pelargonii* en Geranio, *X. campestris* pv. *phaseoli* en Frijol, entre otras (Swings y Civerolo, 1993).

Se estima que la acción conjunta entre las enfermedades, los insectos y las malezas, anualmente interfieren con la producción de los cultivos, acentuando la destrucción del 31 al 42% de todas las cosechas producidas a nivel mundial. Adicionalmente, de un promedio de 36,5% del total de las pérdidas, 14,1% son debidas a enfermedades (Agrios, 2005).

Las bacterias del género *Xanthomonas* causan grandes pérdidas en agricultura debido a su hábitat en las plantas. Puede vivir en el suelo durante un año y extenderse a través del agua de riego. Según Vidaver y Lambrecht (2004), el estudio exhaustivo del patógeno (identificación y clasificación), permite formular esquemas de manejo integrado, con el propósito de reducir la incidencia y severidad de la enfermedad que producen y así reducir las pérdidas que éstas generan.

En este sentido, este trabajo pretende caracterizar a nivel morfológico, bioquímico y molecular 6 cepas bacterianas pertenecientes al género *Xanthomonas*.

1. ANTECEDENTES

Las enfermedades bacterianas a menudo se consideran difíciles de manejar. En algunos casos, no son fáciles de identificar, pues a simple vista pueden ser confundidas con daños fisiológicos o daños provocados por condiciones ambientales adversas (Gilchrist-Saavedra y col., 2005).

La identificación de bacterias patógenas de plantas, es uno de los pasos más importantes y necesarios para el control práctico de las enfermedades que estas causan. No se pueden aplicar las medidas de control apropiadas sin la identificación rápida y precisa de un agente patógeno y la comprensión de la epidemiología del patógeno y la enfermedad (Takikawa, 2012).

La clasificación de las bacterias patógenas de plantas ha cambiado en gran medida de acuerdo a los cambios en la taxonomía bacteriana en general. En el pasado, muchas bacterias patógenas de plantas se clasificaron basándose únicamente en las plantas hospedantes de la cual se aisló la bacteria, junto con las bacterias no patógenas, en la actualidad se clasifican en función de sus características fenotípicas y genéticas (Takikawa, 2012).

La detección e identificación de patógenos bacterianos ha sido posible mediante el aislamiento en medios de cultivo y métodos de toma de huellas dactilares metabólicas. Pero son de trabajo intensivo, requieren mucho tiempo y a menudo, los resultados no son concluyentes. En la actualidad, el uso de una combinación de pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares permite el diagnóstico acertado de las especies bacterianas (Takikawa, 2012).

La expresión de los síntomas después de la infección por los patógenos bacterianos puede no ser clara, o puede tardar mucho tiempo para su

desarrollo en los tejidos lejos del sitio de la infección, esto ocurre por ejemplo en las enfermedades de marchitez bacteriana; en tales casos, la infección puede tener lugar en las raíces o partes basales del tallo y los síntomas se expresan sólo después de un lapso de tiempo apreciable. Mientras que, si los síntomas se vuelven observables, el patógeno bien podría haberse establecido en los tejidos internos de las plantas, por lo que es difícil aplicar medidas efectivas para reducir la propagación de la enfermedad.

La fiabilidad en sólo el desarrollo de los síntomas externos de la infección, puede conducir a la errónea identificación del patógeno y en consecuencia los métodos de control que se sugieren pueden resultar ineficaces. Por lo tanto, la identificación precisa de las especies/cepas bacterianas causantes de la enfermedad es el requisito básico para la planificación de estrategias eficaces de gestión de control de las mismas. Además, dicha identificación, y por ende la diferenciación de las especies y subespecies de las cepas bacterianas causantes de la enfermedad, permiten tomar una mejor decisión al momento de la elección del cultivar (mostrando resistencia, si está disponible) y la aplicación de productos químicos apropiados en el tiempo. Finalmente, la capacidad de las bacterias de multiplicarse muy rápidamente y alcanzar altos niveles de población dentro de un corto período de tiempo, es un factor importante a tener en cuenta en cualquier ecosistema en general, y como patógenos de plantas y animales, en particular (Narayanasamy, 2001).

Como requisito básico para el diagnóstico de bacterias patógenas, la patogenicidad de la bacteria aislada de las plantas enfermas, tiene que ser probada y todos los pasos de los postulados de Koch tienen que ser cumplidos.

2.1 Características de las bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas*.

El género *Xanthomonas* comprende varias bacterias patógenas de plantas que afectan una amplia gama de hospederos. A pesar de las grandes pérdidas que producen las enfermedades producidas por *Xanthomonas*, la clasificación y las relaciones filogenéticas del género son aún objeto de debate activo. Algunas de las relaciones entre patovares y especies no se han aclarado a fondo, con viejos patovares convirtiéndose en nuevas especies (Rodríguez y col., 2005).

Las bacterias que pertenecen al género *Xanthomonas* causan una variedad de síntomas, incluyendo la necrosis, gomosis y/o enfermedades vasculares o parenquimatosas en las hojas, tallos o frutos de muchas plantas. Las *Xanthomonas* son bacilos Gram-negativos, con células a veces ligeramente curvadas con extremos redondeados; principalmente se observan solas o en parejas, pero también se producen cadenas y filamentos; se encuentran células de hasta 1,5 μm de ancho y 4 μm de largo aunque la longitud celular es variable, incluso dentro de la misma cepa. La aparición de pares de células es bastante típica para *X. campestris*, pero no está claro si se trata de un par de células o una célula individual alargada. La mayoría de las células tienen gránulos intracelulares. No producen esporas u otras estructuras de resistencia. Las células producen goma xantano (polisacárido extracelular) dependiendo de las condiciones ambientales, el cual no es reconocible en forma de cápsula mediante microscopía óptica o electrónica (Swings y Civerolo, 1993).

Se creía que todos los miembros del género *Xanthomonas* eran patógenos, pero Vauterin y col. (1996), demostraron que algunas no lo son o son muy poco virulentas. Estas razas se usan actualmente como agentes de control biológico (Takikawa, 2012).

Basándonos en micrografías electrónicas, *Xanthomonas* tiene la estructura de la membrana interior y exterior típica de bacterias Gram-negativas (Dos Santos y Dianese, 1985). La membrana externa es una estructura única de las bacterias Gram-negativas, compuesta por un mosaico de seis a ocho proteínas principales, una o dos moléculas de lipopolisacáridos heterogéneos y varios lípidos. La membrana externa cumple una variedad de funciones, por ejemplo: protección del medio ambiente, la permeabilidad selectiva y funciones de exportación (Hancock, 1991).

La mayoría de las *Xanthomonas* producen el pigmento xanthomonadina, el cual se observa en forma de manchas amarillas, insoluble en agua cuando se cultivan en medios sólidos comunes como el extracto de levadura, carbonato de calcio (GYCA), Levadura- Peptona-Glucosa-Agar (LPGA) y el agar nutritivo (AN). Los tonos varían de muy amarillo pálido a amarillo profundo. Los cambios de intensidad de color se dan durante el envejecimiento. Dicho pigmento amarillo se encuentra, probablemente, unido a la membrana celular (Dianese y Schaad, 1982).

Un gran número de medios diferenciales y semi-selectivos están disponibles para el aislamiento e identificación de *Xanthomonas*. Entre los recomendados se encuentran el medio YSP (yeast extract sucrose peptone) y el medio YDC (Yeast extract-dextrose-carbonate), debido a que favorecen el crecimiento de la

bacteria y permiten diferenciarla de otros organismos (Schaad y col., 2001). También son ampliamente utilizados los medios selectivos de la serie D, entre los cuales se encuentra el medio selectivo para *Xanthomonas*, denominado D5, reportado por Kado y Heskett (1970).

Según Swings y Civerolo (1993), la necrosis de los tejidos es un síntoma característico de muchas especies del género *Xanthomonas*, especialmente de aquellas que causan manchas en las hojas; ya que al avanzar la enfermedad, el fenol de la vacuola reacciona con el citoplasma y la membrana, envolviéndolos de oxidasas y glicosidasas; la oxidación del fenol es lo que resulta en el desarrollo de una pigmentación café o negra de los tejidos de la planta. Estos autores, también afirman, que las lesiones acuosas se vuelven necróticas al final de la infección, probablemente debido a la desintegración continua de los tejidos; y en infecciones severas las lesiones pueden prevalecer destruyendo grandes áreas de la lámina foliar, lo que se conoce como tizón bacteriano; finalmente el área necrótica se separa de la parte sana del tejido y se desprende.

X. campestris puede ser identificada por las lesiones negras que aparecen en la superficie de las plantas cuando están contaminadas. El patógeno interactúa en primer lugar con el hospedador secretando una serie de proteínas efectoras, las cuales pueden comportarse de forma avirulenta disfrazándose para secretar varias reacciones hipersensibles y proteínas externas con el fin de que se produzca la interacción con las células huésped. Después, *X. campestris* se dirige al tejido vascular, causando oscurecimiento y clorosis marginal. La bacteria se filtra en la hoja hacia los estomas, hidátodos y hacia las células epidérmicas iniciando una nueva lesión. En plántulas se dan infecciones

graves. Puesto que la enfermedad avanza a través de toda la planta, no se puede formar el tallo principal, se produce un retraso en el crecimiento y un ennegrecimiento de las venas. Finalmente, la bacteria prolifera a través del sistema vascular, causando que las semillas se vuelvan infecciosas y se den nuevas infecciones.

Actualmente existen varios patovares de esta especie. El término “patovar” fue propuesto por Young y colaboradores (1978), como un significado de preservación del nombre del patógeno de la planta, por el cual la información adecuada del fenotipo no estaba disponible para diferenciar a ésta de las otras especies. El término patovar no es taxonómicamente categórico en el código internacional de nomenclatura bacteriana (Sneath y col., 1992), ha sido una manera de dar significado temporal, ya que los nombres pueden ser guardados para que en el futuro se puedan regresar las especies a un nuevo taxón.

2.1.1 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Se reconocen aproximadamente 125 patovares de *X. campestris*, pero muy pocas son fácilmente distinguibles del tipo de especies por las pruebas bioquímicas convencionales usadas en la segunda edición del manual de Bergey's (Schaad y col., 2001). Por esta razón, todas, excepto 4 especies de *Xanthomonas*, han sido clasificadas como patovares de *X. campestris*; sin embargo, muchos de estos patovares pueden ser distinguibles por pruebas serológicas, proteínas de membrana, crecimiento en algunos medios de cultivos semiselectivos, pruebas bioquímicas y por pruebas moleculares como Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), entre otras (Martínez, 2009).

La podredumbre negra, causada por *X. campestris* pv. *campestris*, se encuentra en cualquier lugar que se cultiven las crucíferas y se considera la enfermedad más destructiva de las crucíferas en todo el mundo (Chupp y Sherf, 1960). La enfermedad se caracteriza por clorosis en forma de V en los tejidos vasculares así como lesiones necróticas en el margen de las hojas (Vicente y col. 2001).

El control de la podredumbre negra es difícil, y sólo se puede lograr mediante el uso de semillas libres de la enfermedad y las prácticas de cultivo que limitan la difusión del patógeno (Williams, 1980; Álvarez, 2000). Los cultivares resistentes podrían desempeñar un papel importante en la reducción de las pérdidas debidas a esta enfermedad (Massomo y col. 2003).

Estudios realizados por Chidamba y Bezuidenhout en el 2012 sobre caracterización de *X. campestris*, revelan que existen características determinantes para ésta especie, incluyendo la viscosidad de la suspensión bacteriana, reacción de Gram y la hidrólisis de almidón. También se puede realizar ELISA indirecto usando anticuerpos monoclonales específicos para *X. campestris* pv. *campestris*. Todas estas pruebas son determinantes al momento de la identificación de la bacteria. (Schaad y col. 2001).

Entre las características bioquímicas más resaltantes de *X. campestris* pv *campestris*, tenemos que es una bacteria Gram negativa, aeróbica, catalasa positiva, oxidasa negativa, con crecimiento a 35 ° C, produce H₂S e indol, no reduce nitratos, hidroliza almidón, gelatina y esculina, es intolerante a 0.1 y 0.02 % de TTC . Las cepas producen ácido a partir de D-arabinosa, arginina,

dulcitol, galactosa, D-glucosa, maltosa, manosa, sorbitol, sacarosa y xilosa (Popopic y col., 2013).

2.1.2 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

X. campestris pv. *vesicatoria* es la causante de la mancha bacteriana del tomate y pimiento (Swings y Civerolo, 1993). Las plantas enfermas presentan crecimiento y rendimiento reducidos en comparación con las plantas sanas. La medida de las reducciones depende de la gravedad de la enfermedad y la etapa de crecimiento de la planta afectada (Pohronezny y Violin, 1983).

Los estudios muestran que son bacterias Gram-negativas, con forma de bastón, móviles, oxidasa negativa, arginina-dihidrolasa positiva, no fluorescentes y crecen a 37 °C, no licuan gelatina ni almidón y producen H₂S (Bradbury, 1986; Lelliott y Stead, 1987; Vauterin y col. 1990).

En la década de 1990, Vauterin y colaboradores (1990) y Stall y colaboradores (1994), determinaron que existían dos grupos genética y fenotípicamente distintos dentro de *X. campestris* pv. *vesicatoria*; el grupo A y el grupo B. Jones y colaboradores en 2004 confirmaron que las cepas del grupo A fueron negativos de manera uniforme para la hidrólisis del almidón y la actividad pectolítica mientras que el grupo B consistió de cepas amilolíticas y pectolíticas. Con base en las similitudes de DNA (Jones y col., 2000; Stall y col., 1994; Vauterin y col., 1990), era evidente que las cepas de los grupos grupo A y B no estaban relacionados a nivel de especie. Vauterin y colaboradores (1995) proponen una reclasificación de las *Xanthomonas* y divide *X. campestris* pv. *vesicatoria* en dos especies, con las cepas B siendo retenidos en *X. vesicatoria* y las cepas A como patovar de *X. axonopodis*.

La enfermedad causada por esta bacteria se manifiesta tanto en plántulas como en plantas adultas. En plántulas de Chile, la infección puede ocasionar una defoliación severa. Las lesiones se presentan en las partes de la hoja (limbo y pecíolo) y en los frutos incluyendo el pedúnculo y cáliz. Los tallos también son susceptibles, pero generalmente el follaje es infectado en mayor grado. La infección de los verticilos florales a menudo causa un considerable desprendimiento de las inflorescencias (Bashan y Okon, 1986). En tomate, los síntomas en las hojas de las plantas adultas se reflejan en forma de pequeñas manchas de casi 3 mm de diámetro, irregulares y de color gris púrpura, que presentan un halo amarillo estrecho con la parte central de color negro. Cuando son numerosas, estas manchas producen defoliación o hacen que las hojas queden rasgadas. Este conjunto de síntomas fueron descritos con base en los resultados de pruebas de inoculación sobre plantas de Chile y tomate (Millán, 1999).

En Venezuela, el tomate es uno de los principales productos hortícolas para mercado fresco, con producción continua durante todo el año, debido a la extensión en latitud y a la diversidad de ambientes. Esto determina una zonificación de la producción en directa relación con la temperatura media de cada lugar. Su producción se encuentra relativamente extendida, pero se da con mayor intensidad en los estados Lara, Aragua, Guárico, Portuguesa, Carabobo y Zulia. De acuerdo a Faria y Nava (2009), el tomate es un cultivo hortícola importante en Venezuela, con una producción estimada para el año 2010 de 239 000 t, en una superficie de 9.000 ha y un rendimiento de 21,67 t.ha⁻¹.

Por otro lado, el cultivo del pimentón viene en un crecimiento acelerado tanto en producción, rendimiento y superficie cosechada y allí ha ocurrido principalmente dos cosas: el incremento de la superficie sembrada, el uso de nuevos cultivares con mayor tolerancia a enfermedades, y el empleo de híbridos que han sido seleccionados para las condiciones venezolanas. Por lo que se evidencia la importancia en el control y prevención de las enfermedades de estos cultivos.

2.1.3 *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

X. campestris pv. *phaseoli*, agente causal del tizón bacteriano común del frijol, fue descrita por primera vez en 1987, y ha sido objeto de varias revisiones taxonómicas en los últimos años. Las pérdidas económicas son resultado de la reducción de la comercialización de la semilla e incluso la pérdida de la producción de semillas debido a la acción de esta bacteria patógena. Los cultivares y las variedades locales varían en respuesta a la infección, aun cuando las condiciones son propicias para el desarrollo de la enfermedad (Saettler, 1989).

Dentro del patovar *phaseoli*, se han descrito dos variantes: *Xcp(c)* = tipo común y el *Xcp(f)* = fuscans. El tipo común representa cepas de *phaseoli* de colonias de pigmentación amarilla, mientras que el tipo fuscans es de color amarillo pero produce otro pigmento melanoide extracelular, el cual es difusible al medio de cultivo. Las enfermedades causadas por estas bacterias son difíciles de distinguir bajo condiciones de campo, y el tipo fuscans puede perder la capacidad de perder melanina, lo que haría difícil la diferenciación de esta bacteria del tipo común (Zapata y Gaud, 2001).

El patógeno ataca todos los órganos de la parte aérea de la planta pero los síntomas son más severos y visibles en las hojas y las vainas (Martínez, 2009). A su vez, éste causa más daño a 28°C que a temperaturas más bajas (Patel y Walker, 1963). La enfermedad ocurre en la mayoría de las regiones donde se siembra frijol con ambientes favorables para el desarrollo de la enfermedad y ha sido reportada en la mayoría de los países de América, Europa y África (Hernández, 1983).

El frijol, es una de las leguminosas de grano fundamental en la alimentación de las poblaciones rurales de Venezuela, por su contenido de proteína (23%), carbohidratos (56%), grasa, fibra, minerales y vitaminas (De Gouveia y col., 2005; Rodríguez y López, 2009), por lo que es vital el control de las enfermedades que atacan a este cultivo de importancia para el país, y como se ha mencionado, el control de las enfermedades comienza con la identificación del causante de las mismas.

2.1.4 *Xanthomonas albilineans*.

X. albilineans es el agente causal de la escaldadura de la hoja de la caña de azúcar. Es una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo y se ha localizado en más de 60 países alrededor del mundo. Fue descrita por primera vez en el año 1920 en Java, Australia y Fiji. En Venezuela, la enfermedad se detectó en 1968, en un material proveniente de la Estación Experimental de Barbados (Ricaud y col, 1989; Ordosgoitti y col. 1977).

La enfermedad se transmite principalmente por daños mecánicos, y presenta tres etapas (Birch, 2001). La fase crónica se caracteriza por una raya blanca fina de 1 a 2 mm de espesor en la superficie de la hoja, de longitud variable y paralela a las nervaduras de la hoja, llamada "línea a lápiz blanca" (Álvez y col.,

2011). En la fase aguda, la raya se extiende hasta el borde de la hoja provocando marchitez y necrosis. En la fase de latencia la planta infectada no exhibe síntoma alguno, lo que dificulta el diagnóstico y favorece la diseminación de la enfermedad (Huerta y col., 2003b).

X. albilineans presenta forma de bastón de 0,25-0,30 x 0,60-1,00 μm , es móvil, con un flagelo polar, es Gram negativa, mucoide, aeróbica y exhibe un tiempo de generación de 3 a 7 días, a una temperatura óptima de crecimiento de 27 °C y máxima de 35 °C; posee resistencia intrínseca a diferentes antibióticos como la novobiocina y la cefalexina (Birch, 2001; Davis, 1994; Schaad y col., 2001). El aislamiento *in vitro* en medios de cultivo, ha tenido limitaciones prácticas debido a la naturaleza mucoide del patógeno, su lento crecimiento y exigencias nutricionales (Davis, 1994).

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es uno de los principales rubros agrícolas que se siembran en Venezuela, no sólo por volúmenes de producción, sino también por las áreas sembradas. Además es una fuente nutricional importante de carbohidratos (Cova y col., 2006). La importancia de este cultivo puede ser atribuida a sus múltiples usos, siendo principalmente empleada como materia prima para la producción de azúcar y alcohol (Silva, 2005).

En este rubro, las enfermedades se han convertido en uno de los principales factores que afectan la producción azucarera nacional. Esto se debe a que en los últimos años, han aumentado las poblaciones de patógenos que afectan al cultivo y se han extendido los que ya existían (Cova y col., 2006). En el año 2014, Alvez identificó un aislado patogénico (LMV08) de caña de azúcar como

X. albilineans utilizando pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares. Este aislado será usado como control positivo en el desarrollo de este trabajo.

2.1.5 *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*

X. hortorum pv. *pelargonii* es el agente causal de la mancha foliar bacteriana y la pudrición del tallo del geranio, que es económicamente la enfermedad más importante de esta planta ornamental (Swings y Civerolo, 1993). Esto es atribuido principalmente a la práctica de la propagación vegetativa en los cortes, en los que una infección latente puede transmitirse fácilmente de una generación a la siguiente (Munnecke, 1954).

El tizón bacteriano causado por *X. hortorum* pv. *pelargonii* anteriormente conocida como *X. campestris* pv. *pelargonii*, es una enfermedad grave (Strider, 1985). Los síntomas consisten en lesiones acuosas en el envés de las hojas seguido de flacidez, marchitamiento marginal acompañados de necrosis intervenosa. La podredumbre del tallo se produce cuando la bacteria se mueve en el vástago a través del tejido vascular. El diagnóstico preciso de tizón bacteriano mediante inspección visual se ve obstaculizada por síntomas similares causados por otros agentes patógenos o daños mecánicos (Chittaranjan y De Boer, 1997).

En condiciones desfavorables para el desarrollo de la enfermedad, el patógeno sobrevive en la superficie de las plantas y dentro de las plantas sin causar síntomas (Digat, 1987). Los cortes de las plantas infectadas de forma latente o contaminados utilizados para la propagación son propensos a difundir eficazmente la enfermedad. Dado que no existen otros métodos de control químico o estén disponibles, la detección precisa y sensible de *X. hortorum* pv.

pelargonii es necesaria para permitir su pronta eliminación de las plantas infectadas y esquejes.

Las colonias puras de esta bacteria son mucoides, de color amarillo pálido, son Gram negativas y presentan actividad oxidasa y catalasa positivas, utilizan glucosa, manosa, galactosa, celobiosa y fructosa (Vauteriny col., 1995).

Todos los *Pelargonium* tienen su origen en África del sur; *Pelargonium peltatum* perteneciente a la familia Geraniaceae es conocida como geranio de hojas de hiedra. Su importancia no está basada sólo en su utilidad ornamental sino también medicinal y como aditivo en todo tipo de productos para el cuidado de la piel. Aranguren (2005), realizó un estudio en la región de Bailadores, en el municipio Rivas Dávila del estado Mérida-Venezuela. De un total de 101 que son empleadas con fines medicinales el geranio fue incluido entre 20 especies medicinales de valor relativo importante.

Algunos químicos derivados de las plantas son fuente invaluable de una variedad de fármacos, condimentos, colorantes, aceites y resinas (Balandrin y col., 1985). Muchos de estos fitoquímicos valorados comercialmente son metabolitos secundarios, producidos en pequeñas cantidades, y a menudo acumulados en tejidos específicos (Kim y col., 2006). Tomando en cuenta lo antes expuesto, se destaca nuevamente la importancia del diagnóstico temprano de las enfermedades que atacan este cultivo, entre ellas, la producida por *X. hortorum* pv *pelargonii*.

2.2 Diagnóstico de enfermedades bacterianas

2.2.1 Postulados de Koch y pruebas de patogenicidad

La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones. Las características a determinar y su número dependen principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue con la identificación (Díaz, 2005).

El diagnóstico de la enfermedad producida por un agente patógeno, se basa en el cumplimiento de los postulados enunciados por Robert Koch (Agrios, 2005). Koch publicó sus postulados por primera vez en el año 1882 en un artículo sobre la etiología de la tuberculosis, pero no fue hasta 1890 cuando estos postulados fueron publicados tal y como los conocemos hoy (Fuentes y col., 2007). Koch descubrió que el patógeno podía ser aislado de los individuos enfermos y cultivado en el laboratorio sin perder su capacidad patogénica, ya que cuando se les inoculaba a nuevos individuos se reproducía la enfermedad. A partir de estas investigaciones propuso los siguientes postulados: 1. La bacteria patógena debe aislarse siempre de individuos enfermos y nunca de individuos sanos. 2. Cuando el individuo está enfermo la bacteria debe aislarse en cultivo puro. 3. Si la bacteria se inocula a otro individuo debe reproducirse la enfermedad. 4. La bacteria debe aislarse nuevamente en cultivo puro (Fuentes y col., 2007).

En una enfermedad compleja, dos o más agentes patógenos pueden estar involucrados, por lo que es difícil identificar el patógeno primario y los

secundarios invasores de los tejidos de la planta afectada. La expresión del síntoma siguiente a la infección por las bacterias patógenas puede no ser clara o puede tomar mucho tiempo para el desarrollo de los síntomas en los tejidos lejos del sitio de infección, como ocurre en las enfermedades de marchitamiento causadas por bacterias. En tales casos, la infección puede tener lugar en las raíces o las porciones basales del tallo y los síntomas se expresan sólo después de lapsos de tiempo apreciables. Por el tiempo en que los síntomas son observables, el patógeno se podría haber establecido bien en los tejidos internos de las plantas, lo que hace difícil, si no imposible aplicar medidas efectivas para reducir la enfermedad en extensión. Sin embargo, la confiabilidad en el desarrollo de síntomas externos de la infección solo puede conducir a la identificación errónea del patógeno y en consecuencia los métodos de control que se sugieren pueden resultar ineficaces. Por lo tanto, la identificación precisa de las especies/cepas de patógenos bacterianos, es el requisito básico para la planificación de estrategias de gestión eficaz de la enfermedad.

Para garantizar la utilización de plantas sanas, libres de patógenos existe una herramienta altamente valiosa que es el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no sólo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. En ese último aspecto, vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas del cultivo *in vitro*: a) mejoramiento genético; b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma y d) micropropagación.

La propagación de plantas *in vitro* o micropropagación, es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Los cultivos son realizados por personal especializado, con agentes específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.), y en condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz). Según Frid (2009). Los pasos son:

1. Elección de la planta original donante de explantes.
2. Obtención y desinfección de los explantes.
3. Adaptación de explantes al medio de cultivo.
4. Formación de raíces con el fin de convertir los brotes en plántulas completas.
5. Aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones medioambientales *ex vitro*

Las ventajas de este método es que permite obtener muchos individuos iguales en una pequeña superficie, controlar las condiciones ambientales, estudiar diversos procesos de las plantas y evita el riesgo de que proliferen agentes patógenos (se realiza en medios esterilizados). Constituye uno de los métodos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura. Se aplica en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales (Frid, 2009) y ofrecen plantas sanas idóneas para la realización tanto de pruebas de patogenicidad como también la confirmación de los postulados de Koch.

2.2.2. Técnicas de identificación bacteriana mediante pruebas morfológicas, microbiológicas y bioquímicas

Existe un gran número de patógenos vegetales presentes en los tejidos enfermos de la planta. La bacteria entonces puede ser detectada cultivándola en un medio rico, y posteriormente en medios selectivos para su crecimiento. La capacidad de muchos medios de cultivo para seleccionar y diferenciar un género bacteriano, está basada en prevenir o retardar el crecimiento de otros organismos, mediante el uso de inhibidores de las rutas metabólicas y antibióticos que suprimen la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos. (Swings y Civerolo, 1993).

Los medios denominados serie-D fueron diseñados para cinco géneros bacterianos patógenos de plantas (*Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*), y se basan principalmente en alterar los componentes de la superficie y la membrana de las células bacterianas, lo que elimina la necesidad del uso de agentes inhibitorios de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Kado y Heskett, 1970).

En el análisis morfológico para la identificación de bacterias, la tinción de Gram es una prueba importante que permite clasificar a las bacterias en dos grupos: las que captan el colorante básico cristal violeta, es decir, las bacterias Gram-positivas, y las que pierden ese colorante por lavado las cuales son bacterias Gram-negativas. Las diferencias en la composición de las paredes celulares de las células Gram-positivas, que contienen una capa gruesa de peptidoglucano con numerosos enlaces cruzados de ácido teicoico, y las paredes de las células Gram-negativas en las que la capa de peptidoglucano es más delgada,

explican las diferencias de la tinción Gram entre estos dos principales grupos de bacterias. Es probable que la gran cantidad de enlaces cruzados de ácido teicoico en los microorganismos Gram-positivos, contribuya a su capacidad de resistir la decoloración con alcohol, si bien el colorante de contraste puede ser captado por estos microorganismos, su color violeta no se altera. Por otra parte, las bacterias Gram-negativas, raras veces (o nunca) retienen el cristal violeta (no se tiñen de violeta) si el procedimiento de tinción se ha realizado de manera apropiada; éstos pierden el cristal violeta con la decoloración y aparecen de color rosa en los frotis preparados y teñidos de manera correcta (Forbes y col., 2009). En la Tabla 1 y en la Figura 1 se muestran las bases de algunas pruebas morfológicas y bioquímicas usadas para el diagnóstico del género *Xanthomonas*.

En 1923, David Bergey publicó un manual para las bacterias de interés médico conocidas hasta entonces, las características que podían utilizarse para la identificación bacteriana. Este manual (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*) ha sido utilizado en muchos laboratorios de microbiología de todo el mundo y ha sido actualizado a lo largo de los años (Díaz, 2005).

A pesar de los cambios y avances en los criterios de clasificación, la identificación sigue basándose en la distinción bioquímica entre géneros y especies, que apenas se han modificado. Por lo que se continúan utilizando las características publicada en la novena edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Díaz, 2005).

Tabla 1: Identificación microbiológica y bioquímica del género *Xanthomonas*.
Schaad y col., (2001).

Prueba	Resultado
Tinción Gram	Gram-
Movilidad	Móvil. 1 flagelo polar.
Medio OF.	Aeróbica.
Oxidasa	-
Catalasa	+
Esculina	+
Citrato	+
Gelatina	+
Indol	-
Nitrato	-
Almidón	+
MacConkey	Lac-

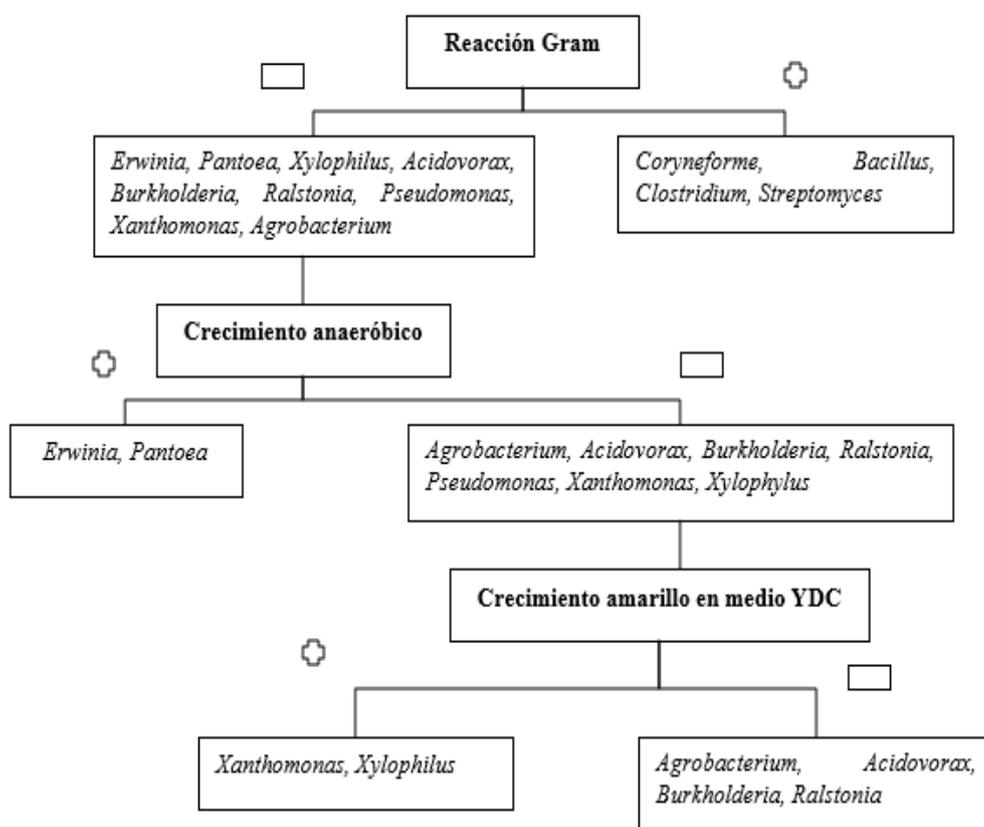


Figura 1: Pruebas bioquímicas presuntivas para la identificación de bacterias patógenas. Tomado de Schaad y col., (2001).

Un diagnóstico simple puede requerir sólo el reconocimiento de los síntomas y una prueba rápida para confirmar la identidad de una bacteria patógena conocida. Aunque algunas bacterias fitopatógenas son relativamente fáciles de identificar de una mezcla de poblaciones, otras son difíciles de distinguir de bacterias saprófitas prevalentes en el ambiente (Álvarez, 2000). La variabilidad fenotípica y genotípica de las características bacterianas debe ser tomada en cuenta al momento de realizar una fiable identificación, por lo que será necesario el uso de métodos complementarios.

2.2.3. Técnicas moleculares para la caracterización e identificación de bacterias fitopatógenas.

En cuanto al análisis molecular, las técnicas basadas en ácidos nucleicos han demostrado ser generalmente más sensibles, específicas y confiables para la detección, identificación y cuantificación de patógenos bacterianos de plantas que otros métodos. Los organismos estrechamente relacionados comparten una mayor similitud de nucleótidos que los que están alejados. Una secuencia de nucleótidos altamente específica en el genoma bacteriano puede ser identificada. Los iniciadores basados en las secuencias de los nucleótidos presentes en el fragmento de DNA se pueden emplear para la hibridación o amplificación de una banda específica.

Las tecnologías para la detección molecular de los patógenos de plantas han sido objeto de dos avances importantes durante los últimos años. El primero fue la llegada de la detección basada en anticuerpos (ELISA) y luego se iniciaron las tecnologías basadas en el DNA, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ambas técnicas han sido utilizadas en la identificación de

las patologías de las plantas, pero estos métodos no han reemplazado por completo el cultivo tradicional y las pruebas fenotípicas (Álvarez, 2000).

Las pruebas de diagnóstico basadas en las características de los ácidos nucleicos genómicos de los patógenos bacterianos pueden proporcionar resultados más fiables, que no son dependientes de la expresión del síntoma ni de la influencia de las condiciones ambientales. Además, comparativamente son más precisos, sensibles y específicos, ya que se necesitan cantidades muy pequeñas de la población de patógenos que pueden estar por debajo de los niveles detectables con otros métodos de diagnóstico. Se han utilizado extensivamente pruebas basadas en la hibridación o amplificación de los fragmentos de DNA del patógeno bacteriano, para la detección específica y la identificación de la subespecie, patovares o cepas de la especie bacteriana bajo investigación. Sin embargo, las limitaciones de los métodos basados en ácidos nucleicos como el requisito de DNA de alta calidad, la presencia de inhibidores de amplificación por PCR en las plantas que pueden afectar adversamente los resultados y la incapacidad para distinguir las células bacterianas vivas y muertas, debe tenerse en cuenta al interpretar los resultados obtenidos con estas técnicas (Aldaghi y col., 2009).

Diagnóstico bacteriano mediante amplificación por PCR usando iniciadores universales

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (por sus siglas en inglés), es una técnica descrita por Kary Mullis en 1990, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo, en teoría, de una copia única de ese fragmento.

El uso de marcadores universales o las cartillas de oligonucleótidos de grupos específicos basados en las secuencias de genes conservados del rRNA 16S, permiten la amplificación de secuencias del rDNA 16S de cepas pertenecientes a un amplio grupo de bacterias y de diversas cepas dentro de un grupo determinado. El análisis de la PCR amplificando las secuencias de los genes conservados o fragmentos de DNA específicos, ofrece un método simple y rápido para clasificación de fitopatógenos (Lee y col., 2009).

Para la extracción de los ácidos nucleicos, la mayoría de los métodos conforman extracciones con fenol-cloroformo o cloroformo-alcohol isoamílico y finalmente la precipitación se produce utilizando una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) que, o bien es baja en sal o contiene dodecil sulfato de sodio (SDS) y alta de sal para eliminar la contaminación de proteínas, hidratos, polisacáridos y otros desechos (Garber y Yoder, 1983; Kim y col. 2009, Moller y col. 1992). Estos métodos pueden ser utilizados en los laboratorios bien equipados y en desarrollo que cuentan con las instalaciones para el manejo de los fenoles y cloroformo, compuestos tóxicos y peligrosos (Moller y col. 1992; Raina y Chandlee, 1996).

Una vez extraído el DNA, y calculada su concentración y pureza, es frecuente el establecimiento de una PCR para la amplificación del gen ribosomal 16S, altamente conservado en procariotas y que nos permite comprobar la calidad del extracto de DNA, la ausencia de inhibidores para la reacción de PCR y la naturaleza procariota del DNA extraído (Lu y col., 2000). El fragmento amplificado por estos iniciadores universales ha sido secuenciado para muchas bacterias patógenas y su secuencia depositada en los bancos de datos; razón

por la cual esta estrategia también es usada para la identificación de bacterias patógenas.

Diagnóstico bacteriano mediante amplificación por PCR utilizando iniciadores específicos.

El éxito de la detección de los patógenos utilizando técnicas de PCR depende de la especificidad de los iniciadores. Álvarez y colaboradores en el 2011 realizaron la identificación de la bacteria *Xanthomonas albilineans* empleando el protocolo descrito por Pan y colaboradores (1997), utilizando los iniciadores ALA4 y L1, combinación que genera un fragmento de 360 pb identificando al organismo como *X. albilineans*. El iniciador L1 fue desarrollado por Jensen y colaboradores (1993) para amplificar la región espaciadora 16S-23S de 300 especies bacterianas, mientras que el iniciador ALA4 fue desarrollado por Honeycutt y col. (1995) específico para *X. albilineans*, localizado en la región espaciadora intergénica transcrita (ITS) del DNA ribosomal 16S-23S. Posteriormente, Álvarez (2014) utilizó iniciadores más específicos aún: PGBL1 y PGBL2 diseñados por Pan y col. (1999), altamente específicos para el diagnóstico de la bacteria, observando un fragmento de 288 pb.

También se han diseñado iniciadores específicos para la identificación de los diferentes patovares de *X. campestris*: Zaccardelli y col. (2007) describen un protocolo para la identificación de *X. campestris* pv *campestris* por amplificación por PCR de fragmentos del gen asociado a la patogenicidad *hrcC*. Obtuvieron un fragmento de 519 bp en una colección de 46 aislados de *X. campestris* pv *campestris*, con la excepción de dos aislados a partir de

rábano. No se obtuvieron amplicones de los cultivos puros de 39 bacterias patógenas relacionadas.

Birch y col. (1997) usaron RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para diferenciar entre aislados de *X. campestris* pv. *phaseoli* y *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. Con el primer OP-G11, obtuvieron una banda simple, intensa para todos los aislados de *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, mientras que múltiples productos de amplificación de varios tamaños fueron generados para los DNAs de *X. campestris* pv. *phaseoli*. La inequívoca naturaleza del método RAPD-PCR fue demostrada cuando el aislado 408, clasificado inicialmente como *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, no produjo la banda de 820 bp típica de los aislados de *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* y además falló en producir el pigmento marrón característico por lo que fue re-clasificado como *X. campestris* pv. *phaseoli*.

Park y colaboradores (2006) describen un ensayo de PCR para detectar la mancha bacteriana causada por *X. campestris* pv. *vesicatoria* en pimiento y tomate. Desarrollaron un set de iniciadores para amplificar el fragmento de un gen de la familia *rhs* homólogo a *rhsA*, involucrado en la biogénesis de la envoltura celular. Se produjo sólo un producto de 517 bp con *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Del mismo modo, Chittaranjan y De Boer (1997), realizaron estudios donde produjeron anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para *X. hortorum* pv. *pelargonii* para comparar la detección del patógeno mediante ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA) y por inmuno fluorescencia.

Amplificación de secuencias repetidas ERIC-PCR, BOX-PCR y REP-PCR

Estos métodos basados en marcadores moleculares son la elección de los patólogos de plantas que están caracterizando los patógenos a fin de entender o aclarar los principios o factores subyacentes de la evolución molecular, la genética de poblaciones, las interacciones planta-patógeno, o la evolución de patógenos a nivel molecular (Milgroom y Fry, 1997).

Además del uso de la PCR con iniciadores universales y específicos para la identificación de bacterias, recientemente se ha desarrollado la técnica de rep-PCR que ha sido utilizada exitosamente para evaluar la diversidad en un gran número de microorganismos. Esta técnica se basa en la presencia de secuencias repetidas en el DNA, dispersas en el genoma bacteriano (Lopes y col., 2001) y permite distinguir cepas relacionadas, conocer las relaciones filogenéticas existentes entre las cepas y estudiar la diversidad de la bacteria en diferentes ecosistemas (Versalovic y col., 1991). Utilizando cebadores específicos a los elementos altamente conservados y repetitivos, como la secuencia palindrómica extragénica repetitiva (REP) de 35-40 pb, una secuencia consenso intergénica repetitiva de enterobacterias (ERIC) 124–127 y un elemento BOX de 154 pb, los cuales han sido utilizados con éxito para caracterizar un gran número de bacterias y diferenciar relaciones estrechas entre otras cepas de bacterias (Louws y col. 1994; Versalovic y col., 1994).

Se piensa que la organización del genoma está formada por la selección y así la dispersión de las secuencias REP, ERIC y BOX, que pueden ser un indicativo de la estructura y evolución del genoma bacteriano (Lupski y

Weinstock, 1992). Con base en este conocimiento sobre la naturaleza clonal y la dinámica poblacional de la bacteria patogénica, se da como hipótesis que si cada línea especializada evolutiva o patovar, o si el patógeno tienen una única distribución o arreglo de secuencias repetitivas a lo largo del genoma, entonces se pueden generar huellas digitales del genoma que lo ponen en correlación con un linaje específico o patovar (Massomo y col. 2003).

Los métodos de toma de huellas digitales genómicas y basados en secuencias repetitivas, revelan suficientes relaciones filogenéticas y genotípicas de los organismos (Versalovic y col. 1994). Éstas se pueden utilizar como técnicas de detección rápida, y a su vez altamente discriminatorias, para determinar la diversidad taxonómica y la estructura filogenética de las poblaciones bacterianas. La existencia de cepas únicas, de origen geográfico específico de *X. campestris* pv. *campestris* ha sido previamente informada y sugiere la existencia de variantes patogénicas de dicha bacteria (Vicente y col. 2001; Taylor y col. 2002).

Lema y colaboradores (2012) aislaron e identificaron las razas de *X. campestris* pv. *campestris* del noroeste de España usando un medio semiselectivo y pruebas de patogenicidad. Determinaron la existencia de razas de *X. campestris* pv. *campestris* en esta área por series diferenciales en *Brassica* spp., y evaluaron el uso de REP-PCR para diferenciar entre las 9 razas existentes. Recuperaron 75 aislados y los identificaron como *X. campestris* pv. *campestris*. Las pruebas de tipo de raza arrojaron 7 razas del patógeno. Observaron que una de esas 7 razas era más frecuente en *Brassica oleracea* y otra en *Brassica rapa* por lo que el mejoramiento debería estar enfocado en obtener variedades resistentes de esas dos especies vegetales. El análisis

REP-PCR no resultó adecuado para discriminar entre las razas, por lo que debe usarse una serie diferencial de genotipos de *Brassica* spp. u otra aproximación alternativa.

Xanthomonas es uno de los pocos géneros bacterianos en los que un gran conjunto de datos de hibridación DNA-DNA, RFLP y rep-PCR están disponibles (Egel y col. 1991; Vauterin y col. 1995) y se han empleado para la resolución taxonómica del grupo. Además, la disponibilidad de más de diez genomas dentro del género (Ryan y col. 2011), ha permitido estudios recientes de la genómica comparativa y la evolución del genoma (Blom y col., 2009). Recientemente, se ha aplicado un enfoque filogenómico para resolver las relaciones filogenéticas del género (Rodríguez y col., 2012).

Basándonos en lo antes expuesto, en este trabajo se pretende caracterizar a nivel morfológico, bioquímico y molecular 5 aislados de *Xanthomonas* sp. adquiridos en el CVCM y una bacteria aislada de una planta de geranio con síntomas de bacteriosis.

2. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General: Caracterizar a nivel morfológico, bioquímico y molecular 6 aislados venezolanos de *Xanthomonas* sp.

3.2 Objetivos Específicos:

- Aislar y caracterizar mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares una bacteria patógena de una planta de *Pelargonium* sp. (Geranio) con sintomatología de bacteriosis, causada hipotéticamente por *X. hortorum* pv. *pelargonii*.
- Caracterizar a nivel morfológico, bioquímico y molecular las cepas de *Xanthomonas* sp. aisladas y adquiridas en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM).
- Comparar la caracterización realizada con la identificación reportada en las cepas adquiridas en el CVCM.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de geranio con sintomatología de bacteriosis en las hojas para el aislamiento de la bacteria. También se emplearon plantas de geranio sanas, para la confirmación de los postulados de Koch.

4.2 Medios de cultivo para la identificación de la bacteria

Se aislaron las cepas bacterianas en diferentes medios de cultivos para garantizar el suministro de los nutrientes necesarios para su óptimo crecimiento (Schaad y col., 2001): Los medios empleados para el aislamiento y preservación de los cultivos puros de *Xanthomonas* fueron los siguientes:

1.- Medio nutritivo: agar **LB** (Luria Bertani). Este medio no hace crecer preferentemente un tipo de bacteria sobre otra, al ser altamente nutritivo es recomendado para la preservación de microorganismos (Schaad y col., 2001). Está compuesto por 5 g.L⁻¹ de extracto de levadura, 10 g.L⁻¹ de cloruro de sodio, 10 g.L⁻¹ de triptona y 15 g.L⁻¹ de agar.

2.- Medio diferencial: agar **YDC** (Yeast extract-dextrose-carbonate) ampliamente recomendado para la diferenciación de las colonias y para observar la producción o no de exopolisacáridos de las especies del género *Xanthomonas* (Schaad y col., 2001). Está compuesto por 10 g.L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g.L⁻¹ de sacarosa, 20 g.L⁻¹ de carbonato de calcio y 15 g.L⁻¹ de agar.

3.- Medio semi-selectivo: agar **D5** selectivo para bacterias del género *Xanthomonas*, desarrollado por Kado y Heskett (1970), perteneciente a la serie

designada como serie-D diseñada además para el cultivo de los géneros de bacterias fitopatógenas *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Corinebacterium*. Está compuesto por 10 g.L⁻¹ de celobiosa, 3 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,3 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ de NH₄Cl y 15 g.L⁻¹ de agar.

4.3 Cepas bacterianas. Aislamiento de *X. hortorum* pv. *pelargonii*

El aislamiento y purificación de la bacteria a partir de hojas de geranio, se realizó siguiendo la metodología planteada por Alvez (2014); pero a partir de tejido foliar de plantas de *Pelargonium* sp con sintomatología típica de la enfermedad. Las hojas se desinfectaron con NaOCl diluido (10% v/v de producto comercial), durante dos minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril dos veces durante 30 segundos, luego se maceraron utilizando 3 mL de agua destilada estéril. Se inoculó 0,1 mL del macerado en caldo de medio semi-selectivo D5 por tres días, posteriormente fue inoculado en placas de agar D5, por el método de agotamiento para obtener colonias aisladas luego de 24-48 horas de incubación a temperatura ambiente (Schaad y col., 2001). De allí se obtuvo la cepa LMV14, de acuerdo a la nomenclatura establecida en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (LMV); que fue sometida en esta investigación a pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares para su identificación como *X. hortorum* pv. *pelargonii*. Posteriormente el patógeno se cultivó en medio diferencial YDC para observar la coloración y la presencia o no de exopolisacáridos, y finalmente se cultivó en medio nutritivo LB para la realización de las pruebas bioquímicas.

También se estudiaron en este trabajo cepas del género *Xanthomonas* adquiridas en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) cuyas características se describen a continuación: Las cepas CVCM 2063 y 2065 identificadas como *X. campestris*, provenientes del Laboratorio de Micología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), cultivadas en medio LB a 26°C por 24 horas por Gioconda San Blas (IVIC); la cepa CVCM 2059 identificada como *X. campestris* pv. *phaseoli*, proveniente del Laboratorio de Micología, del IVIC, aislada de frijol, cultivada en medio LB y en Agar Nutritivo (AN) a 30°C durante 24 horas, por Nancy Contreras; la cepa CVCM 2093 identificada como *X. campestris* pv. *vesicatoria*, suministrada por la Cátedra de Bacterias Fitopatógenas, Postgrado de Agronomía UCLA, aislada de pimentón y cultivada en medio LB y AN a 30°C por 24 horas por Nancy Contreras. Por otro lado, se emplearon como controles el aislado LMV08, identificado como *X. albilineans* por Alvez (2014). Este aislado fue obtenido a partir de la variedad de caña de azúcar CC8593. Además, como control negativo, se usó la cepa CVCM 2038 identificada como *Escherichia coli*, aislada de muestra de orina de micción directa proveniente de pacientes ambulatorios, atendidos en el Centro Médico Docente La Trinidad (CMDLT), cultivada en medio LB a 37°C durante 18 horas por Angiolillo (Lab. Biología de Plásmidos, IBE).

4.4 Identificación morfológica y características culturales

4.4.1 Características de las colonias

Se observó la forma, color, opacidad, superficie, bordes, pigmento y consistencia de las colonias puras, en agar extracto de levadura, dextrosa, carbonato de calcio (YDC) y en agar LB (Díaz y Ferrán, 2003).

4.4.2 Tinción de Gram

Según Rodríguez y col. (2005), existen variaciones de esta técnica, pero en términos generales, la tinción de Gram involucra los siguientes pasos:

1. Tinción inicial: las células se tiñen con cristal violeta, el cual es el colorante primario.
2. Mordente: se adiciona yoduro (lugol) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro. En este punto todas las células continúan de color morado.
3. Decoloración: Se adiciona un solvente no polar, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram-negativas. De esta manera las bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras. Este es el paso crítico de la tinción, pues si se exagera, decolora las Gram positivas y si se hace muy débil no decolora a las Gram-negativas.
4. Contra-tinción: se vuelve a teñir con safranina o fucsina, de manera que las bacterias Gram-negativas, que habían sido decoloradas, se tiñen de rosado fucsia según el colorante empleado; en tanto, las bacterias Gram positivas no

se afectan con la contra-tinción y permanecen moradas debido a lo intenso de esta coloración.

4.4.3 Motilidad

Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos (bacterias en forma de bastoncillos); las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con la especie bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces, las bacterias con motilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles. Los organismos no móviles carecen de flagelos (Mc Faddin, 2003).

Con un asa de inoculación se le coloca a un cubreobjetos un poco de muestra y se le agrega una gota de agua destilada. Se coloca sobre un portaobjetos y se observa al microscopio. Podremos observar si las bacterias tienen movimientos rectilíneos o curvos y en todas direcciones.

4.5 Caracterización bioquímica

4.5.1 Hidrólisis de esculina

La esculina es un glucósido, un derivado acetal de un monosacárido simple. Cuando una sustancia que no es un hidrato de carbono se une a un azúcar por una unión acetal, el acetal resultante se denomina glucósido y la porción no glúcida se denomina aglucona; la porción esteroide se une a un residuo carbono del azúcar. Los acetales se hidrolizan con facilidad por acción de los glúcidos; la base de la prueba de esculina es la hidrólisis en la ligadura β de la

esculina a esculetina por una β -glucosidasa constitutiva (la enzima esculinasa), la cual libera la molécula de glucosa. La esculina, un derivado de la cumarina (6- β -glucósido-7-hidroxycumarina), es hidrolizada a 6,7-hidroxycumarina y glucosa (Mc Faddin, 2003). Para el desarrollo de esta prueba se crecerán las bacterias en un medio complejo que contiene 0,01 % de esculina y un 0,05 de citrato férrico. Se evidenció la hidrólisis de esculina por la aparición de un precipitado negro en el medio de cultivo.

4.5.2 Oxidación-Fermentación de azúcares en medio OF.

Es un medio de cultivo que al ser suplementado con hidratos de carbono, se usa para determinar el metabolismo oxidativo-fermentativo de las bacterias Gram negativas. También, permite determinar movilidad y producción de gas. Cuando un microorganismo es inoculado en 2 tubos del medio O.F. conteniendo el mismo hidrato de carbono, y uno de los 2 tubos es sellado con parafina, se puede diferenciar bien el metabolismo oxidativo o fermentativo, así como la utilización de un hidrato de carbono por la bacteria en estudio. Contiene fosfato dipotásico que agrega capacidad reguladora, cloruro de sodio que mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH que vira al color amarillo en medio ácido. El contenido de agar da la propiedad de ser un medio semisólido, y permite determinar la movilidad y la distribución de los productos ácidos en el medio de cultivo. La glucosa es el hidrato de carbono más frecuente que se agrega al medio basal O.F, pero también pueden agregarse otros azúcares como lactosa, sacarosa, maltosa, manitol o xilosa, entre otros (Mc Faddin, 2003). Para la realización de esta prueba, se añadió la fuente de carbono (glucosa, lactosa; estériles preparadas en stocks al 10%), 0,5 mL por tubo, quedando a una concentración final de 1

%. Por cada muestra se inocularon 2 tubos de OF-glucosa, 2 de OF-lactosa y 2 de OF-O (OF sin carbohidrato). Previamente a inocular los tubos se hierven a baño de María por 8 minutos para extraerles el O₂. Se dejaron enfriar antes de inocular. Se realiza con dos condiciones: 1: tubo aeróbico: se inocula, se agita y se incuba a 37°C por 24 horas o más. 2: tubo anaeróbico: se inocula, se agita, se añade 1 mL de parafina líquida estéril que cubra la superficie del medio y se incuba a 37°C por 24 horas o más.

4.5.3 Actividad catalasa

El principio de la prueba es determinar la presencia de la enzima catalasa. La catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Por lo general, los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen también de la enzima catalasa y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. La mayoría de las bacterias anaerobias poseen la enzima peroxidasa en lugar de la catalasa. Sin embargo la prueba de la catalasa no es específica y puede interferir en la acción de las enzimas peroxidases (Mc Faddin, 2003). La actividad catalasa se detectó añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre las colonias en un portaobjetos. La producción de burbujas indica la presencia del enzima (Schaad y col, 2001).

4.5.4 Actividad ureasa

El sustrato urea, una diamida del ácido carbónico, a menudo se designa como una carbamida. Todas las amidas son hidrolizadas con facilidad. La urea es hidrolizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución, la urea se hidroliza a carbonato de amonio como

producto final. La ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Las enzimas bacterianas se clasifican como constitutivas o adaptativas. Una enzima adaptativa o inducida se produce sólo cuando su sustrato específico está presente. La ureasa es considerada constitutiva debido a que es sintetizada por ciertas bacterias sin tomar en consideración la presencia o ausencia de su sustrato, la urea (Mc Faddin, 2003). Se cultiva el microorganismo en agar urea. Ésta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir el enzima ureasa. Esta degradación produce amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa.

4.5.5 Utilización de Citrato

La energía puede ser proporcionada a algunas bacterias en ausencia de fermentación o producción de ácido lácticos por la utilización del citrato como única fuente de carbono. En condiciones normales, el metabolismo del citrato involucra una condensación de acetilo con coenzima A y oxalacetato para ingresar al ciclo de Krebs. El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido por la vía del ácido tricarboxílico o el camino metabólico de la fermentación del citrato. Los microorganismos que poseen un mecanismo de transporte o permeasa permiten que el citrato penetre al interior de la célula. En las bacterias, el desdoblamiento del citrato involucra un sistema enzimático sin la participación de la coenzima A, la citratasa (citrato oxalacetato liasa) o la citrato desmolasa. La citratasa requiere un catión divalente para su actividad, magnesio o manganeso. Un microorganismo que puede utilizar el citrato como su única fuente de carbono también utiliza las sales de amonio como su única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio son degradadas a amoníaco (NH_3),

lo cual aumenta la alcalinidad. Las bacterias extraen el nitrógeno de las sales de amonio con producción de amoníaco, lo que conduce a la alcalinización del medio y la conversión de NH_3^{+2} a hidróxido de amonio (Mc Faddin, 2003). Se inocula el medio con la bacteria y se incuba a 30 °C por 24 horas o hasta 7 días a temperatura ambiente, el crecimiento de la bacteria conduce a una coloración azul del medio denota la prueba positiva.

4.5.6 Licuefacción de gelatina

La gelatina, una proteína derivada del colágeno animal, se incorpora a diferentes medios de cultivo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas), detectadas por digestión o licuefacción de la gelatina. Las enzimas capaces de producir gelatinosis se denominan gelatinasas. Las enzimas proteolíticas a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos. La gelatina es hidrolizada por las gelatinasas en sus aminoácidos constitutivos, con pérdida de sus características gelificantes (Mc Faddin, 2003). El medio consiste en caldo nutritivo suplementado con gelatina al 12%. Se inocula la muestra y se incuba a temperatura ambiente por una semana. La prueba positiva queda indicada por la licuefacción de la gelatina una vez incubado el tubo a 4°C por 30-40 minutos.

4.5.7 Producción de Indol

El principio de esta prueba es determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el Indol de la molécula triptófano. El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: Indol, escatol (metilindol) e indolacético. Diversas enzimas

intracelulares que intervienen en este proceso reciben el nombre colectivo de “tripotofanasa”, lo que indica un sistema completo de enzimas vinculadas con la producción de Indol (Mc Faddin, 2003).

Según Mc Faddin (2003) la interpretación de la prueba del Indol es la siguiente:

- a) Prueba positiva: un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica.
- b) Prueba negativa: no se produce color en la capa alcohólica, toma el color del reactivo de Kovacs (amarillo).
- c) Variable: un color anaranjado en la superficie del medio debido al desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser precursor de la formación de Indol.

4.5.8 Fermentación de carbohidratos

El agar con hierro de Kligler (KIA) contiene 20 g.L^{-1} de digeridos de proteínas como fuente de aminoácidos, 6 g.L^{-1} de sales esenciales para el crecimiento como el sulfato ferroso a una concentración de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de rojo fenol como indicador de pH, 15 g.L^{-1} de agar y dos hidratos de carbono: 1% de lactosa y 0,1% de glucosa. Algunos microorganismos pueden fermentar ambos hidratos de carbono, otros fermentan solo la glucosa; incluso otros no pueden fermentar ni la glucosa ni la lactosa. La fermentación de los hidratos de carbono puede ocurrir con producción de gas o sin ella. La fermentación tiene lugar tanto en aerobiosis (en el pico de flauta) como en anaerobiosis (en el fondo). En el pico de la flauta, el monosacárido glucosa es catabolizado inicialmente por la vía metabólica anaerobia Embden-Meyerhof-Parna, usada por aerobios y anaerobios para producir el intermediario clave ácido pirúvico. El

ácido pirúvico es degradado luego a través del ciclo de Krebs por aerobios o anaerobios facultativos para rendir CO₂, H₂O y energía. A los fines de identificación, todos los tubos de KIA deben interpretarse en lo que respecta a la fermentación de los hidratos de carbono después de 18-24 h de incubación. Las interpretaciones realizadas antes o después pueden dar patrones de fermentación no válidos que producirán errores al agrupar los microorganismos (Mc Faddin, 2003).

Por consiguiente, una reacción KIA puede interpretarse de cuatro maneras, según las bacterias a probar:

1. Alcalino/ácido: sólo la glucosa es degradada.
2. Ácido/ácido: glucosa y lactosa degradadas.
3. Alcalino/alcalino: ni la glucosa ni la lactosa son degradadas; uso de peptonas.
4. Alcalino/sin cambio: ni la glucosa ni la lactosa son degradadas; uso de peptonas.

Se inocularon los tubos inicialmente por picadura en el fondo del tubo (de 3 a 5 mm) y posteriormente por estría en la superficie. Se incubaron los tubos con las tapas flojas a 35- 37°C durante 18 a 48 horas y luego se observaron los tubos para determinar producción de ácido en el fondo y la superficie, así como la producción de gas y sulfuro de hidrógeno.

4.5.9 Reducción de nitratos a nitritos

La reducción de nitrato a nitrito y a nitrógeno gaseoso por lo común se produce en condiciones de anaerobiosis, en las cuales un microorganismo produce

su oxígeno del nitrato. El oxígeno actúa como un aceptor de hidrógeno; es decir, el protón y el aceptor final de electrones. La mayoría de las bacterias aerobias son anaerobias facultativas y sólo pueden reducir los nitratos en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaerobia es un proceso de oxidación en el que las sustancias inorgánicas (sobre todo nitrato y sulfato, rara vez carbonato) producen oxígeno para actuar como un aceptor de electrones a fin de proporcionar energía. En la reducción de nitratos, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas. El nitrato actúa como último oxidante en los sistemas de citocromos. La reducción de nitratos características de una especie particular es más o menos constante (Mc Faddin, 2003). Para la realización de la prueba de reducción de nitrato a nitrito: Se mezclan los componentes con calor hasta la completa disolución del agar. Se distribuye en tubos de ensayo, 5 mL/tubo. Se esteriliza 15 min, 15 lb, 121°C. Se inocula la muestra y se incuba a 37° por 24 horas o más. Se añade al tubo con crecimiento unas gotas de ácido sulfanílico (0,8 g de ácido sulfanílico disuelto en 1000mL de ácido acético 5N), y unas gotas de α -naftilamina (5,0 g de α -naftilamina disueltos en 1000 mL de ácido acético 5N).

4.5.10 Actividad citocromo oxidasa

Es una prueba que detecta la presencia de la enzima citocromo oxidasa, la cual en presencia de oxígeno atmosférico, oxida el reactivo fenilendiamina oxidasa para formar un compuesto coloreado: indofenol. Se utiliza como reactivo p-fenilendiamina al 1% en agua. Es positiva cuando aparece un color azul en la zona de depósito de la bacteria (Díaz y Ferrán, 2003). Para la realización de esta prueba se Coloca un trozo de papel de filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de Petri. Se Agregaron 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el

centro del papel, se extendió con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado. La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.

4.5.11 Producción de amilasas

El principio de esta prueba es determinar la capacidad de un organismo de hidrolizar el almidón por medios enzimáticos y a su vez, probar la desaparición del almidón por el uso de un reactivo con yodo. Se inoculó la muestra con ayuda del asa de platino estéril, haciendo sobre la superficie del agar una raya de cultivo. Se incubó a 37°C por 24-48 h. Finalmente se reveló si hubo hidrólisis de almidón añadiendo unas gotas de lugol.

4.5.12 Crecimiento en agar Mac Conkey

El agar MacConkey es un medio empleado frecuentemente para separar las bacterias fermentadoras de lactosa de aquellas que no la fermentan. Contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben a bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas que no pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Contiene lactosa, único carbohidrato y rojo neutro como indicador de pH, cuyo ámbito de viraje está entre pH 8,0 (amarillo) y pH 6,8 (rojo). Las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias que varían en el tono rojo: rojas, rojo fucsia o incoloro con el centro rosado, depende de la cantidad de ácido producido y las no fermentadoras de lactosa producen colonias incoloras. En este caso, el medio adquiere un ligero tono amarillo, pues las bacterias utilizan las peptonas y alcalinizan el medio de cultivo (Rodríguez y col. 2005). Para la realización de la prueba de crecimiento en agar MacConkey: Se inoculó la bacteria la placa por agotamiento. Se incubaron las placas a $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

4.6 Caracterización molecular

4.6.1 Extracción del DNA

Se llevó a cabo según el método reportado por Gomes y col., (2000). Se aisló una colonia sembrada en placa de agar LB. Se cultivó en 5 ml de caldo nutritivo con 10% v/v de glicerol por 72 horas a 28 °C. Se transfirió la suspensión bacteriana a un tubo eppendorf de 1.5 µL y se centrifugó a 13000 xg por 5 minutos. El sedimento o pellet se resuspendió en 200 µL de Tris 0.1 M y se le añadieron 200 µL de solución de lisis (NaOH 0.2 N y SDS 1%) y 100 ML de proteinasa K 1 mg/L. Se dejó actuar durante 1 hora a 55 °C. La mezcla se desproteinizó con 700 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v), se homogenizó y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 13000 x g. Luego de esta centrifugación se observan tres fases y se toma la fase acuosa, la cual se trasvasó a otro tubo. Se hizo precipitar el DNA con 700 µL de etanol frío al 95%. Seguidamente se centrifugó la mezcla a 13000 x g durante 5 minutos, luego se lavó con 700 µL de etanol frío al 70% y se centrifugó a 13000 x g durante 5 minutos. Finalmente se descarta el sobrenadante y el precipitado de DNA se secó y se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril.

4.6.2 Evaluación de la cantidad y calidad del DNA extraído

La evaluación de la concentración y la pureza del DNA extraído se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro Genesys 10 Bio usando la relación 260/280 D.O., según Sambrook y Russell, (2001). Esta evaluación se complementó con la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del DNA extraído.

Para estimar la concentración y pureza, se diluyen 2,5 µL de las muestras de DNA extraído, en 497,5 µL de agua destilada en una cubeta de cuarzo, y se mide la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. Previamente blanqueado el equipo, se toma nota de los valores de cada densidad óptica y de la relación 260/280, la cual indica la pureza de la muestra en cuanto al contenido de material genético libre de proteínas y otros compuestos se refiere.

Para calcular la concentración de ácidos nucleicos se empleó la siguiente ecuación:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = \text{Abs (260 nm)} \times \text{F.D.} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Para observar la integridad del DNA extraído, se toma una alícuota de la muestra y se mezcla con una alícuota de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30% en H₂O) y se coloca en un bolsillo del gel de agarosa al 0,8%. Se aplica corriente (80 V) hasta que el primer colorante alcance el final del gel. Se coloca el gel en una solución 10 mg/mL de bromuro de etidio durante 10 minutos y luego en agua por 20 minutos. El gel se analiza, posteriormente, en un Transiluminador (BioRad) con el programa Multi-Analyst (Luque y Herraéz, 2000).

4.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilización de iniciadores universales para la realización de PCR mediante amplificación del gen ribosomal 16S.

Se realizó la amplificación por PCR del fragmento 16S del gen ribosomal, de una región conservada en todas las bacterias utilizando los iniciadores universales diseñados por Lu y colaboradores (2000), U1 y U2. Las secuencias

del iniciador U1 es 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' correspondiente a los nucleótidos de 518 a 537 del gen 16S del rRNA de *E. coli*, y del iniciador U2 es 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3' correspondiente a los nucleótidos de 1513 a 1491 del mismo gen (Lu y col., 2000). Esta amplificación se llevó a cabo con un volumen final de 25 µL conteniendo: 1X de amortiguador de reacción, 0.2 mM de dNTP's, 25 ng de DNA, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2µM de cada iniciador y 1U de taq polimerasa.

Las condiciones de amplificación se fijaron según el protocolo planteado por los mismos autores, el cual consta de los siguientes ciclos: 1 ciclo de desnaturalización de la molécula de DNA durante 5 min. a 94°C; 35 ciclos que constan de la desnaturalización durante 1 min a 94°C, la hibridación de los iniciadores durante 1min a 48°C y enlongación durante 2min a 72°C. Con una extensión final de los amplificadas durante 10 min a 72°C.

Las amplificaciones de DNA se realizaron en un termociclador automatizado (GeneAmp PCR System). Posteriormente, una alícuota de 10 µL de cada una de las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 1.5% a 80 V y el gel fue tratado posteriormente con una solución de bromuro de etidio y se fotografió en un Transiluminador con luz UV. Se compararon luego los patrones de bandas de las muestras esperando obtener una banda de 996 pb y otra banda inespecífica de 100 pb (Lu y col., 2000). Empleando como control negativo un tubo al cual se le sustituyó el DNA por agua destilada estéril pero que contenía todos los demás componentes de la reacción.

Identificación molecular de los aislados mediante PCR con iniciadores específicos

Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii

Con el objetivo de detectar la presencia de DNA diferencial en las diferentes cepas de *Xanthomonas*, se realizó la amplificación por PCR del fragmento de la región ITS de las cepas por medio de cebadores específicos. Para *X. hortorum* pv. *pelargonii*, ésta amplificación se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de Manulis y col. (1994) y Chittaranjan y de Boer (1997); usando los iniciadores P1 y P2 (5'-GAGTGTCCAGTGGCAAGC-3' y 5'-GTTGCTGCCTCTTCCTGC-3') con un volumen final de 25 µL conteniendo: 1mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada primer, 1 U de taq polimerasa, 0,2 Mm de dNTP's, 1X de Buffer de reacción y 50 ng de DNA.

Las condiciones de amplificación se fijaron según el protocolo planteado por los mismos autores, el cual consta de los siguientes ciclos: con un ciclo inicial de 5 minutos a 94 °C, seguidos por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C, 2 minutos a 72 °C, con una extensión final de 3 minutos a 72 °C. Las amplificaciones de DNA se realizaron en un termociclador automatizado (GeneAmp PCR System).

Posteriormente, una alícuota de 10 µL de cada una de las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 1.5% a 80 V y el gel fue tratado posteriormente con una solución de bromuro de etidio y se fotografió en un Transiluminador con luz UV. Se empleó como control negativo de la reacción, una muestra donde se sustituye el extracto de DNA con un volumen igual de

agua estéril. Se compararon luego los patrones de bandas de las muestras esperando obtener una banda de 1,2 kb según Manulis y col., (1994).

Xanthomonas albilineans

Para diagnosticar si alguno de los aislados del CVCM correspondía a *X. albilineans* se realizó la amplificación del DNA utilizando los iniciadores desarrollados por Pan y colaboradores (1999) PGBL1: 5`- CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG -3` y PGBL2: 5`- GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC -3`, los cuales amplifican la región espaciadora transcrita intergénica (ITS) ubicada entre el 16S y el 23S del RNA ribosomal, y generan una única banda de 288 pb. Empleando como control positivo la cepa LMV08 identificada como *X. albilineans* en el LMV por la Dra. Beatriz Alvez y como control negativo de la reacción un tubo al cual se le sustituyó el DNA por agua destilada estéril pero que contenía todos los demás componentes de la reacción.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL conteniendo: 1X de Amortiguador de reacción, 2mM de MgCl₂, 0,2 Mm de dNTP's, 10 µM de cada iniciador, 1 U de taq polimerasa, y 10 ng de DNA. Las condiciones de amplificación son las descritas por Alvez (2014): 1 ciclo de desnaturalización de la molécula de DNA durante 5 min. a 95°C; 30 ciclos que constan de la desnaturalización durante 1 min a 95°C, la hibridación de los iniciadores durante 1min a 45°C y enlongación durante 30 seg a 72°C. Con una extensión final de los amplificados durante 2 min a 72°C.

Posteriormente, una alícuota de 10 µL de cada una de las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 1.8% a 80 V y el gel fue tratado posteriormente con una solución de bromuro de etidio y se fotografió en un

Transiluminador con luz UV. Se empleó como control negativo de la reacción, una muestra donde se sustituye el extracto de DNA con un volumen igual de agua estéril. Se compararon luego los patrones de bandas de las muestras esperando obtener una banda de 288 pb para aquellas cepas que sean *X. albilineans* (Pan y col., 1999).

Amplificación del DNA extraído mediante la utilización de regiones repetidas rep-PCR.

REP-PCR

Para la genotipificación, se realizó una amplificación con iniciadores que hibridan con regiones repetidas dispersas en el genoma bacteriano, se siguieron las condiciones de amplificación reportadas Tsygankova y colaboradores (2004), utilizando el iniciador KRPN2: 5'-CGCCIGGIGGAT-La mezcla de reacción de 25 µL conteniendo: 1 X de amortiguador de reacción·2.5 mM MgCl₂, 7.5 mM dNTP, 50 ng de DNA, 0,2 µM de iniciador y 1.25 U de taq polimerasa.

Se siguieron las mismas condiciones de amplificación descrita por los autores (Tsygankova y col., 2004): Un primer ciclo de 94°C durante 30 s, 30°C durante 30 s y 72°C durante 1 min 30 s. El segundo ciclo de 43 repeticiones de 94°C por 5 s, 30°C durante 30 s y 72°C durante 1 min 30 s. Con una extensión final de 72°C durante 7 min.

Posteriormente, una alícuota de 10 µL de cada una de las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 1.5% a 80 V y el gel fue tratado posteriormente con una solución de bromuro de etidio y se fotografió en un Transiluminador con luz UV. Se empleó como control negativo de la reacción,

una muestra donde se sustituye el extracto de DNA con un volumen igual de agua estéril.

ERIC y BOX-PCR

También se realizó ERIC-PCR y BOX-PCR, con iniciadores que hibridan con regiones repetidas dispersas en el genoma bacteriano, siguiendo las condiciones de amplificación reportadas por Lopes y col., (2001). Esta amplificación se llevó a cabo con un volumen final de 25 μ L conteniendo: 1X de Amortiguador de reacción, 0.2 mM de dNTP's, 25 ng de DNA, 3 mM de $MgCl_2$, 2 μ M de cada iniciador y 1 U de taq polimerasa.

Las condiciones de amplificación se fijaron según el protocolo planteado por los mismos autores, el cual consta de los siguientes ciclos: 1 ciclo de desnaturalización de la molécula de DNA durante 3 min. a 95°C; 35 ciclos que constan de la desnaturalización durante 1 min a 94°C, la hibridación de los iniciadores durante 1min a 50°C y enlongación durante 4min a 65°C. Con una extensión final de los amplificados durante 10 min a 65°C.

La observación de los fragmentos de DNA amplificados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,8%, esperándose productos de amplificación entre 0,18 a 2,68 Kb con los iniciadores ERIC1: 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C -3' y ERIC2: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -3, y con el iniciador los cuales hibridan con las regiones repetidas dispersas en el genoma bacteriano según lo reportado por López y colaboradores (2001). Del mismo modo se utilizó el iniciador BOXA1R: 5'- CTACGGCAAGGCGACCGCTGACG-3' en una reacción aparte

4.7 Demostración de los postulados de Koch

Como requisito básico, la patogenicidad del supuesto patógeno bacteriano aislado de las plantas enfermas, tiene que probarse y todos los pasos de los postulados de Koch tienen que cumplirse.

Se realizó la demostración de los postulados de Koch, de la bacteria aislada de geranio en condición de vivero, con plantas de *Pelargonium* sp. mantenidas en vivero y cultivadas *in vitro*.

Para el cultivo *in vitro* microesquejes se realizó una desinfección de las plantas provenientes de vivero, realizando un primer lavado con agua destilada estéril y jabón, seguido de un lavado con etanol durante 1 minuto, posteriormente se colocará el tejido en cloro al 20% + Tween 20 durante 35 minutos, luego en Phytón durante 5 minutos y finalmente se dejaron en un fungicida durante toda la noche. Por otro lado se realizó un medio cultivo sólido compuesto por las sales de Murashigue y Skoog (1962) completas, suplementado con 0,4 mg/l tiamina; 100 mg/l mio-inositol; 30 g/l sacarosa; 10ml/l vitaminas de Morel y 0,5 mg/l del regulador de crecimiento ácido 6-Benzilaminapurina (BA). A todos los medios se les ajustó el pH a 5.8. (Oropeza y col., 2006). El experimento se llevó a cabo en frascos de vidrio con 20 mL del medio, y en cada uno de estos se cultivaron 2 o 3 explantes previamente desinfectados, para un total de 12. Estos frascos se incubaron 4 días en oscuridad y luego transferidos al cuarto de cultivo a 25 °C bajo luz blanca fluorescente continua. (Alva, 2005).

Luego de 3 meses de cultivo, las vitroplantas de geranio libres de enfermedad, serían inoculadas con suspensiones del aislado LMV14 de *Xanthomonas hortorum. pelargonii* a 10^8 ufc ml⁻¹ de 3 días de cultivo. Pero debido a fuertes

problemas de contaminación, como se mostrará en los resultados, no se obtuvieron vitroplantas de tamaño adecuado para este ensayo, entonces, los postulados de Koch se realizaron con plantas de geranio sanas, sin síntomas de bacteriosis, mantenidas en vivero y previamente desinfectadas siguiendo la metodología de desinfección descrita anteriormente.

Para inocular las plantas de vivero, se realizó una pequeña incisión en el vástago inferior con un bisturí estéril y utilizando una jeringa estéril 0,5 ml de suspensión bacteriana a una concentración aproximada de 10^8 cel.mL⁻¹ se inyectó en la incisión (Rott y col., 2011, Garcés, 2011). Se realizaron inoculaciones en 20 hojas con 5 hojas de control sin inóculo. Los síntomas de la enfermedad se observaron diariamente después de la inoculación.

Finalmente se realizó un macerado del tejido infectado para la extracción y re-identificación del patógeno, mediante las pruebas bioquímicas y PCR con iniciadores específicos; de manera que se cumplieran a cabalidad los postulados de Koch.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico de las enfermedades bacterianas, está precedido de la identificación fiable del agente patógeno causante de la enfermedad. Para lograr exitosamente la caracterización e identificación de dichos microorganismos, el desarrollo de métodos moleculares en conjunto con los métodos microbiológicos tradicionales disponibles en la actualidad, representan la mejor aproximación para la correcta identificación de los patógenos de plantas y cultivos que ocasionan daños y grandes pérdidas económicas y disminuyen la cantidad de alimentos disponible para el consumo de la población venezolana.

5.1 Aislamiento del agente causal de bacteriosis en geranio

De la planta de geranio mantenida en el vivero del LMV con sintomatología de bacteriosis, se obtuvieron diversos aislados a partir del macerado de las hojas, los cuales fueron sembrados en placas de agar del medio semi-selectivo D5, donde se observaron diversos microorganismos bacterianos, encontrando colonias de diferentes formas y colores entre amarillas, blancas y beige; así como también algunos hongos. El crecimiento de esta elevada cantidad de contaminantes puede ser debido a las características del medio, al ser sólo limitado el crecimiento de microorganismos por la fuente de carbono disponible, que es la celobiosa (Kado y Heskett, 1970). De la misma manera, se debe considerar que el método de desinfección empleado no pudo ser muy agresivo para evitar la eliminación de la bacteria de interés, quedando así una gran cantidad de diversos microorganismos presentes en el macerado. Aquí es donde juega un papel importante conocer el fenotipo de la bacteria de interés

para la discriminación de ésta en relación a las demás colonias encontradas. De esta manera, se logró aislar la cepa LMV14 cuyas características morfológicas son: pigmentación amarilla, bordes enteros y superficie convexa. Este aislado fue incubado en medio nutritivo LB y sometido a las diversas pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares desarrolladas en este estudio, para lograr finalmente la identificación del mismo. En la figura 2 se muestran los síntomas de marchitez y clorosis observados en las hojas de la planta de geranio del cual se obtuvo el aislado bacteriano que fue denominado LMV14.



Figura 2: Hojas de geranio con sintomatología de clorosis, necrosis y marchitamiento.

5.2 Caracterización morfológica de todos los aislados bacterianos

La primera prueba que se debe llevar a cabo para conocer el grupo al cual pertenece determinada bacteria es la tinción Gram, ya que ésta divide a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, que indica diferencias fundamentales en la estructura y composición de la pared celular (Álvez, 2014). De esta manera, se realizó el procedimiento

descrito para la realización de la tinción Gram, luego de obtenidos cultivos puros y colonias aisladas tanto de las cepas obtenidas en el CVCM como de la cepa aislada de la planta de geranio, se sometieron a tinción de Gram, se observaron al microscopio con objetivo de inmersión (100x) encontrándose bacilos rosados. En la figura 3, se observa que todas las bacterias presentaron una coloración roja característica de las bacterias Gram-negativas, con forma de bastones. Este resultado concuerdan con lo reportado en la bibliografía para las bacterias del género *Xanthomonas*.

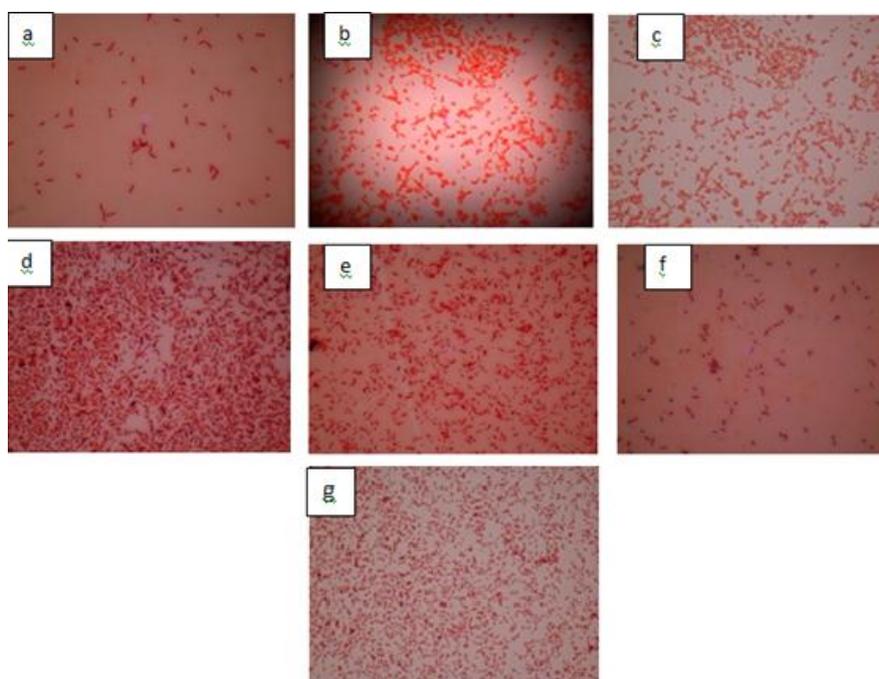


Figura 3 Tinción de Gram de microorganismos observados al microscopio óptico con aceite de inmersión (Aumento 100X): a) CVCM 2063, b) CVCM 2065, c) CVCM 2059, d) CVCM 2093 e) LMV08, f) LMV14 y g) *E.coli*.

Las bacterias aisladas presentan las características culturales similares a lo reportado para *Xanthomonas* sp por diversos autores (Bergey, 1994; Birch, 2001; Jiménez y Contreras, 2004; Ordosgoitti y col., 1976; Shaad y col., 2001). Se observaron diferencias en el crecimiento y las características de la bacteria

en los medios LB y YDC; estas diferencias se deben a los reactivos que componen cada medio, variando la intensidad del pigmento amarillo, la velocidad de crecimiento y la mucosidad de la bacteria (Figuras 4 y 5) (Jiménez y Contreras, 2004). Una descripción más detallada se puede apreciar en la tabla 2, en donde se resaltan las principales características morfológicas observadas de cada cepa, en agar LB y en YDC.

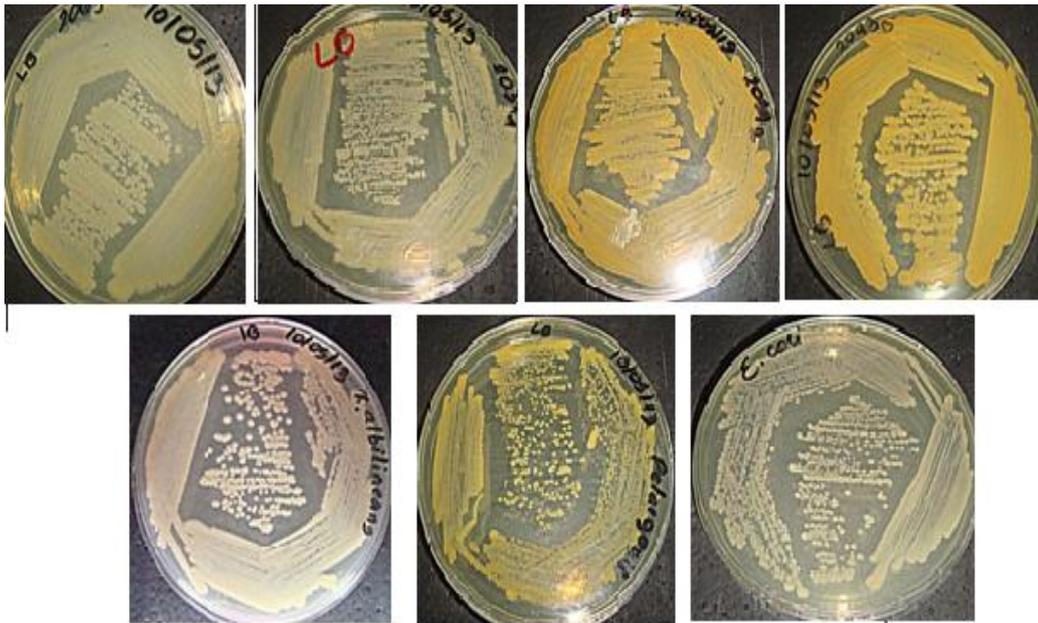


Figura 4: Morfología de las cepas bacterianas en agar LB. a) CVCM 2063, b) CVCM 2065, c) CVCM 2059, d) CVCM 2093e) LMV08, f) LMV14, g) *E.coli*

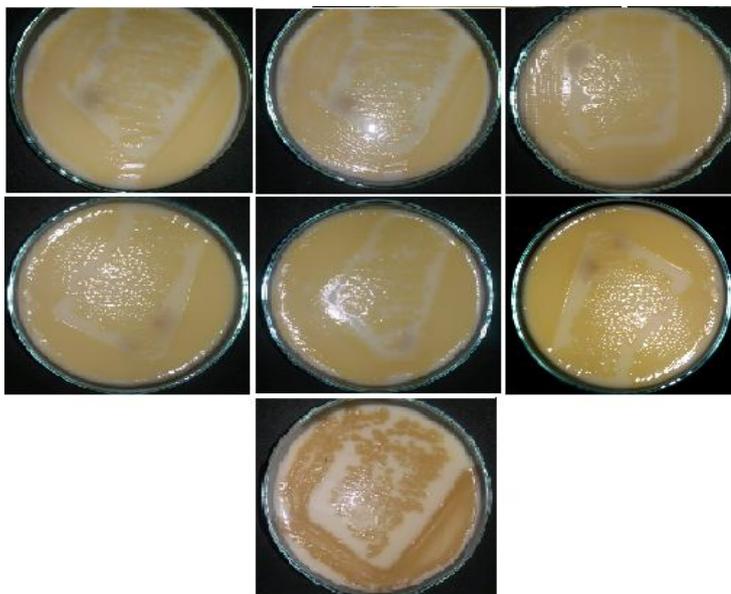


Figura. 5: Morfología de las cepas bacterianas en agar YDC. a) CVCM 2063, b) CVCM 2065, c) CVCM 2059, d) CVCM 2093e) LMV08, f) LMV14, g) *E.coli*

Tabla 2: Resultado de la morfología observada de las cepas en

Medio Cepa	Morfología	LB COLOR	YDC COLOR	MUCOSIDAD
CVCM2063	Circular	Amarillo claro	Crema	No
CVCM2065	Circular	Amarilloclaro	Crema	No
CVCM2059	Circular	Amarillo	Crema	Si
CVCM2093	Circular	Amarillo	Anaranjado	Si
LMV 14	Circular	Amarillo	Anaranjado	No
LMV08	Circular	Amarillo claro	Amarillo	Si
<i>E.coli</i>	Circular	Blanco	Blanco	No

Al igual que lo reportado para el género *Xanthomonas*, todas las colonias tenían forma circular, con pigmentación amarillo-amarillo claro o crema, dependiendo del medio de cultivo. Las cepas CVCM 2063, CVCM 2065 y LMV14 presentaron mucosidad al igual que el control negativo *E. coli*. Sin embargo, según lo reportado por Jiménez y Contreras (2004) algunas especies del género *Xanthomonas* presentan esta característica.

5.3 Caracterización bioquímica

Existen diversas pruebas bioquímicas importantes que se deben emplear para identificar un microorganismo, tratando a nivel de género como de especie. En el caso del género *Xanthomonas* las pruebas básicas para su identificación una vez realizada la tinción Gram, son: actividad catalasa, actividad oxidasa, hidrólisis de almidón, esculina y gelatina, utilización de carbohidratos, descarboxilación de aminoácidos, crecimiento en medios selectivos, entre otras características (Alvez, 2014). En este sentido, los resultados de estas pruebas realizadas en esta investigación, se detallan a continuación:

5.3.1 Hidrólisis de la esculina

Las bacterias aisladas procedentes tanto de las hojas de geranio así como de las cepas obtenidas en el CVCM, presentaron una reacción positiva a la hidrólisis de la esculina. En contraste con el resultado de la cepa control negativo *E.coli* cuya prueba de hidrólisis de esculina fue negativa.

5.3.2 Prueba de Oxidación-fermentación de azúcares en medio OF

El medio Hugh-Leifson (O-F) es muy sensible, ya que detectó la producción leve de ácidos por degradación oxidativa (metabolismo oxidativo), dado que no fermentan la glucosa ni la lactosa por la vía aerobia y las fermentan muy poco por la vía anaerobia (Figura 5)

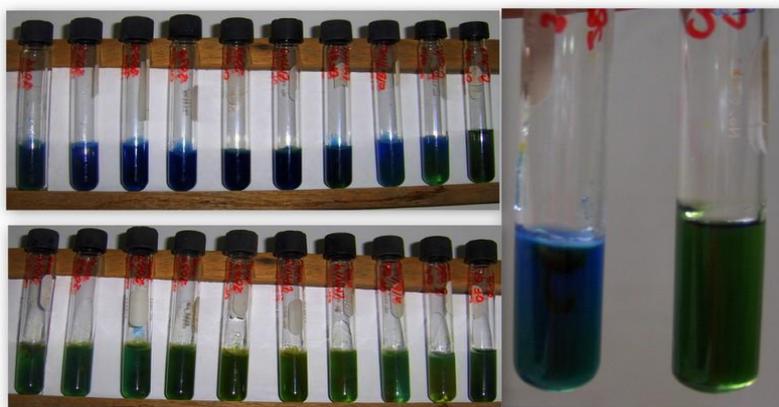


Figura 6: Prueba de (O-F); metabolismo oxidativo de *Xanthomonas*

5.3.3 Actividad catalasa

Al adicionarle peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10% a una asada de cultivo bacteriano se observó una reacción positiva en todas las cepas bacterianas estudiadas, observándose la producción rápida y sostenida de burbujas o efervescencia, lo que indica la presencia de la enzima catalasa.

5.3.4 Actividad ureasa

La ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de la úrea. Ésta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir la enzima ureasa. Esta degradación produce amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa. En este caso se obtuvo una reacción negativa en todas las cepas, lo que se puede apreciar en la figura 6, donde no se observa ninguna coloración oscura en ninguno de los tubos inoculados.



Figura 6: Resultado negativo de la prueba de hidrólisis de urea en todas las cepas estudiadas

5.3.5 Utilización de citrato

Se observó en todas las cepas de *Xanthomonas* un resultado positivo, es decir, un crecimiento con un color azul intenso en el pico de la flauta. Esto indica la capacidad de las bacterias de éste género de utilizar citrato como única fuente de carbono presente en el medio. El resultado se muestra a continuación en la Figura 7, en donde también se puede observar el resultado negativo de la cepa de *E.coli* cuyo medio se observó sin cambio aparente.



Figura 7: Resultado de la prueba citrato de las cepas de *Xanthomonas* estudiadas y de la cepa control negativo *E. coli*

5.3.6 Licuefacción de la gelatina

Las cepas CVCM 2093, LMV08 y *E. coli* licuaron la gelatina, presentando una reacción positiva, la cual se debe a la presencia de enzimas proteolíticas que licúan la gelatina; por su parte las demás cepas de *Xanthomonas* presentaron una reacción negativa al no observarse una licuefacción del medio de gelatina utilizado. (Figura 8)



Figura 8: Resultado prueba de hidrólisis de gelatina de las cepas estudiadas.

5.3.7 Producción de Indol

El principio de esta prueba es determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el Indol de la molécula triptófano. A continuación en la figura 9, podemos observar el resultado negativo de esta prueba para las cepas de *Xanthomonas* donde no se produce color en la capa alcohólica, toma el color del reactivo de Kovacs (amarillo) y por su parte se observa una reacción positiva en la cepa de *E. coli* con un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica lo que indica la capacidad de la bacteria de desdoblar el Indol.



Figura 9: Resultado de la prueba de Indol realizada a las cepas bacterianas.

5.3.8 Reducción de nitratos a nitritos

Para determinar si el nitrato ha sido reducido a nitrito, después de la incubación, se le añadió al medio de cultivo, 2 gotas de solución A, y luego 2 gotas de la solución B del reactivo de Griess y se mezcló. La aparición de una coloración rosada o roja indica que los nitratos han sido reducidos a nitritos. Si no se observó reacción, se le añadió una muy pequeña cantidad de polvo de Zinc. La aparición de una coloración rosada o roja confirma el resultado

negativo; en caso de que esto no suceda, significa que los nitratos han sido reducidos a N_2 gaseoso, es decir se ha producido una desnitrificación. El resultado de esta prueba se refleja en la Figura 10, en la que sólo la cepa CVCM 2093 y *E.coli* mostraron una reacción positiva, mientras que las demás cepas bacterianas arrojaron un resultado negativo.

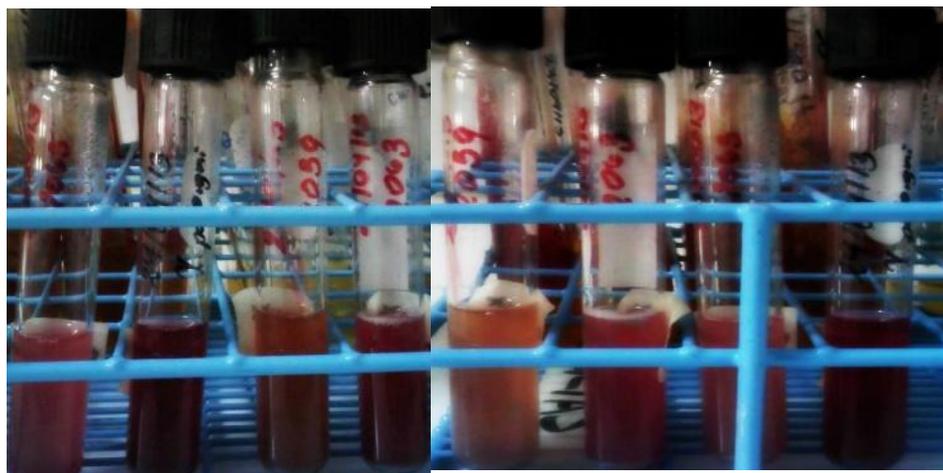


Figura 10: Resultado prueba nitrato

5.3.9 Actividad citocromo oxidasa

Con esta prueba determinamos la presencia de enzimas oxidasas. La enzima citocromooxidasa en presencia de oxígeno oxida el reactivo (fenilendiamina oxidasa) formando un compuesto coloreado llamado indofenol. Sobre una tira reactiva impregnada en reactivo (para-amino-N- dimetil-anilina) depositamos 2 o 3 colonias objeto de estudio. Se observó si la zona impregnada vira a un color azul - violeta, en cuyo caso la reacción sería positiva, lo que ocurrió sólo con la cepa *E. coli*.

5.3.10 Producción de amilasas

Las colonias después de 72h crecieron en agar almidón, luego se les adicionó lugol y se formó un área clara alrededor del crecimiento bacteriano, lo que indica una reacción positiva. Exceptuando a las cepas CVCM 2059 y LMV08 cuya hidrólisis de almidón fue débil debido a que el cambio de color del área alrededor del crecimiento bacteriano no fue muy marcado.

5.3.11 Crecimiento en agar MacConkey

Al cabo de 72h se desarrollaron colonias mucosas de color rosado muy claro y el medio se observó de un tono amarillento lo que corresponde con bacterias no fermentadoras de lactosa. En este caso, el medio adquiere un ligero tono amarillo, pues las bacterias utilizan las peptonas y alcalinizan el medio de cultivo.

Un análisis de los resultados con mayor valor diagnóstico presentados anteriormente nos permite destacar que la prueba de Kligler, en la que no se observó viraje para el bisel ni el taco, demuestra que se está en presencia de una bacteria que utiliza la vía oxidativa; la prueba de catalasa positiva, la prueba de reducción de nitratos a nitritos, permite concluir que la bacteria no redujo los nitratos; la prueba oxidasa, cuya reacción fue negativa, demuestra que esta bacteria no posee la enzima citocromo-oxidasa; la hidrólisis de la esculina con resultado positivo demuestra que los aislados hidrolizan la esculina en esculetina y glucosa, la primera reacciona con sales de hierro originando un compuesto de color negro y finalmente el resultado de la hidrólisis de almidón negativa, permiten corroborar la identidad del aislado LMV08 como *X. albilineans* lo que concuerda con lo reportado para *X. albilineans* por otros autores (Jiménez y Contreras, 2004; Huerta-Lara y col.,

2003; Bergey`s, 1994) y con la identificación realizada por Alvez (2014) de la cepa.

Por otro lado, para el aislado LMV14 se observaron bacterias aerobias, bacilos Gram negativos mótils, colonias amarillas no mucoides en YDC, con reacción de catalasa positiva y oxidasa positiva, no fermentan lactosa, con capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono disponible y no producen indol. Estas características sugieren que el aislado corresponde a *X. hortorum* pv. *pelargonii* (Jiménez y Contreras, 2004; Huerta-Lara y col., 2003).

Del mismo modo, la caracterización bioquímica realizada permitió la identificación de los aislados CVCM 2063, CVCM 2065, CVCM 2059 y del aislado CVCM 2093 como bacterias pertenecientes al género *Xanthomonas* y para corroborar su identificación como *X. campestris*, *X. campestris* pv. *phaseoli* y *X. campestris* pv. *vesicatoria*, respectivamente, se procederá a realizar el análisis molecular. La Tabla 3 resume los resultados del análisis bioquímico realizado a las cepas en estudio.

Tabla 3. Resultado de pruebas bioquímicas

	CVCM 2063	CVCM 2065	CVCM 2059	CVCM 2093	LMV14	LMV08	<i>E.coli</i>
Gram	BGN						
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	+
Nitrato	-	-	-	+	-	-	+
Gelatina	-	-	-	+	-	d	+
Kligler	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	A/A
Indol	-	-	-	-	-	-	+
Almidón	+	+	-	+	+	-	+
OF glucosa	-	-	-	-	-	-	-
OF lactosa	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey	Lac ⁻	Lac ⁺					
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	-
Simmons	+	+	+	+	+	+	-

(+): Positivo; (-): negativo; (Alc): Alcalino; (Ac): Ácido; (BGN): Bacilo Gram-Negativo (d): débil. (lac⁻): lactosa negativo: (lac⁺): lactosa positivo.

5.4 Caracterización molecular

La técnica más empleada actualmente para la caracterización, identificación y diagnóstico de patógenos de animales y de plantas, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para llevar a cabo esta técnica con éxito, debemos obtener un material genético libre de contaminantes proteicos y mantenerlo estable para evitar que se degrade. Es por ello que en este estudio se extrajo el DNA de los aislados bacterianos por el método de Gomes y colaboradores (2000) el cual fue reportado por Alvez y colaboradores (2011) como el método más eficiente, con el cual se obtiene un material genético de calidad y con una pureza que permite llevar a cabo los análisis por PCR.

5.4.4 Extracción del DNA

En la Tabla 4 se muestran los valores de concentración y pureza de los DNAs extraídos. Es importante destacar que todos los extractos de DNA obtenidos tienen valores muy cercanos al óptimo de pureza que oscilan de 1,8 a 2 según Sambrook y Russell (2001).

Tabla 4. Concentración y pureza de los DNAs de las cepas bacterianas.

Aislado	Abs 260nm	Abs 280nm	260/280	[DNA]ng/μL	[DNA] ng/μLx FD (200)
CVCM2063	0.194	0.106	1.830	8.387	1677.4
CVCM2065	0.135	0.077	1.753	5.720	1144
CVCM2059	0.048	0.032	1.867	1.867	373.4
CVCM2193	0.034	0.021	1.619	1.383	276.6
LMV08	0.099	0.056	1.768	4.211	842.2
LMV14	0.123	0.073	1.685	5.109	1021.8
<i>E. coli</i>	0.152	0.086	1.767	6.465	1293

Abs 260 y 280 nm: lectura de absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280nm; 260/280: relación entre las lecturas de absorbancias; [DNA] ng/μL: Concentración de la dilución del DNA según la lectura del espectrofotómetro; [DNA] ng/μLx FD (200): concentración total del DNA; FD: Factor de dilución.

Los resultados de los aislamientos del DNA se pueden visualizar en la figura 11, donde se observa la corrida electroforética de los extractos de material genético total de las cepas sometidas a estudio en gel de agarosa al 0,8%. Se observan bandas de alto peso molecular en todos los aislados, lo que evidencia la integridad del material genético a emplear en las pruebas moleculares.

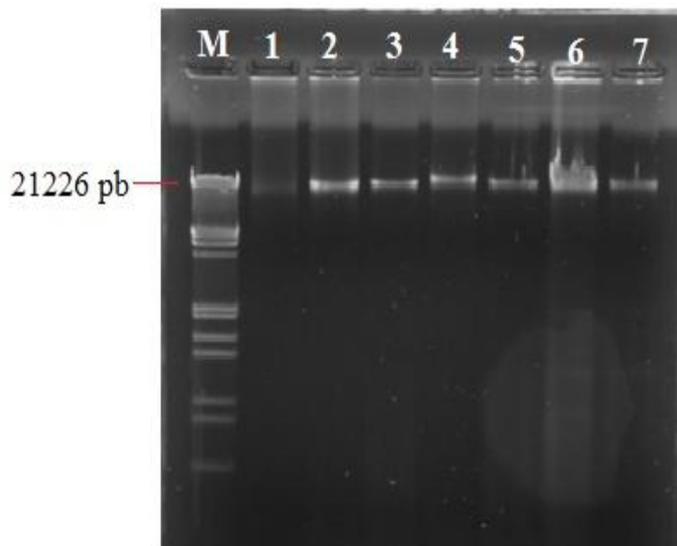


Figura 11. Registro fotográfico de electroforesis de los extractos de DNA total. Carril M: marcador de peso molecular λ Hind III. Carriles 1 al 6: aislados 1) CVCM2063, 2) CVCM2065, 3) CVCM2059, 4) CVCM2093, 5) LMV08, 6) LMV14. Carril 7: *E. coli*.

El resultado obtenido es similar al reportado por Gomes y colaboradores (2000) y por Alvez (2014) donde los extractos en el gel de agarosa presentan integridad y pocos residuos de RNA, siendo éste un método eficiente y de buen rendimiento para el aislamiento de DNA de las bacterias de los géneros *Xanthomonas* y *Escherichia*.

Amplificación de la región del gen ribosomal 16S

Se realizó la amplificación del gen ribosomal 16S, a fin de comprobar la calidad del DNA extraído y verificar si se trata de material genético de procariota, ya que éste es un gen altamente conservado que codifica para la subunidad menor de los ribosomas. Se utilizaron los iniciadores universales U1 y U2 que anclan en los extremos de la secuencia del gen (Lu y col., 2000).

En la figura 12 se observa la banda de 996 pb esperada de la misma intensidad en todas las muestras, la cual corresponde al gen de la subunidad ribosomal menor 16S, lo cual corrobora que se trata de organismos procariotas según lo reportado por Lu y colaboradores (2000).

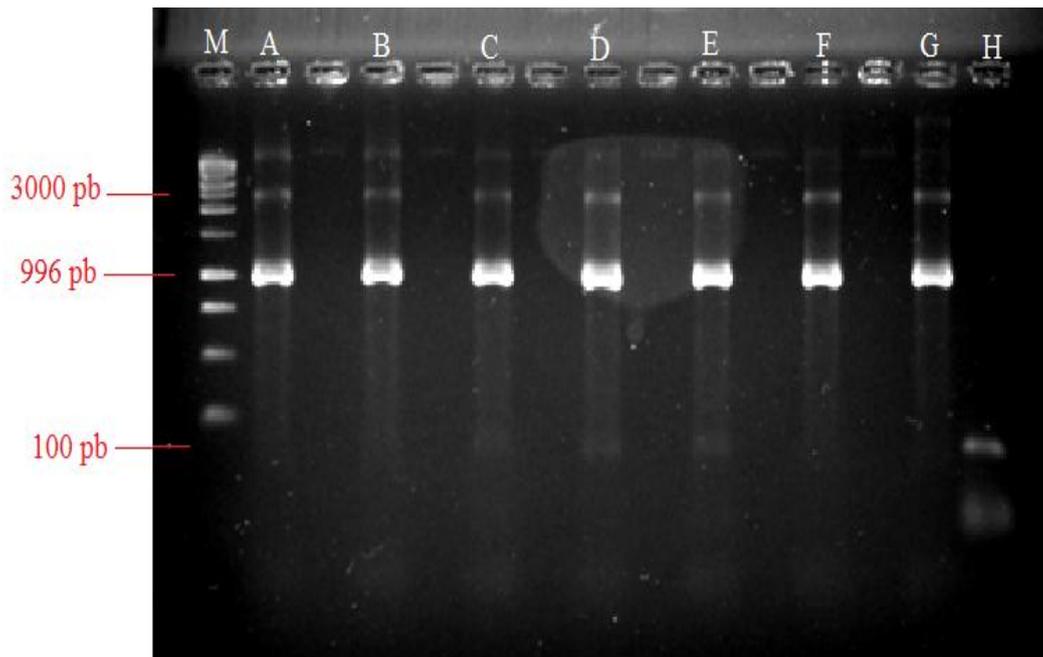


Figura 12: Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR, empleando los iniciadores universales U1 y U2 Carril M: marcador de tamaño molecular 1 kb, Carriles A al F: A) aislados CVCM 2063, B) CVCM 2065, C) CVCM 2059, D) CVCM 2093, E) LMV08, F) LMV14. Carril G: *E. coli*. Carril H: control de reactivos.

Del mismo modo, se observan bandas inespecíficas en algunos aislados, que pueden deberse a que los iniciadores tienen posibilidades de hibridar en regiones inespecíficas durante los eventos de amplificación. Distintos autores observaron resultados similares al emplear esta técnica (Alvez y col., 2012, Oropeza y col., 2008, Alvez, 2014). Con este resultado se comprueba además la calidad de los extractos de DNA ya que no existen inhibidores para las subsiguientes reacciones de amplificación de DNA con iniciadores específicos.

Amplificación mediante iniciadores específicos

Xanthomonas albilineans

Alvez (2014) logró el diagnóstico de un aislado de *X. albilineans* denominado LMV08 obtenido de plantas de caña de azúcar con síntomas de escaldadura foliar, mediante la combinación de técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares. Utilizando los iniciadores PGBL1 y PGBL2 obtuvo una banda específica de 288 pb sólo en los extractos de DNA de esta bacteria. En este sentido, se procedió a diagnosticar si alguno de los extractos del CVCM correspondían a *X. albilineans* utilizando el aislado LMV08 como control positivo, siguiendo esta metodología descrita por Pan y colaboradores (1999); aunque por pruebas bioquímicas y morfológicas ningún otro aislado parecía corresponder a esta especie. Sin embargo, la confiabilidad de los resultados obtenidos se incrementaría al obtener amplificación sólo en el aislado LMV08, previamente identificado como *X. albilineans*. La Figura 13 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de las amplificaciones con estos iniciadores específicos para *X. albilineans*, observando la amplificación de la banda de 288 pb sólo para es aislado control LMV08, demostrándose así que es la única *X albilineans* en los aislados objeto de este estudio.

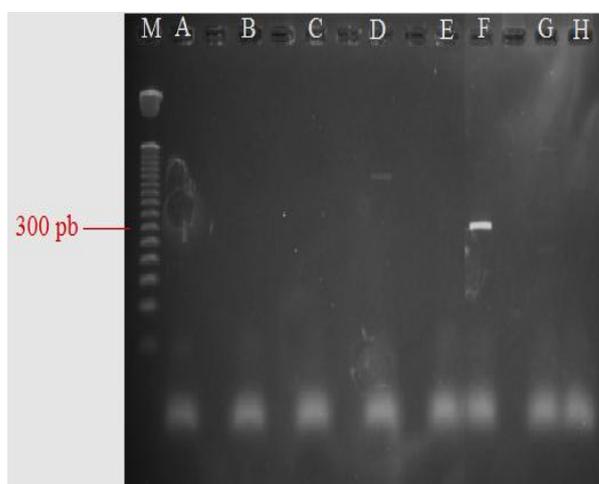


Figura 13: Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR, empleando los iniciadores específicos PGBL1 y PGBL2. Carril M: marcador de tamaño molecular 50 pb, Carriles A al F aislados A) CVCM 2063, B) CVCM 2065, C) CVCM 2059, D) CVCM 2093, E) LMV14, F) LMV08. Carril G: *E. coli*. Carril H: control de reactivos.

Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii

La bacteria aislada de la planta de geranio con síntoma de bacteriosis, luego de ser caracterizada por pruebas bioquímicas e identificada como *X. hortorum* pv. *pelargonii* a raíz de los resultados de estas pruebas; también fue evaluada su naturaleza procariota por PCR con iniciadores universales y su identificación definitiva se logró al amplificar, sólo en este aislado la banda 1,2 kb (Figura 14), tal y como lo reportan Manulis y colaboradores (1994)

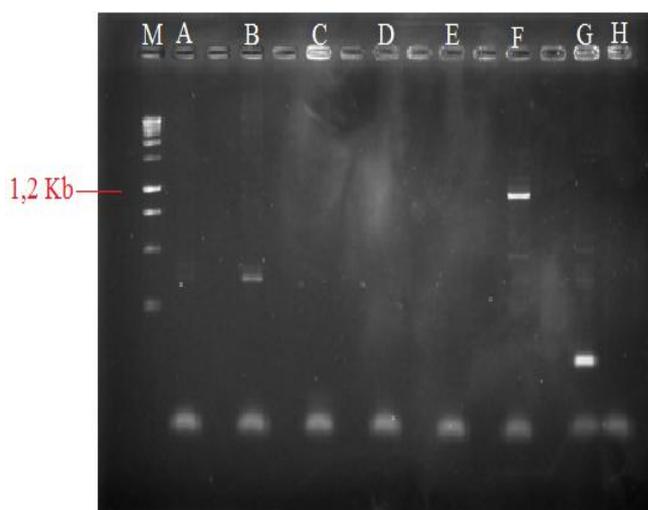


Figura 14: Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR, empleando iniciadores específicos P1 y P2. Carril M: marcador de tamaño molecular 1kb. Carriles A al F: A) CVCM2063, B) CVCM2065, C) CVCM2059, D) CVCM2093, E) LMV08, F) LMV14. Carril G: control negativo *E.coli* Carril H: control de reactivos.

Aislados CVCM2063, CVCM2065, CVCM2059 y CVCM2093

Con respecto a los aislados adquiridos en el CVCM, la identificación suministrada en el catálogo de este centro indica que todos corresponden a la especie *X. campestris*, siendo los aislados CVCM2063 y CVCM2065 *X. campestris* pv. *campestris*; CVCM2059 corresponde a *X. campestris* pv. *phaseoli* y el aislado CVCM2093 había sido identificado como *X. campestris* pv. *vesicatoria*. En este sentido en esta investigación, mediante los métodos bioquímicos y moleculares implementados, sólo se corrobora la identidad de estos aislados hasta el nivel de especie; confirmando lo previamente reportado

en el catálogo del CVCM, que todos estos aislados correspondían a la especie *X. campestris*. Si recordamos las pruebas bioquímicas, esta especie es oxidasa negativa al igual que *X. albilineans*, pero a diferencia de *X. hortorum* pv *pelargonii*; además *X. campestris* hidroliza el almidón mientras que *X. albilineans* y *X. hortorum* pv *pelargonii* no lo hidrolizan. Para corroborar estos resultados mediante pruebas moleculares se realizó una rep-PCR con los extractos de DNA de estos aislados y sus controles siguiendo la metodología descrita por Tsygankova y colaboradores (2004), utilizando el iniciador KPRN2 el cual según los autores amplifica un patrón de bandas de mayor y menor peso molecular para diferentes géneros bacterianos, incluyendo *Xanthomonas*, pero que además sólo en las especies de *X. campestris* amplifica una banda específica de 600 pb (Figura 15).

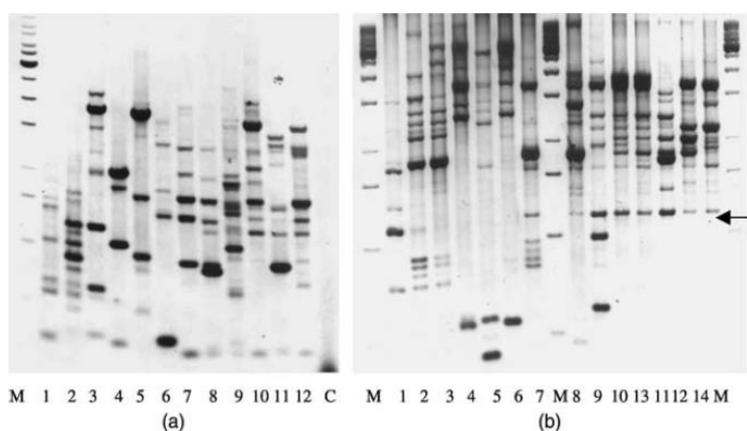


Figure 1. Rep-PCR fingerprint obtained in PCR with primers KRP2+KRP8 (a) and KRPN2 (b) for *Xanthomonas* species and *Xcc* reference strains. 1, *Erwinia carotovora*, ER1; 2, *X. axonopodis* pv. *malvacearum* NCPPB633^T; 3, *X. oryzae* pv. *oryzicola* NCPPB3002^T; 4, *X. oryzae* pv. *oryzicola* NCPPB1585^T; 5, *X. vesicatoria* pv. *vesicatoria* NCPPB422^T; 6, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* HRI924a; 7, *X. campestris* pv. *raphani* NCPPB1946^T; 8, *X. campestris* pv. *armoraciae* NCPPB347^T; 9, *X. campestris* pv. *armoraciae* Xa5; 10 and 13 *Xcc* NCPPB528^T; 11, *Xcc* PHW117; 12, *Xcc* HRI1279a 14, *Xcc* HRI1279b. Arrow indicates the KRPN2-600 marker characteristic for *X. campestris* strains.

Figura 15: Registro fotográfico de electroforesis de la amplificación de la rep-PCR realizada por Tsygankova y colaboradores (2004) con los iniciadores KRP2+KRP8 (a) y KRPN2 (b) para las especies del género *Xanthomonas*. En la figura b, se puede observar la banda de 600 pb típica de *X. campestris*.

Sin embargo, al realizar esta rep-PCR, no se observó la amplificación de ninguna banda en ninguno de los aislados del CVCM, ni del aislado LMV14 así como tampoco de los controles utilizados (Figura 16). Se realizaron diferentes modificaciones a la metodología propuesta por los autores (Tsygankova y col., 2004), como variar la temperatura de anillamiento del iniciador, cambiar el ciclo de amplificación de la reacción en general, cambiar la cantidad de iniciador y de DNA en la mezcla de reacción e incluso agregar 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albúmina para optimizar el funcionamiento de la taq polimerasa, pero ninguna de las estrategias empleadas para observar alguna amplificación con este iniciador fue satisfactoria, por lo que la identificación planteada para los aislados del CVCM no se pudo llevar a cabo con ésta técnica.

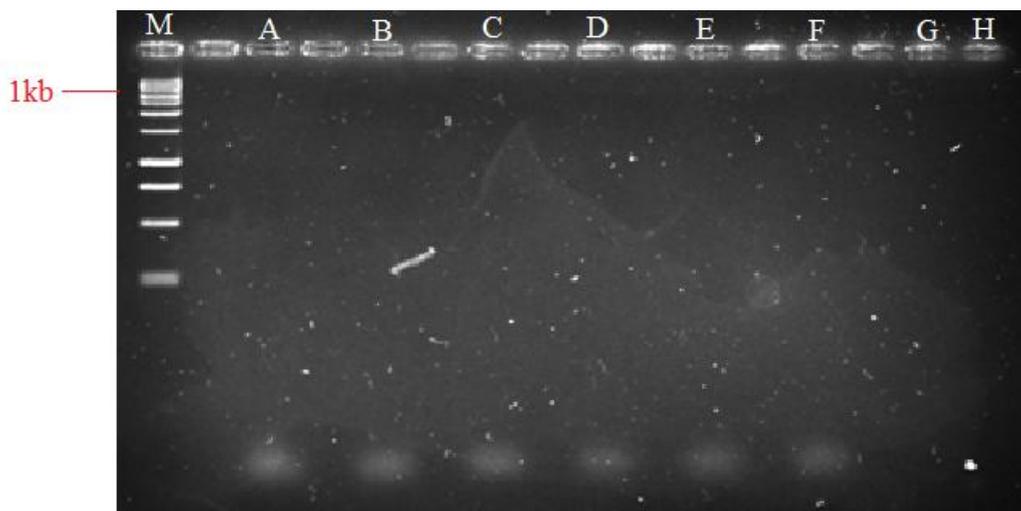


Figura 16: Registro fotográfico de electroforesis de la amplificación de rep-PCR, empleando el iniciador KRPN2. Carril M: marcador de tamaño molecular 1kb. Carriles A al F: A) CVCM2063, B) CVCM2065, C) CVCM2059, D) CVCM2093, E) LMV08, F) LMV14. Carril G: control negativo *E.coli* Carril H: control de reactivos.

Genotipificación de los aislados bacterianos

Por otro lado, la amplificación de la región consenso intergénica (ERIC) ha sido una de las herramientas empleadas para identificar a las bacterias del género *Xanthomonas* y para evaluar su diversidad (Lopes y col., 2000), ya que este género presenta grandes variaciones y se ha expandido alrededor de todo el mundo, por lo que la variabilidad de las cepas es muy elevada (Swings y Civerolo, 1993). Las secuencias repetitivas juegan un papel importante en la organización del genoma bacteriano. Con base en el conocimiento de la naturaleza clonal y la dinámica de poblaciones de las bacterias patógenas, Louws y colaboradores (1994), han planteado la hipótesis que a través de la evolución, cada línea especializada o patovar tiene una distribución única o reordenamiento de las secuencias repetitivas en el genoma, por lo que se pueden generar patrones genómicos correlacionados con un patovar específico.

Se realizó la PCR usando iniciadores de DNA que amplifican regiones conservadas en elementos repetitivos bacterianos (rep -PCR) para obtener “*fingerprint*” genómicos de *Xanthomonas*, obteniendo amplificación para las regiones ERIC y BOX. Ambos análisis arrojaron un complejo patrón con bandas que oscilan entre los 150 y 3000 pb. (Figura17). Las cepas CVCM2063 y CVCM2065 generaron dos patrones de bandas muy similares, mostrando una alta similitud entre ellas, en contraste con las demás cepas del CVCM y los aislados LMV08 y LMV14 los cuales arrojaron patrones de productos ERIC y BOX diferentes entre ellos, distinguiéndose cada uno como un aislado único y diferente al resto.

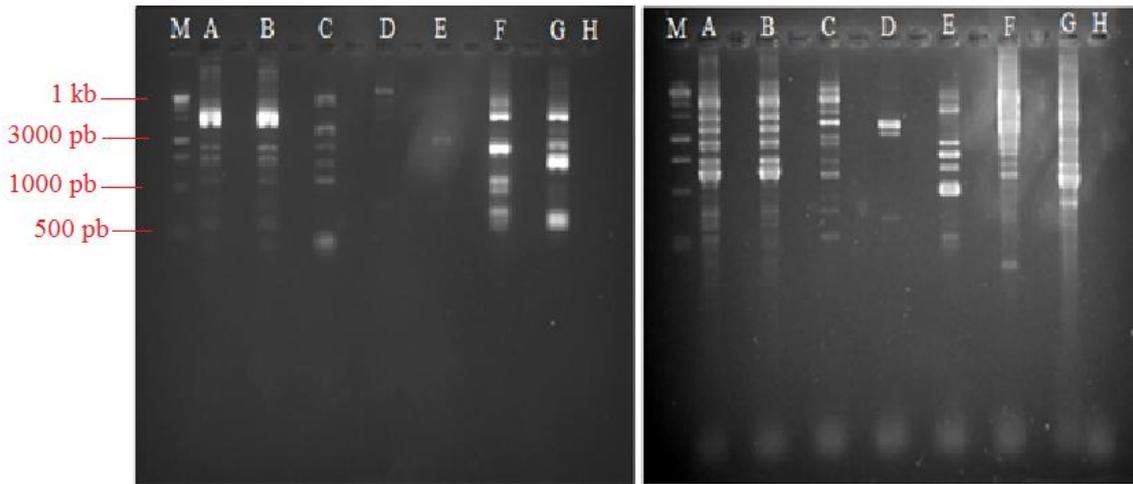


Figura 17: Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por ERIC-PCR (a) y BOX-PCR (b), empleando los iniciadores universales ERIC1-ERIC2 y BOAX1 respectivamente. Carril M: marcador de tamaño molecular 1 kb, Carriles A al F aislados A) CVCM2063, B) CVCM2065, C) CVCM2059, D) CVCM2093, E) LMV08, F) LMV14. Carril G: *E. coli*. Carril H: control de reactivos.

El resultado obtenido para la cepa CVCM2093, con la amplificación de una banda única tanto para ERIC como BOX, nos indica que de confirmar esta cepa como *X. campestris* pv *vesicatoria*, podríamos identificarlas en lo sucesivo con estas PCR donde se amplifica una única banda de aproximadamente 1kb con ERIC-PCR y de 3500 pb con BOX-PCR. De acuerdo a la actividad amilolítica que presentó este aislado en las pruebas bioquímicas y a lo reportado por Vauterin y colaboradores (1996). Este aislado podría ser identificado como *X. vesicatoria*; sin embargo, se recomienda la amplificación con iniciadores específicos o la secuenciación del fragmento del gen ribosomal 16S para la identificación definitiva de este aislado. Según la reclasificación de *X. campestris* pv *vesicatoria* propuesta por Jones y colaboradores (2014) *X. euvesicatoria* incluye sólo las cepas del antiguo taxón *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Las cepas son generalmente aisladas de lesiones en plantas solanáceas, especialmente tomate (*Lycopersicon* spp.) y pimiento (*Capsicum*

spp.). *X. euvesicatoria* puede distinguirse de cepas de tipo *X. vesicatoria* B por similitudes de DNA y rasgos fenotípicos que pueden ser probados fácilmente: *X. euvesicatoria* es débilmente amilolítica y pectolítica, tiene un patrón distinto de reacción para un panel de anticuerpos monoclonales y no utiliza ácido cis-aconítico. En contraste, las cepas que representa *X. vesicatoria* digieren fuertemente sustratos almidón y pécticas, reaccionan de manera diferente al panel de anticuerpos monoclonales, no utilizan cis-aconitato, y tiene una proteína de 25 a 27 kDa encontrada en *X. vesicatoria*.

Lopes y colaboradores (2001) utilizaron los iniciadores ERIC y BOX para estudiar la diversidad en *X. albilineans* y distinguirla de otras especies bacterianas no conocidas, también presentes en la caña de azúcar. Obtuvieron alta variedad en los patrones de bandas (*fingerprint*), logrando determinar las diferencias entre otras bacterias patógenas y entre serovares presentes dentro de una misma localidad. Este resultado concuerda con el obtenido en esta investigación, donde sólo los aislados CVCM2063 y CVCM2065 muestran patrones similares, pudiendo corresponder ambos a *X. campestris* pv *campestris* de acuerdo a las pruebas bioquímicas reportadas en este trabajo y a la identificación suministrada en el catálogo del CVCM.

En resumen, tomando en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y los obtenidos en las pruebas moleculares para los aislados de *X. campestris*, podemos en primer lugar validar la identificación realizada en el CVCM para estos aislados, ya que todos son bacilos Gram negativos, móviles, con actividad catalasa positiva, oxidasa negativa, aerobios estrictos, no mucoides, no fermentadoras, utilizan citrato como única fuente de carbono disponible, hidrolizan el almidón, hidrolizan la esculina y la gelatina, no

producen indol, que son características particulares de esta especie bacteriana. Sin embargo, al intentar corroborar que los aislados mencionados pertenecen a la especie *X. campestris*, realizando rep-PCR no se obtuvo ninguna amplificación de bandas con el iniciador KRPN2. Por lo que la identificación molecular de los aislados del CVCM con dicho iniciador específico no se pudo realizar satisfactoriamente, quedando la identidad de los mismos comprobada únicamente con las técnicas bioquímicas y morfológicas descritas anteriormente. La identificación de los aislados LMV08 y LMV14 se logró inequívocamente mediante la implementación de pruebas bioquímicas y la PCR con iniciadores específicos.

5.5. Postulados de Koch para *X. hortorum* pv. *pelargonii*

La estimación de la patogenicidad de un agente infeccioso es importante para su identificación, pudiendo llegar incluso hasta el nivel de patovar. Para estimar la patogenicidad se debe inocular el patógeno en el tejido sano y evaluar el desarrollo de la enfermedad. En el caso de las *Xanthomonas* se recomienda la inoculación con el aislado mediante decapitado, asperjado o inyección (Ramos y Barbosa, 2005). A su vez, Álvez (2014) realizó la inoculación mediante inyección para *X. albilineans* en caña de azúcar.

Con el objetivo de cumplir los postulados de Koch como requisito para la identificación final de la bacteria aislada de las hojas de geranio, se cultivaron *in vitro* microesquejes de geranio con el propósito de obtener vitroplantas y realizar las inoculaciones en las hojas libres de patógenos. El método de desinfección de los microesquejes no resultó apropiado, debido a que a los

pocos días de establecido el cultivo, se observaba una marcada contaminación tanto de bacterias como de hongos en los frascos de cultivo (Figura 18), así como también nos enfrentamos a una fuerte oxidación del tejido vegetal. Se intentó establecer el cultivo *in vitro* de esta especie vegetal en 6 oportunidades variando diversos parámetros como por ejemplo el tiempo en el que se dejaba el tejido en fungicida, pero mientras más abrasivo era el método de desinfección, mas daño se le hacía al tejido siendo esto igual de ineficiente y disminuyendo notablemente la capacidad de regeneración de los tejidos.

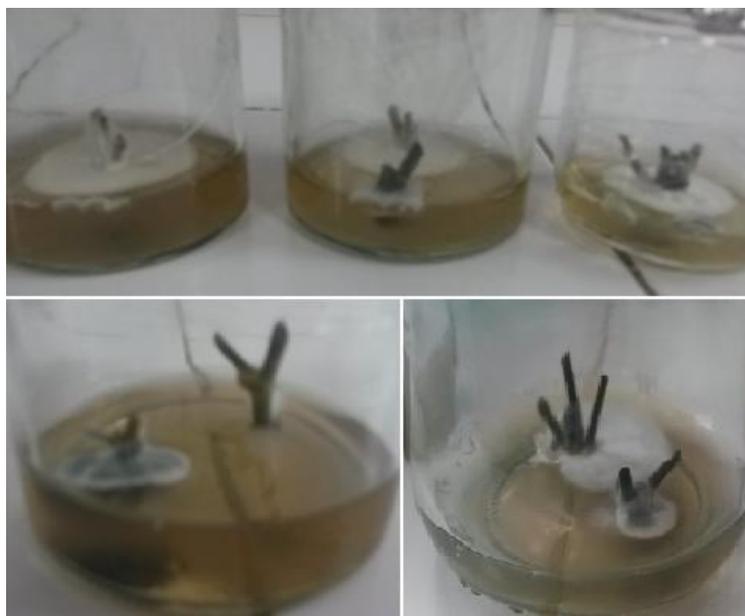


Figura 18: Contaminación presentada en los microesquejes de geranio cultivados *in vitro*.

Por lo tanto, se realizó el cumplimiento de los postulados de Koch en hojas de geranio de una planta sana mantenida en condición de vivero, libre de los síntomas de la bacteriosis característica producida por *X. hortorum* pv. *pelargonii* (Figura 19).

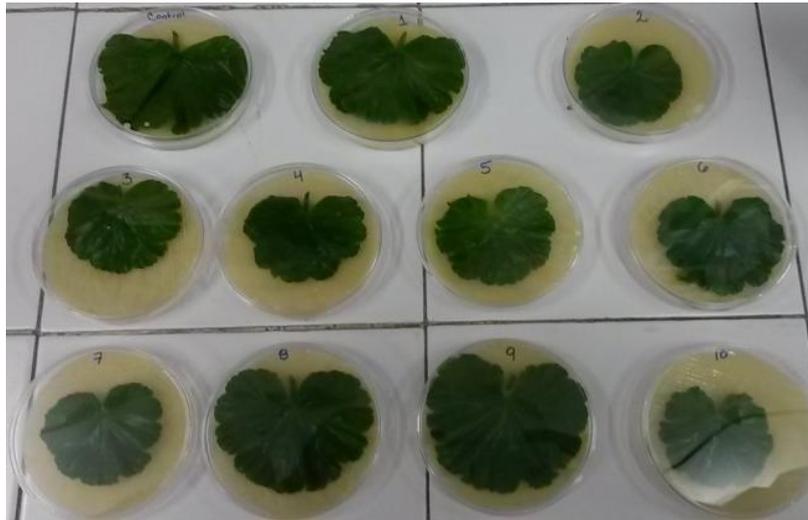


Figura 19: Establecimiento del patosistema en cámaras húmedas con hojas de geranio inoculadas con el aislado LMV14 (1-10). Control: Inoculada con caldo LB.

Además también se realizó el ensayo en discos de hojas de geranio, con el fin de determinar si existe alguna diferencia cuando la bacteria entra e invade el tejido xilemático, y cuando ésta entra a través de heridas, en contacto directo con el tejido foliar. En este caso, también se utilizaron discos control sin inóculo bacteriano.

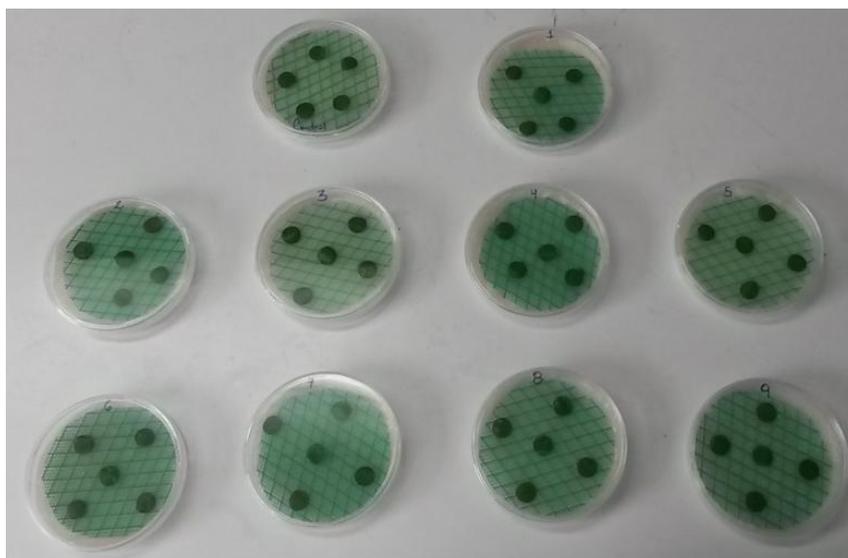


Figura 20: Discos de hojas de geranio en cámaras húmedas, las cuáles fueron inoculadas al cortarlas con un sacabocado impregnado en la solución bacteriana (1-9). Control: sacabocado impregnado en caldo LB.

En el transcurso de los días, se fueron observando los síntomas de la enfermedad conforme éstos fueron apareciendo, el resultado final para ambos casos, tanto en hojas completas como en los discos, fue una necrosis total del tejido foliar. (Figura 21)



Figura 21 Necrosis observadas en hojas de geranio inoculadas con *X. hortorum* pv. *Pelargonii*. A) Control sin inóculo B) 3 días post inoculación c) 10 días post inoculación

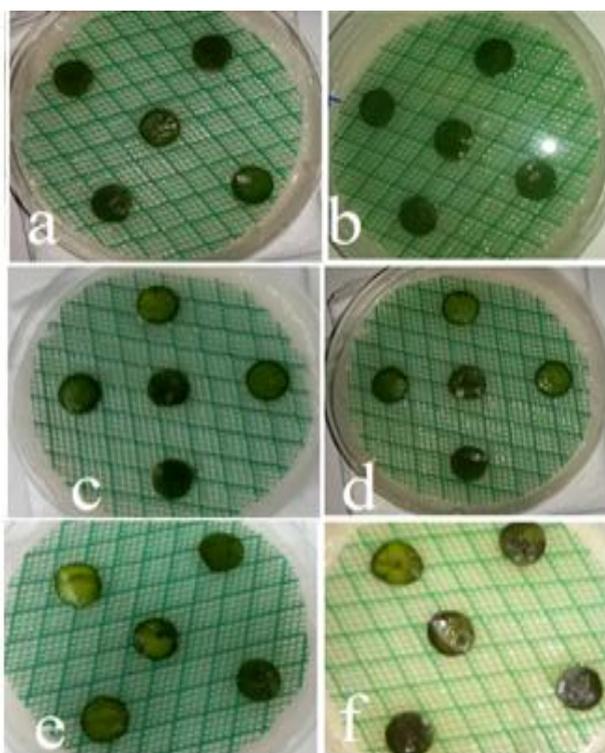
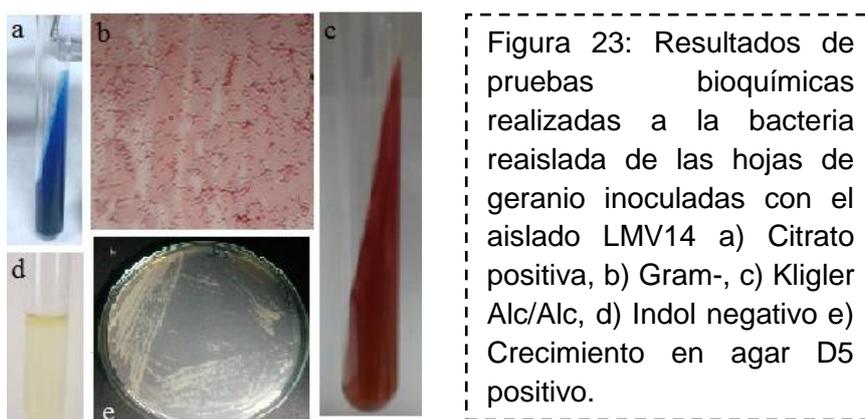


Figura 22: Lesiones típicas de bacteriosis presentes en discos de hojas de geranio inoculadas con la bacteria LMV14 identificada como *X. hortorum* pv. *pelargonii*. a) y b): control sin inóculo 0 y 10 días post inoculación respectivamente. c) 4 dpi d) 6 dpi e) 8 dpi f) 10 dpi (dpi: días post inoculación).

Luego de transcurridos diez días del día de infección de las hojas de geranio, y observada la clorosis y posterior necrosis total de todas las hojas infectadas (Figura 22), se realizó un macerado de las mismas con caldo de medio semi-selectivo D5. Las colonias crecidas en este caldo se aislaron en agar LB y en agar D5; aquellas colonias amarillas de bordes convexos fueron separadas de las demás colonias encontradas y posteriormente fueron sometidas a tinción de Gram y a las mismas pruebas bioquímicas seleccionadas en este estudio para corroborar que se tratara de la misma bacteria con la que fueron inoculadas las hojas de geranio. Estas pruebas bioquímicas realizadas en el organismo re-aislado cuyas características morfológicas eran similares a las de la bacteria inoculada inicialmente, arrojaron los mismos resultados que las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de la bacteria (Figura 23). De esta manera, tanto la sintomatología como el perfil bioquímico, permitió corroborar la identidad de la bacteria, así como lo reportan distintos autores (Alvez, 2014; Sánchez, 2011).



Así mismo, se realizó la extracción de DNA de la bacteria reaislada y la PCR con los iniciadores específicos P1 y P2, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente según Manulis y colaboradores (1994), observándose la banda específica para *X. hortorum* pv. *pelargonii* de 1,2 kb (Figura 24).

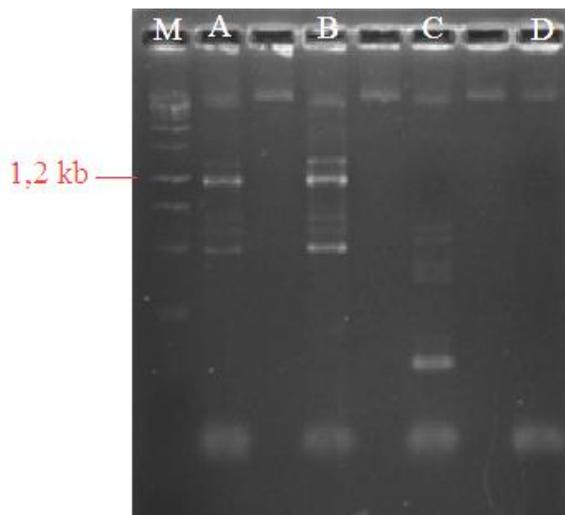


Figura 24: Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR, empleando iniciadores específicos P1 y P2. Carril M: marcador de tamaño molecular 1kb. Carriles: A) LMV14 B) Bacteria reaislada de geranio C) *E.coli* Carril D: control de reactivos.

En el ámbito de la preservación de las plantas, la aplicación de técnicas de diagnóstico que implican estudios inmunológicos y/o detección basada en la reacción en cadena de la polimerasa, han proporcionado herramientas muy útiles y necesarias para el diagnóstico de enfermedades (Alvez, 2014). El uso de una única técnica metodológica no es suficiente para la identificación de un patógeno, por lo que se han establecido protocolos en los cuales se deben utilizar conjuntamente pruebas morfológicas, bioquímicas, moleculares, fisiológicas, serológicas y de patogenicidad que garanticen la identidad de la cepa de estudio (Jaradat y col., 2009). Con los postulados de Koch comprobados para el aislado LMV14, en este trabajo se siguió la metodología recomendada por estos autores logrando la identificación definitiva y veraz de la bacteria *X. hortorum* pv *pelargonii*.

El estudio de los fitopatógenos bacterianos, ha contribuido al avance de las técnicas y prácticas de control de enfermedades, así como también ha tenido aportes significativos en cuanto al desarrollo de productos comerciales y

tecnologías innovadoras, como el mejoramiento vegetal y la ingeniería genética. Proyectos de investigación de interés nacional, como el programa de certificación de semillas, son sumamente importantes para la detección y control de las enfermedades de las plantas, que generan pérdidas en la economía del país traducidas en la disminución de los productos agrícolas nacionales. En este sentido, es importante destacar el aporte al país de este proyecto de investigación, cuya versatilidad en el uso integrado de técnicas morfológicas, bioquímicas y moleculares para la identificación del agente patógeno, así como el cumplimiento de los postulados de Koch; garantizan la identidad de la cepa en estudio. Ya que no se pueden tomar las medidas de control adecuadas en el tiempo sin la identificación fiable del patógeno causante de la enfermedad,

CONCLUSIONES

- Del macerado de hojas de geranio con síntomas de bacteriosis se logró aislar una bacteria Gram negativa. Los resultados de las pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares permitieron identificarla como *X. hortorum* pv. *pelargonii*.
- La identidad de las cepas obtenidas en el CVCM fue corroborada en esta investigación mediante técnicas bioquímicas, observándose características similares a las reportadas para *X. campestris*.
- Mediante la genotipificación con ERIC-PCR y BOX-PCR, se observó que las cepas CVCM 2063 y CVCM 2065 identificadas previamente como *X. campestris* presentan bandas del mismo tamaño, por lo que se presume que están relacionadas entre sí. Mientras que las demás cepas objeto de estudio, CVCM 2059, CVCM 2093, LMV14, LMV08 y *E. coli* no están relacionadas, perteneciendo estas a diferentes patovares y/o especies.
- Desafortunadamente, por motivos de contaminación recurrente, no pudimos valernos del cultivo *in vitro* para el cumplimiento de los postulados de Koch. Por lo que se realizó de la manera convencional, utilizando plantas sanas mantenidas en condiciones de vivero de manera satisfactoria. Estos postulados realizados como requisito para la identificación fiable del aislado LMV14, fueron cumplidos a cabalidad. De manera que al ser inoculadas hojas sanas con el aislado bacteriano, se produjeron los síntomas típicos de la enfermedad causada por *X. hortorum* pv. *pelargonii*; luego al ser re-aislada la bacteria del macerado de hojas enfermas y sometida a pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares se logró la identificación definitiva del aislado LMV14 como *X. hortorum* pv. *pelargonii*.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda complementar el diagnóstico bioquímico convencional de las bacterias con la técnica de PCR mediante los iniciadores específicos, así como secuenciar los productos del PCR rRNA 16S para la identificación definitiva de las cepas obtenidas en el CVCM.
- Se recomienda el establecimiento del cultivo *in vitro* como sistema para obtener material vegetal bajo condiciones controladas y asepsia, y así llevar a cabo el cumplimiento de los postulados de Koch. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales sigue a la vanguardia al ser altamente eficiente para el estudio de la interacción del patógeno con su hospedador.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. (2005). Plant pathology. 5ª edición. Elsevier Academic Press. 922 págs.
2. Aldaghi M., Massar T.S., Dutrecq O., Bertaccini A., Jijakli M. (2009). A simple and rapid protocol of crude DNA extraction from apple trees for PCR and real-time PCR detection of Candidatus Phytoplasma mali. J Virol Meth **156**: 96–101
3. Alva S. (2005). Regeneración *in vitro* de geranio (*pelargonium peltatum*). Tesis de pregrado, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
4. Álvarez A. (2000). Black rot of crucifers. In A. Slusarenko, R. S. S. Fraser, & L. C. van Loon (Eds.), Mechanisms of resistance to plant diseases Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 21–52.
5. Alvez, B., Carballo, J., Alonso, G., Oropeza, M. (2011). Diagnóstico molecular de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. Agron. Trop., **61**:27-36.
6. Alvez, B., Fonseca, I., Oropeza, M. (2012). Identificación bioquímica y molecular de bacterias patógenas de papa y caña de azúcar. Mem. Inst. Biol. Exp., **6**:165-168.
7. Alvez. (2014) Análisis de la reacción de plantas de caña de Azúcar (*saccharum* spp.) A la infección con *Xanthomonas albilineans* (ashby) dowson. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. 278 págs.
8. Aranguren, B. (2005). Plantas útiles empleadas por los campesinos de la región de Bailadores, Venezuela. Boletín Antropológico. **64**: 139-165.
9. Balandrin, M., Klocke, J., Wurtele, E., Bollinger, W. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. Science **228**:154-160

10. Bashan Y., Okon Y. (1986). Internal and external infections of fruits and seeds of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Canadian Journal of Botany. **64**:2865-2871.
11. Bergey's W. (1994). Manual of Determinative Bacteriology. 9ª edición. Lippincott William y Wilkins. Philadelphia. 787 págs.
12. Birch P., Hyman L., Taylor R., Opio A., Bragard C., Toth I. (1997). RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. European Journal of Plant Pathology **103**: 809–814.
13. Birch, R. (2001). *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. Mol. Plan. Pathol., **2**:1-11.
14. Blom J., Albaum S., Doppmeier D., Pühler A., Vorhölter F., Zakrzewski M., Goesmann A. (2009). A software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. BMC Bioinforma. **10**:154.
15. Bradbury J. (1986). *Xanthomonas* Dowson 1939 Slough: CAB International Mycological Institute. pp. 198–260.
16. Bradbury, J. (1993). Guide to Plant Pathogenic Bacteria, Slough: C.A.B. International, 332 págs.
17. Carballo, J., Raymunde, M., Oropeza, M. (2007). Efecto de la infección de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, sobre la estructura anatómica de la hoja en caña de azúcar (*Saccharum* sp.) variedad RB855546. XVII Con. Ven. Bot., **20**:330-333
18. Chidamba L., Bezuidenhout C. (2012). Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from South Africa using genomic DNA fingerprinting and pathogenicity tests. Masters Dissertation, North-West University, South Africa. 50págs.

19. Chittaranjan S., De Boer S. (1997). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in geranium and greenhouse nutrient solution by serological and PCR techniques. *European Journal of Plant Pathology*. **103**: 555–563.
20. Chupp C., Sherf, A. (1960). Crucifer diseases, in *Vegetable Diseases and their Control*. pp 237–240.
21. Cova, J., Nass, H., Orozco A. (2006). Enfermedades de la caña de azúcar (*Saccharum* spp) presentes en el estado Portuguesa durante el período 2003-2005. CENIAP HOY, No 10, Disponible *on line* en: www.ceniap.inia.gov.ve (20/04/2014).
22. Davis, M. (1994). Tropical diseases incited by fastidious bacteria. *Plant Pathogenic Bacteria*, INRA, ORSTOM: **66**: 129-134.
23. De Bruijn F., Louws F., Fulbright D., Stephens C. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* cultivars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol*. **60**: 2286–2295.
24. De Gouveia, M., Bolívar, A., López, M., Salih, A, Pérez H. (2005). Participación de agricultores en la selección de materiales genéticos de frijol (*Vigna unguiculata*) evaluados en suelos ácidos de la Parroquia Espino, estado Guárico (Venezuela). *Cuadernos de Desarrollo Rural* **54**:113-130.
25. Dianese J., Schaad N. (1982). Isolation and characterization of inner and outer membraes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology*. **72**:1284–9.
26. Díaz G. (2005). Fundamentos y técnicas de análisis microbiológico. *Protocolos de pruebas de identificación bacteriana*. Laboratorio de Diagnóstico Clínico. 2º curso (2003-2004). San Fernando de Henares, madrid, 9-16.
27. Díaz, G., Ferrán, J. (2003). Fundamentos y técnicas de análisis microbiológico. *Protocolos de pruebas de identificación bacteriana*. Laboratorio de Diagnóstico Clínico. 2º curso (2003-2004). San Fernando de Henares, Madrid, 9 págs.

28. Díaz, G., Ferrán, J. (2003). Protocolos de pruebas de identificación bacteriana. 2º curso Laboratorio de diagnóstico clínico. Madrid. Disponible *on line* en: <http://es.scribd.com/doc/36671850/Protocolos-de-Pruebas-de-Identificacion-Bacteriana-2-1> (23/02/2015)
29. Digat B. (1987). Methodologie de la detection des bacteries pathogenes du *pelargonium* et organisation generale de la certification sanitaire de cette culture en France. EPPO Bull. **17**: 281–286.
30. Dos Santos R., Dianese J. (1985). Comparative membrane characterization on *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae* and *X. campestris* pv. *manihotis*. Phytopathology. **75**: 581–7.
31. Egel D., Graham J., Stall R. (1991). Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of Citrus. Appl Environ Microbiol. **57**:2724-2730.
32. Faría, A., Nava, A. (2009). Detección por PCR de Begomovirus en el cultivo del tomate en las áreas productoras de los Andes venezolanos. Rev. Fac. Agron. (LUZ) **26**:179-195
33. Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. (2009). Diagnóstico microbiológico, 12º ed. Buenos aires. Medica panamericana. 1160 págs.
34. Frid, D. (2009). Reproducción de plantas in vitro y sus beneficio para la agricultura. Tecnociencia y salud. <http://tecnocienciasalud.com/plantas-in-vitro>.
35. Fuentes, L., Dominguez, A., Alema, S., Pérez, Y. (2007). El estrés oxidativo en las plantas. Causas, efectos y mecanismos de defensa antioxidante. Monografía. Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. 44 págs. Disponible *on line* en: <http://monografias.umcc.cu/monos/2007/agronomia/m07123.pdf> (24/05/2015).

36. Garber R., Yoder O. (1983). Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal and plasmid components. *Anal Biochem.* **135**: 416-22.
37. Garcés, F. (2011). Comparative proteome and qPCR analysis of the sugarcane reaction to leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans*. A dissertation. Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The Department of Plant Pathology and Crop Physiology. 136 págs
38. Gilchrist-Saavedra, L., G. Fuentes-Davila y C. Martinez-Cano. (2005). Guia practica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Mexico, D.F.: CIMMYT. 64 págs.
39. Gomes L., Roncato M., Andrino F., Almeida F. (2000). A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. *Scien. Agric.*, **57**: 553-555.
40. Hancock R. (1991). Bacterial outer membranes evolving concepts. *ASM News*, **57**: 175-82.
41. Hernández D. (1983). Principales enfermedades bacterianas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). En curso intensivo de postgrado en la producción de frijol. 4ta. Matanzas Cuba. Conferencias, Ministerio de Agricultura 1-11.
42. Honeycutt, R., Sobral, B., McClelland, M. (1995). tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. *Microbiol.*, **141**:3229-3239.
43. Huerta, M., Ortega, L., Landeros, C., Fusicovsky, L., Marino, M. (2003a). Respuesta de 10 variedades de caña de azúcar a la escaldadura de la hoja [*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson], en la región central costera de Veracruz. *Agrociencia*, **37**:511-
44. Huerta, M., Sandoval, J., Cárdenas, E., Rojas, R., Flores, S., García, M. (2003b). Evaluación de resistencia de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*

- L.) Co 997 y Mex 64 1487, analizando colonización y dinámica poblacional de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en tallos. Rev. Mex. Fitopat., **21**:316-322.
45. Hugo E. (2006). Estudio de la incidencia de los genes de β -Lactamasas en aislados bacterianos venezolanos. Trabajo Especial de Grado de la Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 106 págs.
46. Ignatov A., Hida K., Kuginuki Y. (1998). Race-specific reaction of resistance to black rot in *Brassica oleracea*. European Journal of Plant Pathology. **104**: 821–827.
47. Jaradat, Z., Ababneh, Q., Saadoun, I., Samara, N., Rashdan, A. (2009). Isolation of *Cronobacter* spp.(formely *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. BMC Microbiol., **9**:225-235.
48. Jiménez, O., Contreras, N., Nass, H. (2004). *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en los estados Lara y Yaracuy. Rev. Fac. Agron. (LUZ), **21**:231-243.
49. Jones J., Pohronezny K., Stall R., Jones J. (1986). Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds and volunteer tomato plants. Phytopathology. **76**:430-43.
50. Jones, J., Bouzar, H., Stall, R., Almira, E., Roberts, P., Bowen, P., Sudberry, J., Strickler, P., Chun, J. (2000). Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **50**: 1211– 1219.
51. Jones, J., Lacy, G., Bouzar, H., Stall, R., Schaad, N., (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Systematic Applied Microbiology, **27**: 755–762.

52. Kado, C., Heskett M. (1970). Selective media isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. California, **60**:969-976.
53. Kennedy B., Alcorn S. (1980). Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Dis.* **64**:674-676.
54. Kim S., Kim J., Lee B., Cho, J. (2009). Mutational analysis of the gum gene cluster required for xanthan biosynthesis in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biotechnology Letters.* **31**: 265–270.
55. Kim, J., Jung, J., Reyes, J., Kim, Y., Kim, S., Chung, K., Kim, J., y col. (2006). microRNA-directed cleavage of ATBH15 mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.* **42**: 84-94.
56. Kousik, C., Ritchie D. (1996). Race shifts in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* within a season in field-grown pepper. *Phytopathology.* **86**: 952–958.
57. Krawiec S. (1985). Minireview. Concept of a bacterial species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 217–220.
58. Lee Y., Sung A., Liu T., Lee Y. (2009). Combination of chromogenic differential medium and specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* **75**: 6831–6838.
59. Lelliot R., Stead D. (1987). *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* Blackwell Scientific Publications, 216.págs.
60. Lema, M., Velasco P., Soengas, P., Francisco, M., Cartea M. (2012). Screening for resistance to black rot in *Brassica oleracea* crops. *Plant Breeding.* **131**: 607–613.
61. Lopes, S., Damann, K., Grelen, L. (2001). *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on Rep-PCR fingerprint. *Curr. Microbiol. (LA).* **42**:155-159.

62. Louws F., Fulbright D., Taylor C., De Bruijn F. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:2286-2295.
63. Louws,F., Fulbright, D., Stephens, C., De bruij, F., (2009). Specific Genomic Fingerprints of Phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and Strains Generated with Repetitive Sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*. **60**: 2286-2295.
64. Lu, J., Perng, C., Lee, S., Wan, C. (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin.Microbiol.*, **38**:2076–2080.
65. Lupski J., Weinstock G. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* **174**: 4525-4529.
66. Luque, J., Herraéz, A. (2000). Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Editorial Harcourt. 1ra edición. Madrid. 469 págs.
67. Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A., Gabriel, D. (1994). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**:4094-4099.
68. Martínez L. (2009). Detección y caracterización molecular de *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* variedad fuscans, patógenos en frijol patógenos en frijol, mediante análisis de secuencias consenso (ERIC) y secuencias en mosaico del elemento BOX. Colombia. Editorial: BioSystems. 81.
69. Massomo S., Hanne N., Mansfield-Giese K., Mabagala R., Hockenhull J., Mortensen C. (2003). Identification and characterization of *Xanthomonas*

- campestris* pv. *campestris* from Tanzania by pathogenicity tests, Biology, Eric- and Box-PCR and fatty acid methyl ester analysis. *European Journal of Plant Pathology*. **109**: 775–789.
70. Mc Faddin J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia Clínica. *Médica Panamericana*. 851 págs.
71. Milgroom M., Fry W. (1997). Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Adv Bot Res*. 24: 1-30.
72. Millán O. (1999). Patotipos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, causante de la mancha bacteriana del tomate y chile en el Estado de Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa. 52 págs.
73. Moller E., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res*. 20: 6115-6.
74. Mullis K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. **262**: 56-65.
75. Munnecke D. (1954). Bacterial stem rot and leaf spot of *Pelargonium*. *Phytopathology*. **44**: 627-32
76. Murashigue, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.*, **15**:173-197.
77. Narayanasamy, P. (2011). Detection of Bacterial and Phytoplasmal Pathogens *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis* **2**: 5-169
78. Ordosgoitti, A., Manzano, A., Piñero, A. (1976). La escaldadura de la caña de azúcar en Venezuela. *Agron. Trop.*, **27**:235-249.
79. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Estadísticas de los cultivos más importantes del mundo. Disponible *on line* en: <http://www.fao.org> (20/10/2014).

80. Oropeza, M., Carballo, J., Alvez, B., Contreras, N., Alonso, G. (2008). Estandarización de técnicas moleculares para la detección de bacterias fitopatógenas asociadas al cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Mem. Inst. Biol. Exp., **5**:205-208.
81. Oropeza, M., Vargas, T., Menéndez, A., García, E. (2006). Guía de Prácticas Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Departamento de Botánica. 50 págs.
82. Pan, Y., Grisham, M., Burner, D. (1997). A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scalds disease. Plant Dis., **81**:189-194.188.
83. Pan, Y., Grisham, M., Burner, D., Legendre, B., Wei, Q. (1999). Development of Polymerase Chain Reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scalds disease. Plant Dis., **83**:218-222.
84. Park D., Shim J., Kim J., Lim C., Shresthab R., Hahn J., Kim H. (2006). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on rhs family gene sequences. Microbiological Research **164**: 36-42.
85. Patel, P., Walker J. (1963). Relation of air temperature and age and nutrition of the host to the development of halo and common bacterial blights of bean. Phytopathology. **53**: 407-411.
86. Pierce L., Schroth M., McCain A. (1990). Viscosity test for preliminary identification of strains of *Xanthomonas campestris*. Plant Disease. **74**: 646–647.
87. Pohronezny K., Violin R. (1983). The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes. Hort Science. **18**: 69-70.

88. Popovic, T., Josic, D., Starovic, M., Milovanovic, P., Dolovac, N., Postic D., Stankovic, S. (2013). Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* Strains isolated from cabbage, kale and broccoli.
89. Raina K., Chandlee J. (1996). Recovery of genomic DNA from a fungus (*Sclerotinia homoeocarpa*) with high polysaccharide content. *Biotechniques*. **21**: 1030-1032.
90. Ramos, R., Barbosa, E. (2005). Identificación de bacterias fitopatogénicas em Manual de práticas em fitobacteriología. 2ª Edição. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE – Brasil. 250 págs
91. Ricaud, C., Ryan, C. (1989). Leaf scald. In: Diseases of sugarcane. Major diseases. The Netherlands: Elsevier Science Publishers: 39-58.
92. Rivera G. (2007). Conceptos introductorios a la fitopatología. EUNED. Argentina. 346 págs.
93. Rodríguez, B. y López, M. (2009). Evaluación de la fertilización biológica del frijol con cepas nativas de *Rhizobium* aislados de un ultisol de la altiplanicie del estado Guárico. *Agronomía Tropical* **59(4)**:381-386.
94. Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, J. (2005). Bacteriología general: Principios y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. 481 págs.
95. Rodriguez, R., Grajales, A., Arrieta-Ortiz, M., Salazar, C., Restrepo, S., Bernal, A. (2012). Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiology*. **12**:43-54.
96. Rott, P., Fleites, L., Marlow, G., Royer, M., Gabriel, D. (2011). Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. *Molec. Plant-Microbe Interact*. **24**:594-605.

97. Ryan R., Vorhölter F., Potnis N y col. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. Nature reviews. Microbiology. **9**:344-355.
98. Saettler, A., (1989). Common bacterial blight. In: Schwartz H, Pastor-Corrales MA, eds. Bean production problems in the tropics. Cali, Columbia: CIAT, 261-283.
99. Sambrook, J., Russell, D. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition. 1500 págs.
100. Sanchez, T. (2011). Diagnóstico y caracterización molecular de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en variedades comerciales de caña de azúcar *Saccharum* spp., en Venezuela. Trabajo Especial de Grado para obtener el título de Doctor en Ciencias Agrícolas de la Universidad Central de Venezuela. 129 págs.
101. Schaad, N., Jones, J., Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS PRESS. Third Edition. Minnesota. 350 págs.
102. Silva, M., Bedendo, I., Casagrande, M. (2005). Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal escaldadura da cana de açúcar. Summa Phytopathol., **33**:341-347.
103. Sneath S., Jackson L., Young J., Daniels M. (1992). Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. Journal of General Microbiology. **139**: 1587–1594.
104. Stall, E., Beaulieu, C., Egel, S., Hodge, C., Leite, P., Minsavage, V., Bouzar, H., Jones, B., Alvarez, M., Benedict, A. (1994). Two genetically diverse

- groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Int J Syst Bacteriol **44**: 47–53.
105. Strider D. (1985). Geranium. In: Strider Diseases of Floral Crops) Praeger Publishers, New York. **2**:142–156
106. Swings, J., Civerolo, E. (1993). *Xanthomonas*. First edition. Chapman & Hall. London. 399 págs.
107. Takikawa Y. (2012). Studies on identification and taxonomy of plant pathogenic bacteria. J Gen Plant Pathol. **78**:409–412.
108. Taylor R., Tyson J., Fullerton R., Hale C. (2002). Molecular detection of exotic phytopathogenic bacteria: a case study involving canker-like symptoms on citrus. NZ Plant Prot. **55**:53–57.
109. Tsygankova S., Ignatov S. Boulygina A., Kuznetsov B., Korotkov E. (2004). Genetic relationships among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep-PCR primers. European Journal of Plant Pathology. **110**: 845–853.
110. Vauterin L, Yang P, Alvarez A, Takikawa Y, Roth DA, Vidaver AK, Stall RE, Kersters K, Swings J (1996) Identification of nonpathogenic *Xanthomonas* strains associated with plants. Syst. Appl. Microbiol. **19**:96–105.
111. Vauterin L., Swings J., Kersters M. (1990). Towards and improved taxonomy of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. **40**: 312–316.
112. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol., **45**:472-489.
113. Versalovic J., Kapur E., Mason O., Shah T., Koeth J., Lupski R., Musser, M. (1994). Penicillin resistant *Streptococcus pneumonia* strains recovered in Houston. Identification and molecular characterization of multiple clones. J. Infect. Dis. **167**:850–856.

114. Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6823–6831.
115. Vicente J., Conway J., Roberts S., Taylor J. (2001). Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Journal of Phytopathology.* **91**:492–499.
116. Vidaver, A., Lambretch, P. (2004). Las bacterias como patógenos vegetales. The Plant Health Instructor. Disponible *on line*: doi: 101094/PHI-I-2006-0601-01. (20/10/2014).
117. Vidhyasekaran, P., (2002) Bacterial disease resistance in plants: molecular biology and biotechnological applications. New York: Food Products Press. 452 págs.
118. Williams P. (1980). Black rot: A continuing threat to world crucifers. *Plant Disease.* **64**:736–745.
119. Young J., Dye D., Bradbury J., Robbs C. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z. J Agric. Res.* **21**: 153-177.
120. Zaccardelli M., Campanile F., Spasiano A., Merighi M (2007). Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene hrcC. *Eur J Plant Pathol.* **118**:299–306.
121. Zapata M., Gaud R. (2001). Estrategias para diferenciar *Xanthomonas campestris* pv.*phaseoli* con sales inorgánicas. *Agronomía mesoamericana* **12(1)**: 01-07.