

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Xanthomonas*
albilineans (ASHBY) DOWSON EN VARIEDADES COMERCIALES DE CAÑA DE
AZÚCAR *Saccharum spp.*, EN VENEZUELA.**

TIBAYDE M. SÁNCHEZ G.
TUTOR: DR. MIGUEL A. ARCIA

JULIO, 2011

DEDICATORIA

Todo se puede conseguir
Vuelve a empezar cada día

AGRADECIMIENTOS

Al emprender este desafío sabía que encontraría muchos obstáculos que me costarían sacrificios y esfuerzos, de no contar con ustedes no lograría este éxito alcanzado:

A Dios, que me ha dado sabiduría y perseverancia para lograr esta meta.

A toda mi familia, por su amor, comprensión, paciencia y apoyo en todo momento.

Al CDCH-UCV por el financiamiento económico recibido para el desarrollo del proyecto N° PI.01.00.6389/2006, “Diagnóstico y caracterización molecular de *Xanthomonas albilineans* (Sabih) Dowson en variedades comerciales de caña de azúcar *Saccharum officinarum* L.”, del cual formó parte esta investigación.

A la UCV-FAGRO por permitirme seguir mis estudios de posgrado.

Al Dr. Asdrúbal Arcia, por su tutoría, asesoramiento y paciencia durante el desarrollo de la tesis.

Al CIBA por permitirme desarrollar en sus laboratorios las pruebas moleculares finales.

A la UCLA, al laboratorio de Bacteriología del posgrado de Fitopatología; en especial a la Dra Nancy Contreras y el Ing. Nelson Rincón, por su disposición y ayuda incondicional.

Al INIA-CENIAP, a la Unidad de Biotecnología Vegetal, por permitirme desarrollar algunas técnicas moleculares y el uso de equipos especiales.

Al CEPESA, al laboratorio de Biotecnología y al equipo de campo para el diagnóstico fitopatológico.

A CENICAÑA por permitirme una pasantía profesional en sus laboratorios de Fitopatología y Biotecnología, donde logre el adiestramiento necesario para el desarrollo de protocolos.

Gracias, mil gracias a todos por creer en mí.....

Tibayde Sánchez

CONTENIDO	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO 1	
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPITULO II	
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. ESCALDADURA DE LA HOJA (LSD), <i>Xanthomonas albilineans</i> .	5
2.1.1. Agente causal y síntomas	5
2.1.2. Transmisión	9
2.1.3. Hospedantes	10
2.1.4. Distribución de la enfermedad	11
2.1.5. Importancia económica	13
2.1.6. Control de la enfermedad	14
2.1.7. Uso de variedades resistentes	15
2.2. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	17
BACTERIANA	
2.2.1. Pruebas culturales	17
2.2.2. Pruebas morfológicas	17
2.2.3. Pruebas fisiológicas, nutricionales y bioquímicas	18
2.2.4. Pruebas de patogenicidad	18
2.2.5. Pruebas serológicas: ELISA	19
2.2.6. Pruebas moleculares	20
2.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
2.3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	24
2.3.1. Dot Blot Immunoassay (DBIA): Manchado de membrana de nitrocelulosa.	26
2.3.2. Tissue Blot Immunoassay (TBIA): Impresión de tejidos en membrana de nitrocelulosa.	27

CAPITULO III

3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CULTURAL Y FISIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS VENEZOLANOS DE <i>Xanthomonas albilineans</i>	28
--	----

RESUMEN	28
---------	----

ABSTRACT	29
----------	----

3.1. INTRODUCCIÓN	30
-------------------	----

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	32
---------------------------	----

3.2.1. Colecta de los aislamientos bacterianos	32
--	----

3.2.2. Cultivo y preservación de los aislamientos bacterianos colectados	35
--	----

3.2.3. Caracterización cultural y morfológica	36
---	----

3.2.4. Caracterización fisiológica y bioquímica:	37
--	----

3.2.4.1. Prueba de KOH	38
------------------------	----

3.2.4.2. Prueba de determinación de temperatura óptima de crecimiento.	38
--	----

3.2.4.3. Crecimiento en caldo de cloruro de sodio.	39
--	----

3.2.4.4. Determinación de la relación con el oxígeno: Medio Hugh y Leifson.	39
---	----

3.2.4.5. Reacción básica en bactoagar dextrosa rojo fenol.	39
--	----

3.2.4.6. Prueba para presencia de oxidasa.	40
--	----

3.2.4.7. Prueba de catalasa.	40
------------------------------	----

3.2.4.8. Prueba para la hidrólisis de la gelatina.	41
--	----

3.2.4.9. Prueba para la hidrólisis de esculina.	41
---	----

3.2.4.10. Prueba para la hidrólisis del almidón.	42
--	----

3.2.4.11. Prueba para la hidrólisis de ureasa.	42
--	----

3.2.4.12. Prueba para la reducción de nitratos.	42
---	----

3.2.4.13. Utilización y/o fermentación de varios carbohidratos o compuestos relacionados.	43
---	----

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
----------------------------	----

3.3.1. Caracterización cultural y morfológica	43
---	----

3.3.2. Caracterización fisiológica y bioquímica	47
---	----

3.4 CONCLUSIÓN	49
----------------	----

CAPITULO IV

4. CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS VENEZOLANOS DE <i>Xanthomonas albilineans</i> SOBRE CULTIVOS DE CAÑA DE AZÚCAR	50
--	----

RESUMEN	50
---------	----

ABSTRACT	51
----------	----

4.1 INTRODUCCIÓN	52
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	55
4.2.1. Material vegetal a inocular	55
4.2.2. Identidad de los aislamientos colectados	55
4.2.3. Pruebas de patogenicidad	55
4.2.4. Pruebas de incidencia y severidad	57
4.2.5. Reaislamiento de la bacteria de plantas inoculadas	58
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
4.3.1. Pruebas de incidencia y severidad	59
4.3.2. Reaislamiento de la bacteria de plantas inoculadas	62
4.4 CONCLUSIONES	63
CAPITULO V	
5. CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS VENEZOLANOS DE <i>Xanthomonas albilineans</i> POR TÉCNICAS SEROLÓGICAS	64
RESUMEN	64
ABSTRACT	65
5.1. INTRODUCCIÓN	66
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	68
5.2.1. Prueba de aglutinación	68
5.2.2. Inmunodifusión (doble difusión en placa)	69
5.2.3. Elisa indirecta	70
5.2.4. Producción y purificación del antisuero CENICANÑA.	72
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
5.3.1. Prueba de aglutinación	74
5.3.2. Inmunodifusión (doble difusión en placa)	75
5.3.3. Elisa indirecta	75
5.4. CONCLUSIONES	76
CAPITULO VI	
6. DIAGNÓSTICO FITOPATOLÓGICO PARA <i>X albilineans</i> Y COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS SEROLÓGICAS	77
RESUMEN	77
ABSTRACT	78
6.1. INTRODUCCIÓN	79
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	81

6.2.1. Dot Blot Immunoassay (DBIA): Manchado de membrana de nitrocelulosa.	82
6.2.2. Tissue Blot Immunoassay (TBIA): Impresión de tejidos en membrana de nitrocelulosa.	82
6.2.3. Procedimiento para las membranas de nitrocelulosa	84
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
6.4. CONCLUSIONES	87
CAPITULO VII	
7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS VENEZOLANOS DE <i>Xanthomonas albilineans</i> .	88
RESUMEN	88
ABSTRACT	89
7.1 INTRODUCCIÓN	90
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS	97
7.2.1 Aislamientos bacterianos evaluados y extracción de ADN	97
7.2.2 Protocolo para la amplificación y visualización de marcadores moleculares ALA4/L1, PGBL1/PGBL2, U1/U2, OL1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e y BOX/ERIC.	98
7.2.3. Análisis y procesamiento de los datos	100
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
7.3.1. Cantidad, calidad y pureza del ADN extraído	100
7.3.2. Marcadores específicos para <i>Xanthomonas albilineans</i>	101
7.3.3. Estudios de diversidad	103
7.4 CONCLUSIONES	110
7.5. CONCLUSIONES GENERALES	110
7.6. BIBLIOGRAFÍA CITADA	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución mundial de la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> y los tres serovares reconocidos.	12
2	Aislamiento y prueba de patogenicidad en bacterias fitopatógenas	19
3	Amplificación in vitro y visualización en gel de agarosa	22
4	Procedimiento para la toma de muestra en el diagnóstico	34
5	Procedimiento para el aislamiento del agente causal	35
6	Dipping en aislamiento 53X de <i>Xanthomonas albilineans</i> . (a) célula en división celular y (b) observación de un flagelo por bastón bacteriano.	45
7	Colonias típicas de <i>Xanthomonas albilineans</i> : a) de aislamientos colectados en medios diferentes y b) detalles del estudio morfométrico.	45
8	Método de decapitado en prueba de patogenicidad en caña de azúcar	56
9	Reactivación de aislamientos de <i>Xanthomonas albilineans</i> en maíz dulce	59
10	Progreso de la escaldadura foliar en variedades inoculadas con <i>X. albilineans</i>	60
11	Amplificaciones obtenidas mediante PCR, para los nueve aislamientos	63
12	Prueba de aglutinación	69
13	Inmunodifusión (doble difusión en placa)	70
14	Elisa indirecta	72
15	Placa ELISA indirecta para los aislamientos de Aragua, Yaracuy y Lara	75
16	Procedimiento para la técnica Tissue Blot Immunoassay TBIA	83
17	Procedimiento para las membranas de nitrocelulosa	84
18	Amplificación de la región ARN 16S	101
19	SCAR ALA4/L1 específico para <i>X. albilineans</i>	102
20	SCAR PGBL1/PGBL2 específico para <i>X. albilineans</i>	103
21	SCAR OL1/Y2 específico para <i>Ralstonia solanacearum</i>	104
22	SCAR Xf1/Xf2 específico para <i>X. c. pv. phaseoli var fuscans</i>	104
23	SCAR X4c/X4e específico para <i>X. c. pv. phaseoli</i>	105
24	PCR anidada de BOX/ERIC	105
25	Dendograma de SCAR OLI1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e y BOX-ERIC no	106

	específicos para <i>X. albilineans</i>	
26	Dendograma obtenido con los resultados de los SCARs: OLI1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e	107
27	Dendograma con la mezcla de iniciadores BOX/ERIC y SCAR ALA4/L1	108
28	Dendograma sólo SCAR ALA4/L1	109
29	Dendograma SCARs: OLI1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e, BOX/ERIC, ALA4/L1	109

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales hospederos alternativos de <i>Xanthomonas albilineans</i>	11
2	Variedades de caña de azúcar muestreadas y su ubicación geográfica	32
3	Sintomatología de las variedades de caña de azúcar muestreadas	34
4	Identificación de aislamientos colectados y purificados	44
5	Longitud de las células bacterianas en aislamientos evaluados	46
6	Características fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos evaluados	48
7	Escala logarítmica para evaluar severidad de <i>X. albilineans</i> en caña de azúcar	58
8	Incidencia máxima y severidad de escaldadura foliar en plantas inoculadas	59
9	Dinámica poblacional de los aislamientos de <i>X albilineans</i> evaluados, bajo condiciones de invernadero ($\times 10^7$ ufc g^{-1} de tejido fresco después de 35 ddi)	61
10	Especificidad del antisuero contra <i>X albilineans</i> preparado en Cenicaña	73
11	Titulación de antisueros contra <i>X albilineans</i> preparado en Cenicaña	74
12	Comparación de los porcentajes de detección de los métodos de DBIA y TBIA con relación a aglutinación y ELISA indirecta	86
13	Sensibilidad para pruebas de diagnóstico	87
14	Ordenamiento de los aislamientos en los geles de PCR	98
15	Primers utilizados en la PCR	99
16	Programas de amplificación	100

DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DOWSON EN VARIEDADES COMERCIALES DE CAÑA DE AZÚCAR *Saccharum spp.*, EN VENEZUELA.

RESUMEN

Además de su valor alimenticio, la caña de azúcar es también una importante fuente nueva de energía natural y renovable, que es importante preservar. A nivel mundial se ha incrementado considerablemente el número de patógenos en este cultivo, la escaldadura foliar es considerada una enfermedad bacteriana de importancia potencial sobre la cual se deben profundizar sistemas de caracterización, además se debe mantener una vigilancia permanente y atención sistemática. Por problemas para detectar confiablemente al organismo en su forma latente, en el presente estudio se realizó una caracterización cultural, morfológica, fisiológica, patogénica, serológica y molecular de diferentes aislamientos venezolanos colectados de plantaciones comerciales afectadas por la bacteria *Xanthomonas albilineans* en Aragua, Yaracuy y Lara. Los resultados obtenidos han permitido generar información y conocimiento sobre su diversidad molecular y patogénica en el país, lo que servirá para afianzar su uso en programas de mejoramiento genético y mejorar los controles fitosanitarios. Además, los aislamientos estudiados se mantienen en colección de cultivos viables a fin de constituir una base para futuras investigaciones. Con la ELISA indirecta, TBIA y DBIA se pudo detectar la presencia del agente causal en la savia cruda de plantas inoculadas, todos los métodos mostraron buena especificidad y sensibilidad; pero es la PCR simple la técnica más precisa, usando cebadores específicos y no específicos para la escaldadura de la hoja en caña de azúcar; se procedió a amplificar con diferentes marcadores moleculares: ALA4/L1, PGBL1/PGBL2, U1/U2, OL1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e y BOX/ERIC. Se observaron bandas de diferentes tamaños en los fragmentos amplificados.

**DIAGNOSTICS AND CHARACTERIZATION MOLECULAR THE *Xanthomonas*
albilineans (ASHBY) DOWSON IN VARIETIES COMMERCIALS THE
SUGARCANE *Saccharum spp.*, IN VENEZUELA.**

ABSTRACT

In addition to its food value, sugar cane is also a major new source of natural and renewable energy, which is important to preserve. At the global level has increased considerably the number of pathogens in this culture, the leaf scald is considered a bacterial disease of potential importance on which it must deepen characterization systems, also keep a permanent monitoring and routine care. Problems to detect reliably to the organism in its latent form, in the present study was carried out a characterization cultural, morphological, physiological, pathogenic, serological and molecular different venezuelan isolates collected from commercial plantations affected by the bacterium *Xanthomonas albilineans* in Aragua, Yaracuy and Lara. The results obtained have enabled to generate information and knowledge about its pathogenic and molecular diversity in the country, which will serve to consolidate their use in genetic improvement programmes and improving plant health controls. In addition, studied isolates remain viable culture collection in order to provide a basis for future research. With the indirect ELISA, TBIA and DBIA is able to detect the presence of the causative agent in inoculated plants raw SAP, all methods showed good specificity and sensitivity; but the simple PCR technique is more accurate, using non-specific and specific primers for the leaf scald in sugar cane; proceeded to amplify with different molecular markers: ALA4/L1, PGBL1/PGBL2, U1/U2, OL1/Y2, Xf1 Xf2, X4c/X4e and BOX/ERIC. There were bands of varying sizes in the amplified fragments.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

En el Trópico la caña de azúcar tiene gran importancia económica, ya que es cultivada por sus tallos que acumulan sacarosa y porque contribuye con el 60 por ciento del azúcar producida alrededor del mundo (Grivet y Arruda, 2001), se cultiva con fines comerciales en más de 90 países, ocupando alrededor de 20 millones de hectáreas; donde se producen algo más de 1.327 millones de toneladas de caña por año, de ellas se extraen unos 28 millones de toneladas de azúcar y 15 millones de litros de alcohol. De igual manera, se obtienen alrededor de 243 millones de toneladas de unos 50 subproductos con un alto valor comercial y se generan más de 2,5 millones de empleo (China, M., 2004; FAO, 2007).

Todas estas cifras ponen de manifiesto la gran importancia económica y social de la agroindustria azucarera, muy a pesar de las condiciones de los bajos precios del azúcar en el mercado mundial; que requiere de toda la tecnología para lograr la más alta productividad en el sector azucarero.

En la búsqueda de esa productividad, las enfermedades constituyen el factor negativo más importante, ya que en los últimos años se ha incrementado, considerablemente, el número de patógenos detectados sobre este cultivo y se han extendido, de forma notable, los que existían con anterioridad (Rott et al., 1995).

Para mitigar los efectos nocivos que producen las enfermedades ha sido necesario realizar cambios sustanciales en la composición varietal de las plantaciones cañeras y establecer líneas de mejora genética con el objeto de obtener nuevas variedades con los niveles de resistencia requeridos y altos potenciales de rendimiento agroindustrial.

La mayoría de los programas de mejoramiento genético de caña de azúcar nacieron en respuesta a la necesidad de producir variedades resistentes a las enfermedades que atacan el cultivo. El programa venezolano no es la excepción, es por ello que la resistencia a enfermedades es uno de los principales criterios de selección dentro de la biodiversidad existente.

Pero con el uso de la ingeniería genética como una nueva herramienta técnica, se ha intervenido la constitución genética de muchos organismos (entre ellos plantas y patógenos) durante muchos años; históricamente, los impactos más significativos han sido en la agricultura, en ese sentido una primera estrategia para la conservación de la biodiversidad es conocerla ya que proporciona recursos de sostenibilidad para la agricultura en el desarrollo científico y económico de un país. Es claramente aceptado que dentro de la diversidad biológica el componente microbiano es uno de los más desconocidos, a pesar de ser uno de los más numerosos y esencial.

A nivel mundial se ha incrementado considerablemente el número de patógenos en este cultivo, aparecen registradas 114 enfermedades de origen parasitario y 25 no parasitarias, dentro de las primeras los hongos ocupan el primer lugar (86 patógenos diferentes) y el segundo las bacterias (12 patógenos diferentes); éstas son muy difíciles de controlar y erradicar en los campos infectados, (Rott et al., 1995).

En Venezuela están señaladas, hasta el presente, 21 enfermedades en caña de azúcar, de éstas una es de origen viral, cuatro son causadas por bacterias y 16 son de origen fúngico; en los últimos años se han destacado por su influencia negativa en el rendimiento, la escaldadura foliar y el raquitismo de las socas, que son de origen bacteriano (Aponte y Ordosgoitti, 1991).

Dentro de las enfermedades bacterianas más relevantes tenemos la escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans*) y el raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli subsp. xyli*), ambas ocasionan pérdidas significativas en la producción azucarera; la escaldadura

foliar (LSD por sus siglas en inglés, leaf scald disease) es considerada una enfermedad de importancia potencial sobre la cual se deben profundizar y desarrollar investigaciones, además se debe mantener una vigilancia permanente y atención sistemática.

La escaldadura foliar se ha dispersado por diferentes zonas geográficas de Asia, Antillas, África y Australia, se encuentra presente desde hace varios años en los países vecinos Panamá, Colombia y Ecuador; se detecta por primera vez en Venezuela en 1975, en los estados Aragua y Portuguesa (Ordosgoitti y col., 1977).

Actualmente se ha reportado en los estados Lara y Yaracuy con una mayor incidencia y severidad en la variedad CC 85-92 y menor incidencia y severidad en la variedad CP 74-2005 (Jiménez, 2004). En el estado Portuguesa, aunque esporádicamente, dicha enfermedad se ha determinado causando problemas en las variedades CC85-92, RB 85-5536 y SP 70-1284 (Cova y col., 2005).

En el país, se reportan pocos estudios sobre el diagnóstico y detección de esta enfermedad (Jiménez, 2004, Béres y col., 2005) que tiene una incidencia alarmante, que produce diversas sintomatologías y puede permanecer latente por mucho tiempo; causando en su fase aguda hasta un 90% de pérdidas en las variedades susceptibles (Díaz y col., 2004). Se dice que esta enfermedad muestra nuevos brotes en todo el Caribe y mundialmente se han determinado tres variantes serológicas y once grupos genómicos a nivel molecular (Díaz y Peralta, 2004).

Dado que la escaldadura foliar tiene un efecto directo en el rendimiento azucarero, por reducir el peso de las cañas y su porcentaje de brix en los jugos en variedades susceptibles; y a su vez un efecto indirecto, al generar costos por renovar variedades promisorias, problemas cuarentenarios y la imposibilidad de incrementar una variedad nueva por su susceptibilidad, es necesario investigar en la identificación, caracterización y patogenicidad de su agente causal.

Por problemas para detectar confiablemente al organismo en su forma latente y no contar en la actualidad con un sólo método (sistema dual térmico) de erradicación aceptable, es necesario conocer más del agente causal y nos obliga a probar nuevas técnicas, más precisas, sensibles y complementarias como las serológicas y moleculares para un mejor diagnóstico y caracterización de esta enfermedad bacteriana.

En el presente estudio se realizó una caracterización cultural, morfológica, fisiológica, patogénica, serológica y molecular de diferentes aislamientos venezolanos, colectados de plantaciones comerciales afectadas por la bacteria *Xanthomonas albilineans* en Aragua, Yaracuy y Lara.

Los resultados obtenidos han permitido generar información y conocimiento sobre la diversidad molecular y patogénica de *Xanthomonas albilineans* en tres zonas cañeras del país, lo que servirá para afianzar su uso en programas de mejoramiento genético y mejorar los controles fitosanitarios. Además, los aislamientos estudiados se mantienen en colección de cultivos viables a fin de constituir una base para futuras investigaciones.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ESCALDADURA DE LA HOJA, *Xanthomonas albilineans*.

La escaldadura foliar, LSD (por sus siglas en inglés, leaf scald disease), es considerada una enfermedad de importancia potencial por las pérdidas que ocasiona en la fase aguda, estimadas entre el 90 – 100% (Ricaud y Ryan, 1989).

2.1.1. Agente causal y síntomas

La escaldadura foliar es causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, fue identificada en la segunda década del siglo pasado por Wilbrink en Java (Wilbrink, 1920) y North en Australia y Fiji (North, 1926).

Según la clasificación actual de los seres vivos (Woese et al., 1990; Maidak et al., 1999), el dominio Bacteria está dividido en 13 grupos clasificados (Madigan et al., 2000), dentro de los cuales Proteobacteria, contiene un gran número de bacilos y cocos Gram negativos y engloba a la mayoría de las bacterias fitopatógenas (Cório da Luz, 2000).

El género *Xanthomonas*, comprende un grupo de bacterias fitopatógenas de gran importancia económica, y se caracteriza por presentar una sorprendente diversidad patogénica y una contrastante uniformidad fenotípica (Dye, 1962; Van den Mooter y Swings, 1990; Yang et al., 1993a), lo cual ha provocado que sea objeto de múltiples estudios taxonómicos. Los estudios relacionados con su taxonomía, se han basado en métodos tradicionales como los bioquímicos y fisiológicos, de patogenicidad y más recientemente los moleculares (Graham et al., 1990; Van den Mooter y Swings, 1990;

Palleroni y Bradbury, 1993; Palleroni et al., 1993; Vauterin et al., 1993; Yang et al., 1993b; Jansen et al., 1996).

Muchos estudios se han orientado hacia delimitar los alcances de la definición de especies dentro del género, usando técnicas de "fingerprinting" (huella digital del ADN) como electroforesis de las proteínas de la célula y cromatografía de gas de los ácidos grasos. Estas técnicas combinan varias ventajas:

- ✚ Analizan gran cantidad de muestras, lo que es necesario para obtener un panorama más preciso.
- ✚ Evitan errores del uso de una sola técnica por la comparación con más de una técnica de huella genómica.
- ✚ Se establecen relaciones genómicas entre grupos (Rott y Davis, 2000).

Desde el punto de vista evolutivo, *X. albilineans* se encuentra entre el grupo de *Xanthomonas campestris*, un grupo de bacterias que infecta a varios cientos de plantas de zonas templadas y tropicales y *Xylella fastidiosa*, una bacteria que ataca a numerosas plantas como: el café, las uvas, árboles frutales (cítricos, almendras, aceitunas), árboles y arbustos decorativos (roble, arce, laurel).

Según la clasificación actual, la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson quedaría catalogada así:

Dominio: Bacteria

Reino: Protista

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Género: Xanthomonas

Especie: *Xanthomonas albilineans* (Ashby 1929) Dowson 1943

Es la clasificación taxonómica aceptada hasta ahora (DSMZ, 2004), considerándola una bacteria aeróbica, gram – negativa, típico bacilo móvil con un flagelo polar, bajo condiciones naturales solamente ataca a cultivos de caña de azúcar, usualmente se le consigue afectando a malezas gramíneas propias de este cultivo.

Basándose en la matriz de homología determinada por hibridación del ADN, fueron diferenciados 20 grupos, considerados como especies genómicas del género *Xanthomonas*, entre las cuales se mantuvo *Xanthomonas albilineans* como una especie bien diferenciada del resto. Sin embargo, algunos de los otros grupos no se correspondieron consistentemente con la clasificación anterior como patovares, siendo descritos como nuevas especies (Vauterin et al., 1995, 2000; Vauterin y Swings, 1997; Díaz, 2000).

Desde la reclasificación realizada por Dowson en 1943, donde todas las bacterias pigmentadas de amarillo, patógenas a plantas y con un simple flagelo polar fueron agrupadas bajo el género *Xanthomonas*, el patógeno de la escaldadura foliar se ha mantenido con el nombre de *Xanthomonas albilineans*. No obstante, ha aparecido en la bibliografía internacional con otras denominaciones: *Bacterium albilineans* Ashby, *Agrobacterium albilineans* (Ashby) Savulescu, *Phytomonas albilineans* (Ashby) Magrou, *Pseudomonas albilineans* (Ashby) Krasil'nikov, *Xanthomonas albilineans* var *paspali* Orian y *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson (Dye y Lelliott, 1974; Bradbury, 1986; DSMZ, 2004).

Su diagnóstico puede ser difícil debido a que presenta estados diferentes de infección:

- ✚ Fase crónica: presenta el síntoma clásico caracterizado por estrías continuas blancas y finas, bien definidas, de 1-2 mm de ancho, manifiesta una o varias estrías paralelas a lo largo de toda la hoja, algunas veces pueden llegar hasta la vaina, en ocasiones las estrías blancas pueden presentar partes con necrosis rojiza, en una misma cepa pueden presentarse tallos sanos y tallos infectados,

tallos maduros pueden presentar “lalas” o brotes laterales con hojas cloróticas y estrías características, internamente los tallos afectados pueden presentar rayas cortas de color rojo oscuro debido a la necrosis de los haces vasculares, preferiblemente a nivel de los nudos.

- ✚ Fase aguda: caracterizada por la muerte súbita de la planta sin que ésta haya presentado síntomas crónicos, en ocasiones los tallos afectados presentan pequeños brotes laterales con estrías típicas de la enfermedad, esta fase generalmente ocurre cuando la caña ha pasado por condiciones de tiempo seco seguido por un período lluvioso.
- ✚ Fase latente: en este caso no se observan síntomas en el follaje que permitan sospechar la presencia de la bacteria causal en los tejidos internos, generalmente se presenta en variedades resistentes o tolerantes (Victoria, 1994; China y col., 2000; China, 2004).
- ✚ Fase eclipse: ocurre al mismo tiempo que la fase de latencia; durante el crecimiento de la planta, aparecen y desaparecen líneas blancas foliares que dejan de ser visibles después de la senescencia y la muerte de las hojas más viejas, mientras que las hojas nuevas ya no presentan ningún síntoma. Así, una planta puede ser señalada enferma o sana según el momento de la inspección (Martín et al., 2000).

La variabilidad de los síntomas producidos por el patógeno puede estar dada por diferentes factores, como la reacción varietal, la cepa bacteriana en particular, su concentración, las condiciones edafo-climáticas y la acción conjunta de todos ellos (Birch y Patil, 1987a; Martín et al., 2000; Guzman et al., 1996).

2.1.2. Transmisión

El principal método de transmisión consiste en la utilización de semilla infectada y al empleo de herramientas infestadas, sobre la cual se ha comprobado que el patógeno permanece viable por seis días; se ha comprobado que en la mayoría de los casos la bacteria presente en los esquejes para la siembra resiste los tratamientos de termoterapia empleados para el control del raquitismo de la soca (Cenicaña, 1998).

Una vez infectadas las herramientas, éstas transmiten con relativa facilidad la bacteria causal de la enfermedad a tallos sanos. La propagación de la bacteria ocurre durante el corte de la caña debido al uso de machetes contaminados y cosechadoras mecánicas cuyas cuchillas se contaminan fácilmente al cortar tallos enfermos, convirtiéndose en excelentes diseminadoras de la bacteria hacia tallos sanos (Cenicaña, 1998). Se han evaluado diferentes sistemas que permiten, por un lado generar esquejes limpios (sistema dual térmico) y por el otro evitar la transmisión de la bacteria (Cenicaña, 1997).

En la fase de latencia y eclipse constituye un factor fundamental de dispersión de esta enfermedad el uso de esquejes, instrumentos de corte y maquinarias agrícolas infectados (Ricaud y Ryan, 1989). Otra forma de diseminación lo constituye el agua de riego superficial utilizada en plantaciones afectadas (Cenicaña, 1997).

Se ha demostrado además su transmisión de una planta a otra por contacto de los exudados de las raíces y a través del agua del suelo, aunque al parecer la bacteria es incapaz de sobrevivir en el suelo por largos períodos de tiempo (Rivera, 1985; Martín et al., 2000).

La bacteria puede encontrarse en la superficie de las hojas con síntomas y se ha señalado que también coloniza la inflorescencia de la caña, pudiendo diseminarse mediante la lluvia, el rocío, los insectos, el contacto entre las hojas y el aire (Autrey et

al., 1995a; Daugrois et al., 2003, 2005; Klett y Rott, 1994; Saumtally et al., 1998). Recientemente se ha demostrado en Mauricio que las epidemias producidas estaban relacionadas con la propagación aérea de nuevas variantes del patógeno (Autrey et al., 1995a).

2.1.3. Hospedantes

El principal hospedante natural de *Xanthomonas albilineans* es la caña de azúcar (*Saccharum* sp., híbrido interespecífico). Otras especies de este mismo género han sido identificadas como hospedantes de este patógeno bacteriano (*S. officinarum*, *S. edule*, *S. robustum* y *S. spontaneum*) (Rott et al., 1988). La reacción varietal de la caña de azúcar frente a *Xanthomonas albilineans* es diversa, habiéndose descrito cambios en el comportamiento de una misma variedad en diferentes países y reacción diferencial de algunas de ellas frente a los aislamientos del patógeno (Ricaud y Ryan, 1989).

En muchos países se registran diferentes gramíneas (Poaceas) como hospedantes naturales de la bacteria, pero se han detectado hospedantes alternativos o secundarios del patógeno, tanto en infecciones naturales como artificiales (Rott et al., 1988), entre los cuales podemos indicar algunas, en el Cuadro 1.

Aparentemente la bacteria puede sobrevivir por mucho tiempo en estas gramíneas y constituirse en fuente de inóculo para la caña de azúcar (Birch, 2001).

Diferentes variedades de maíz han sido utilizadas como plantas indicadoras para la reproducción de los síntomas de escaldadura foliar, por lo que se ha establecido como un método práctico y seguro para comprobar la patogenicidad de *Xanthomonas albilineans* (Rivera, 1985; Tokeshi, 1997).

Cuadro 1. Principales hospederos alternativos de *Xanthomonas albilineans*.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN
<i>Paspalum virgatum</i>	Gamelote
<i>Paspalum conjugatum</i>	Yagua
<i>Brachiaria fasciculata, Brachiaria piligera</i>	Granadilla
<i>Bambusa vulgaris</i>	Bambú
<i>Panicum maximum</i>	Pasto guinea
<i>Pennisetum purpureum</i>	Pasto elefante
<i>Rottboellia exaltata</i>	Paja peluda
<i>Sorghum halepense, S. verticilliform</i>	Sorgo Alepo, Falso Johson
<i>Coix lacryma-jobi</i>	Lágrimas de San Pedro
<i>Cymbopogon citratus</i>	Limoncillo
<i>Imperata cylindrica</i>	Hierba Luisa
<i>Thysanolaena agrostis</i>	Tisanolaena
<i>Zea mays</i>	Maíz

2.1.4. Distribución de la enfermedad

La enfermedad está presente en todos los continentes y en la mayoría de las países productores de caña de azúcar, tales como: África del Sur, Australia, Brasil, Estados Unidos, Guadalupe, India, Islas Reunión y Papua Nueva Guinea; los cuales la han referido recientemente como una de las principales enfermedades que afectan la producción cañera en esas regiones (Alexander et al., 1996; Bailey et al., 1996; Burnquist et al., 1996; Comstock et al., 1996; Croft et al., 1996; Rott et al., 1996b; Suma et al., 1996).

En la actualidad la escaldadura se ha identificado en 65 zonas geográficas diferentes a nivel mundial (Rott y Davis, 2000; Díaz, 2000) y se han reconocido tres serovares : I, II y III, dispersos en todos los continentes (ver Figura 1); de donde, hasta ahora sólo

el serovar II es exclusivo de los países africanos, un gran grupo disperso lo ocupa el serovar I también llamado “Mascarenas” y un pequeño grupo constituido por el serovar III diseminado por algunas islas del Caribe, Oceanía y Asia (Rott et al., 1997; Rott y Davis, 2000; Comstock y Lentini, 2005).

La tradicional forma de propagación en el cultivo, por esqueje, ha sido un factor determinante en la diseminación de esta enfermedad, esquejes de tallos aparentemente sanos pero infectados representan una importante fuente de inóculo primario de esta bacteria (Swings y Civerolo, 1993).



Figura 1. Distribución mundial de la bacteria *Xanthomonas albilineans* y los tres serovares reconocidos: I, II y III.

Esta enfermedad se encuentra presente desde hace varios años en los países vecinos Panamá, Colombia y Ecuador, de igual manera se ha dispersado por diferentes zonas geográficas de Asia, Antillas, África y Australia (Birch, 2001).

La escaldadura foliar es la enfermedad de la caña de azúcar de más reciente reporte en Colombia, en las regiones de Codazzi en el Cesar (1993) y en Vegachí, Antioquia (1994); hasta 1994 la misma no se había observado en la región del Valle del Cauca,

sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que aparezca en un futuro cercano debido al frecuente intercambio de personal y equipos entre zonas afectadas y el resto del país (Cenicaña, 1997).

En Colombia la escaldadura se encuentra plenamente establecida en diversas plantaciones, en especial en las variedades CP 72-356, NCo310, MZC 74-275, Azul de Casagrande (sólo fase crónica), CC 84-75 y CC 85-63 (fases crónica y aguda), es posible que la afección haya estado latente en algunas zonas desde hace algún tiempo y tan solo ahora fueran evidentes los síntomas en su fase crónica ante la presencia de variedades susceptibles (Cenicaña, 1997).

Fue a principio de los años 70 cuando se presentaron los primeros síntomas de la escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) en parcelas experimentales ubicadas en el sistema de riego de Las Majaguas, en el estado Portuguesa, pero es hasta 1975 cuando se reporta por primera vez en Venezuela la escaldadura foliar, en los estados Aragua y Portuguesa (Ordosgoitti y col., 1977).

2.1.5. Importancia económica de la enfermedad

El daño económico de esta enfermedad en la producción azucarera va a depender mucho del nivel de susceptibilidad de la variedad afectada, así como también de las condiciones ambientales existentes en la zona y de la virulencia que presente el organismo causal (Ricaud y Ryan, 1989).

La enfermedad se ha observado con mayor severidad en variedades susceptibles sembradas en zonas con altas precipitaciones y sobretodo cuando éstas siguen de un período de sequía, en contraste con los efectos producidos en zonas de ambiente estable donde la enfermedad no reviste mayor importancia, principalmente en variedades con cierto nivel de resistencia (Ricaud, 1975).

En aquellas zonas en donde la enfermedad ha tenido condiciones favorables para su desarrollo se han presentado reducciones significativas en la producción, principalmente cuando las variedades afectadas son susceptibles.

No existe una información precisa sobre la disminución en la producción, ocasionada por la escaldadura, de acuerdo con experimentos preliminares en Colombia, la producción disminuye de acuerdo al nivel de susceptibilidad de las variedades y la incidencia en semilleros y lotes comerciales del Valle del Cauca fue de 2,1% y 0,7% respectivamente (Cenicaña, 2002).

Además del efecto en la producción, la calidad de los jugos se ha visto seriamente deteriorada, tanto por reducciones en el Brix como en la pureza, efectos estrechamente correlacionados con el nivel de infección (Cenicaña, 2002).

Pareciera que la enfermedad no incide directamente sobre el tonelaje de caña, sino sobre la concentración de azúcares (sacarosa), la cual disminuye hasta un 30 % en los casos más graves (Cenicaña, 2002).

2.1.6. Control de la enfermedad

La propagación vegetativa de la caña de azúcar, así como la permanencia de plantaciones viejas con una misma variedad, hacen menos factible el control de esta enfermedad. Cuando la enfermedad no está presente en una zona geográfica, las medidas de exclusión relacionadas con la cuarentena externa son las más indicadas. El intercambio seguro de material vegetal, en especial de los esquejes, constituye un aspecto clave en este sentido (Frison y Putter, 1993).

Para la obtención de material libre de la enfermedad, se utiliza el tratamiento hidrotérmico de los esquejes y el cultivo de meristemos, aunque su efectividad no es alta (Frison y Putter, 1993; Peralta et al, 1997). Es por ello que estas medidas deben

ser complementadas con otras profilácticas como la eliminación del material enfermo y la desinfección de los instrumentos de corte por remojo y cepillado en un producto bactericida (Rott, 1995).

Otro método de saneamiento para el control de la escaldadura foliar lo constituye remojar previamente los esquejes de caña en agua a temperatura ambiente con recambio cada 12 horas, seguida de un tratamiento hidrotérmico de 51°C / 1 hr (Díaz y Peralta, 2004).

La mejor manera de controlar la enfermedad es mediante la implementación de una estrategia integral de varios sistemas que involucre a las siguientes medidas:

- ✚ Empleo de variedades resistentes
- ✚ Adecuada selección de material sano de siembra
- ✚ Entresaque de material enfermo en los semilleros
- ✚ Desinfección frecuente de las herramientas utilizadas en corte
- ✚ Utilizar el sistema dual térmico como pre-tratamiento en la semilla

Actualmente a nivel de zonas cultivadas no se utiliza ningún control químico. En las zonas ya afectadas, el uso de variedades resistentes o tolerantes a la enfermedad es lo más efectivo, junto al control de la introducción y diseminación de nuevas cepas de la bacteria y el uso de material de siembra sano (Saumtally et al., 1998).

2.1.7. Variedades resistentes

La ingeniería genética es una nueva alternativa de control para esta enfermedad, recientemente, investigadores obtuvieron plantas transgénicas de caña de azúcar que expresaban el gen (albD), con una capacidad de detoxificación equivalente a 1-10 ng de enzima/mg de proteína foliar, capaz de inhibir la manifestación de los síntomas, mientras los controles no transformados desarrollaron síntomas foliares severos y se

demonstró que los aislamientos toxigénicos no se multiplicaban en las plantas transformadas, lo que constituirá en el futuro una vía de obtención de variedades resistentes a la enfermedad, método más apropiado para su control (Zhang et al., 1999).

El uso de variedades resistentes parece ser el mejor método de control, ya que una disminución de la enfermedad en otros países (Australia, Guadalupe y México) fue relacionada con un incremento en variedades resistentes (Rott et al., 1995; Huerta y col., 2003b).

Variedades con altos niveles de resistencia en Venezuela: B 62163, B 74254, B 77190, B 77600, B 77713, CL 41223, COMUS, CP 721210, CR 6302, CR 63207, CR 69177 MY 5514, PR 1028, V 76-1, V 76-2, V 76-6, V 76-7, V 76-8, V 76-10, V 76-11, V 76-12, V 76-18, V 76-19, V 77-9, V 78-2 (Aponte y Ordosgoitti, 1991).

Variedades con altos niveles de susceptibilidad en Venezuela: B 6623, B 6749, B75403, CB 4511, CO 281, CP 5268, CP 6337, CP 70321, CP 70330, CP 741095, CP 74207, CR 6101, CR 63210, NA 5679, PR 960, PR 1013, PR 62258, SAIPAN 17, US 59161, V 60-3, V 64-4, V 64-14, V 66-25, V 68-78, V 76-14, V 76-15, V 77-11, V 77-12, V 78-2 (Aponte y Ordosgoitti, 1991).

V 71-51, RD 75-11, PR 61-632, Co 740, CC 87-434, CC 87-474, CC87-409 y CC 87-473; son variedades resistentes a escaldadura foliar en investigaciones en Colombia, CC 85-68 en grado intermedio y casos puntuales de alta incidencia en las variedades: CC 85-92, CC 84-75, MZC 74-275, CC 85-63, Mex 68-808 y CP 72-356 (Cenicaña, 2002).

2.2. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA

2.2.1. Pruebas culturales

Son todas aquellas características estudiadas a través de la observación visual bajo lupas estereoscópicas y microscopio óptico de colonias formadas sobre medios nutritivos de rutina, enriquecidos o diferenciales.

Esas colonias pueden formarse en cápsulas de petri o tubos inclinados, según las características que se deseen observar, por ejemplo, en cápsulas se puede observar: tamaño, consistencia, bordes, elevación, forma, pigmentaciones y otros detalles ópticos; pero en tubos con colonias estriadas pueden ser observadas: tipo y cantidad de crecimiento, márgenes y bordes, consistencia y cromóforos (Ramos y Barbosa, 2005).

Las colonias de las bacterias aisladas en medio de Wilbrink modificado incubado a 28° C, después de cuatro días fueron de color amarillo pálido, brillante, pequeño, convexo y no mucoides (Davis et al., 1994), resultados similares fueron encontrados por otros investigadores en Venezuela (Jiménez, 2004).

2.2.2. Pruebas morfológicas

Son las estudiadas a través de la observación de la célula bacteriana en microscopio óptico o electrónico mediante el uso de coloraciones, las más comunes son: tamaño, forma, arreglos, flagelación, presencia de endospora, presencia de cápsula, gránulos de sustancias de reserva, reacción de Gram.

2.2.3. Pruebas fisiológicas, nutricionales y bioquímicas

Son todas aquellas características que se interrelacionan entre ellas y con otras pruebas demostrando lo complejo y dinámico que es un organismo bacteriano.

Existen muchas pruebas en este sentido, reconociendo las más importantes dentro de las fisiológicas como: sus relaciones con el oxígeno, la temperatura y el pH; las nutricionales como: el uso de compuestos como CO₂, aminoácidos, fuentes de carbono, de nitrógeno, entre otros; y las bioquímicas como: la licuefacción de la gelatina, reducción de nitratos, fermentación de carbohidratos, entre otros.

2.2.4. Pruebas de patogenicidad

Son extremadamente importantes en la identificación de bacterias fitopatogénicas, principalmente de patovares, puesto que esta clasificación esta basada en la patogenicidad de aislamientos sobre un grupo determinado de hospederos (Ramos y Barbosa, 2005). Ver procedimiento en la Figura 2.

El tipo de prueba de patogenicidad a ser usado va a depender del tipo de la bacteria en estudio, por ejemplo, en *Xanthomonas* se ha recomendado para su inoculación hacerlo por aspersión o inyección (Ramos y Barbosa, 2005) y específicamente con *Xanthomonas albilineans* se usa la técnica de decapitado y encapsulado con aluminio (Victoria y Guzmán, 1998).

2.2.5. Pruebas serológicas: ELISA

La utilidad de la serología como una herramienta para la identificación de patógenos bacterianos cobra mucha importancia en los últimos años, es el método conocido más fácil para la identificación precisa de bacterias creciendo en medios con agar (Saettler et al., 1989).

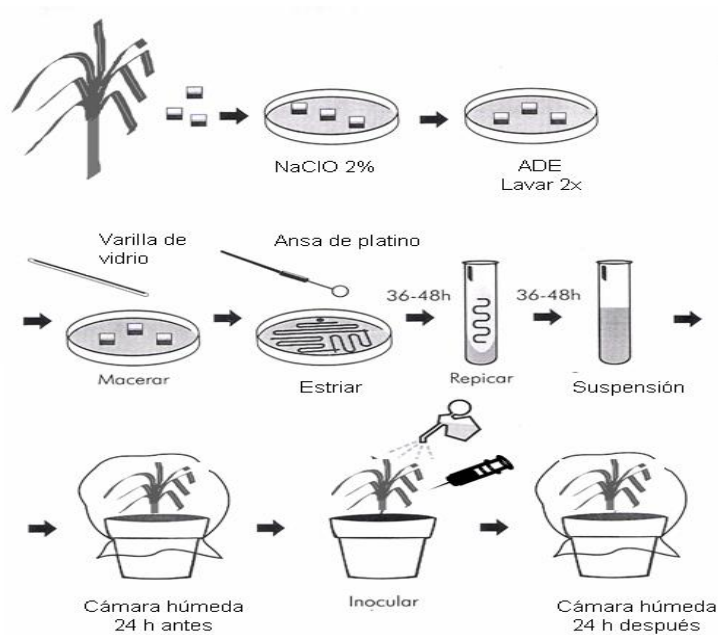


Figura 2. Aislamiento y prueba de patogenicidad en bacterias fitopatógenas.
Fuente: Ramos, R., Barbosa, E. 2005.

Está basada en relaciones específicas entre antígeno y antisuero, cuando se dispone de un kit de antisueros específicos para géneros y especies de bacterias se torna fácil su identificación. Existen varias técnicas dentro de las cuales tenemos: aglutinación, precipitación, uso de inmunofluorescencia y ELISA (Ramos y Barbosa, 2005).

La selección del antígeno para la reacción o para la obtención del antisuero debe ser complementada con otras pruebas bioquímicas que confirmen los resultados y debe investigarse previamente la especificidad del antisuero. La técnica más empleada es la combinación de medios selectivos con doble inmunodifusión en agar (Trujillo, 1998). Con pruebas de ELISA se logró detectar a *Xanthomonas albilineans* en 218 muestras de 225 en total, donde un 19% de los tallos eran asintomáticos (Jiménez, 2004).

Otra técnica muy utilizada es la DAS-ELISA la cual consiste en que un anticuerpo se pega al plato que se usa para capturar el antígeno y el mismo o diferente anticuerpo específico al patógeno, conjugado a la enzima, se utiliza para detectar el antígeno capturado.

Una desventaja de este proceso es la de tener que preparar un conjugado de la enzima-anticuerpo por cada patógeno que se quiere probar. Además, los anticuerpos modificados se vuelven más restringidos en su capacidad de unirse a antígenos, causando con frecuencia una reacción específica a nivel de variante o patotipo. Sin embargo, esto se puede solucionar conjugando la enzima a la antiglobulina de un anticuerpo (método del doble sandwich indirecto) que se vende comercialmente (Cenicaña, 2002; Díaz y Peralta, 2004).

El establecimiento de técnicas de diagnóstico que permitan detectar la presencia de la bacteria en muestras asintomáticas, facilitaría establecer métodos de control adecuados validando la técnica de UMELISA-DAS utilizando el lector SUMA PR52, donde la mejor dilución de IgG correspondió a 1:4000 y 1:1000 para el conjugado, leyendo la reacción a 30 min; los valores más altos de fluorescencia correspondieron a las muestras de hojas (Díaz y Peralta, 2004).

Diferentes metodologías se han utilizado, bien sea para la detección de *Xanthomonas albilineans* como método de diagnóstico o para el estudio de su variabilidad genética, basados en estudios de reacción ante anticuerpos mono o policlonales se diferenciaron tres serovares de esta bacteria (Alvarez et al., 1996; Champoiseau et al., 2006).

2.2.6. Pruebas moleculares

Cuando las técnicas convencionales o inmunológicas de diagnóstico no han cumplido a cabalidad con la rapidez, sensibilidad, eficiencia, repetibilidad, y confiabilidad de

las mismas se acuden a las moleculares, sobre todo para buscar sensibilidad en la técnica.

Otras veces se presentan dificultades al encontrar variantes fisiológicas, morfológicas y bioquímicas de las células bacterianas; por lo que identificarlas y caracterizarlas requiere de técnicas y métodos moleculares más sensibles y precisos.

Las técnicas moleculares generalmente están basadas en el principio de hibridación con un oligonucleótido que es complementario al ADN-desnaturalizado, que puede ser seguido de una amplificación del segmento marcado *in vitro* (Ramos y Barbosa, 2005).

2.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es el resultado de la amplificación de porciones específicas de DNA templado que ocurren entre secuencias (en la banda + y en la -) que une a los cebadores de la síntesis de DNA. Este proceso cíclico tiene tres pasos: a) desnaturalización del DNA, b) unión (annealing) de los iniciadores o cebadores oligonucleotidos al DNA templado, y c) extensión de los iniciadores por medio de la DNA- polimerasa en presencia de dNTPs. Los fragmentos de DNA son amplificados durante procesos de 25 a 45 ciclos de PCR, separados por electroforesis y visualizados mediante el empleo de bromuro de etidio.

Esta técnica es más sensible que la ELISA o la hibridación y se usa en la detección de ácidos nucleicos de la bacteria. La amplificación al azar de fragmentos de DNA, empleando iniciadores aleatorios en PCR se puede utilizar para caracterizar molecularmente un patógeno en caña de azúcar, las técnicas más usadas son PCR y RAPD que difieren básicamente en el complemento de los oligonucleótidos usados y en las exigencias de condiciones para su amplificación, observe el esquema de la Figura 3 (Ramos y Barbosa, 2005).

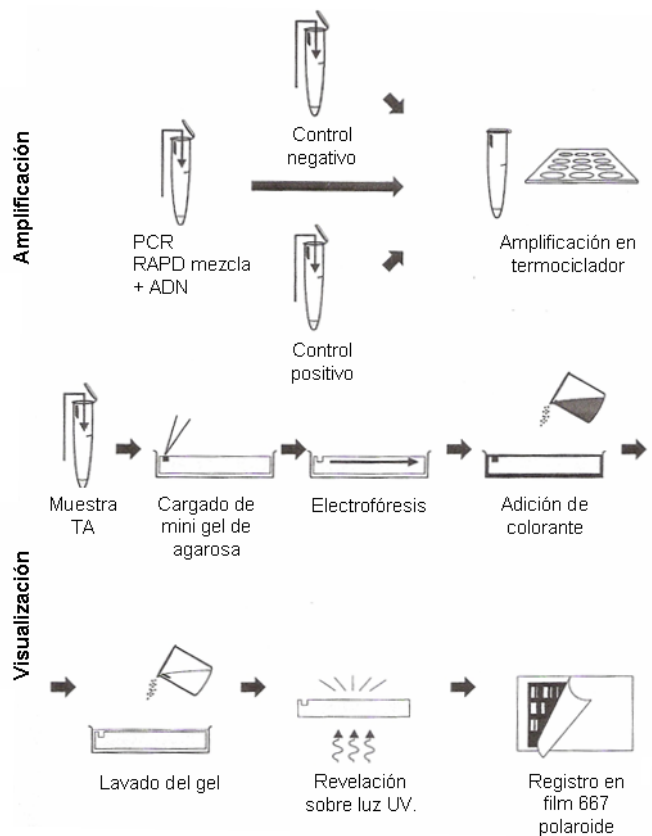


Figura 3. Amplificación in vitro y visualización en gel de agarosa.
Fuente: Ramos, R., Barbosa, E. 2005.

En Cuba se ha estudiado la variabilidad en poblaciones de *Xanthomonas albilineans* caracterizadas mediante estudios culturales, bioquímicos y moleculares (PCR-anidado y PCR-repetitivo), determinándose tres variantes serológicas I, II, III y 11 grupos genómicos conformados por los haplotipos BOX, ERIC y REP (Díaz, 2000; Díaz y Peralta, 2004).

Con el fin de disponer de una herramienta de diagnóstico rápida y eficiente, se estandarizó una metodología de detección molecular utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa para diagnosticar la presencia de enfermedades bacterianas (escaldadura foliar y raquitismo de la soca) en muestras de campo comerciales venezolanos (Béres y col, 2005).

Se ha demostrado el uso de la Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores arbitrarios (AP – PCR) para la caracterización molecular del patógeno *Xanthomonas albilineans* suministrando un protocolo rápido, confiable y económico (Honeycutt et al., 1995; Pan et al., 1997).

Un protocolo de PCR fue desarrollado amplificando unas 360 pb del DNA producto de *Xanthomonas albilineans*, los ensayos utilizan primers previamente descritos que apuntan hacia una región ITS (espacio intergenérico transcripto) entre 16S y 23S de genes del rRNA. El primer Ala4/L1 permitió la amplificación de un fragmento de DNA de 360 pb en aislamientos de esta bacteria incluyendo a serovares representativos I, II y III (Pan et al., 1997).

Un sistema de detección basado en PCR- anidada ha sido desarrollado para *Xanthomonas albilineans*, usando de baja a moderada rigurosidad de hibridación en la estrecha región embebida entre tRNA(ala) y tRNA(ile) del espacio génico 16-23SrRNA (Honeycutt et al., 1995).

Así mismo para la caracterización molecular de variedades resistentes o susceptibles a escaldadura se ha generalizado el uso de técnicas de Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP) (Quirino, 2003).

Muchas pruebas moleculares han determinado el mecanismo de patogénesis de esta enfermedad identificando la fitotoxina albicidina como responsable de la inhibición de la replicación de los plastidios en hojas jóvenes de caña de azúcar, la introducción de genes que codifican enzimas detoxificantes podría ser la vía adecuada para la protección de las plantas y la búsqueda de resistencia a esta enfermedad (Rott et al, 1996; Champoiseau et al., 2006).

Numerosos genes están involucrados en la patogenicidad de esta bacteria, estos genes codifican para diferentes sistemas de secreción de proteínas constitutivas, exopolisacáridos, factores de virulencia, toxinas, enzimas degradativas de la pared celular y factores de movilidad celular; la variación en los genes de la biosíntesis de la albicidina no está correlacionado con la variación en su patogenicidad (Champoiseau et al., 2006).

El gen XabB codifica una larga proteína (Mr525695) con una arquitectura modular indicativa de un polipéptido multifuncional (PKS) parecido al péptido sintetasa no ribosomal (NRPS), con una longitud de 4.801 aminoácidos (Huang et al., 2001; Royer et al., 2004) y al menos uno de estos clusters está involucrado en la producción de albicidina en Xa23R1; fragmentos de DNA de 48kb de este cluster provee ser muy específico para *Xanthomonas albilineans* (Rott et al., 1996; Royer et al., 2004).

El gen albD de *Pantoea dispersa* ha sido clonado y secuenciado y produce una enzima que detoxifica a la albicidina; dicho gen se ha introducido en Q₆₃ y Q₈₇, mediante cobombardo con el gen aphA para conferir resistencia a la escaldadura foliar en caña de azúcar (Zhang et al., 1997b).

2.3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Mientras más criterios sean involucrados para la diferenciación en bacterias más posibilidades existen de ser precisos en el diagnóstico, es así, como se involucran características morfológicas, fisiológicas, patogenicidad, hibridación del ADN, serología y reacción con algunos bacteriófagos.

Para la identificación de una especie en bacterias fitopatógenas actualmente sólo se realizan de 20-30 pruebas fisiológicas, pero estaríamos comparando una porción muy pequeña del material genético; si se desea establecer diferencias más estrechas

debería afinarse un procedimiento como porcentaje de similitud del ADN para considerar dos aislamientos de una misma especie.

Dentro de las metodologías de hibridación en soporte sólido tenemos: dot blot y slot blot, southern (tanto para DNA/ RNA) y northern (sólo para RNA) y western cuando se trate de proteínas.

La clave estaría en la selección y combinación de pruebas que puedan determinar con precisión las relaciones existentes entre las bacterias fitopatógenas, es por eso que en el diagnóstico molecular se buscan los procedimientos más sencillos, sensibles, específicos y precisos para cada fin propuesto. Para lograr este fin las metodologías moleculares empleadas están basadas en la más elemental biomolécula “la proteína” y su transferencia para ser detectada.

Existen varios métodos de transferencia de proteínas a filtros, el más sencillo es aplicarlas directamente en forma de una gota pequeña de una solución concentrada sobre la membrana, quedando en forma de una mancha o “dot”. Existen dispositivos que facilitan la aplicación de las proteínas directamente a la membrana, aplicando una solución que facilita la penetración de la solución y reciben los nombres de “dot blot” o “spot blot” en función de que la proteína quede aplicada en forma de una gota circular o de una línea.

Trabajar con las proteínas fijadas sobre una membrana tiene ventajas sobre las empleadas dentro del propio gel:

- ✚ Son más rápidas de teñir y desteñir.
- ✚ No se produce tinción de los anfolitos en los geles de isoeléctrico enfoque.
- ✚ Se detectan cantidades menores de proteínas puesto que se concentran en la superficie y no se diluyen en todo el espesor del gel.
- ✚ El blot es un registro conveniente y cómodo de manipular el gel.

- ✚ Las membranas son mucho más fáciles de manipular que el propio gel.

Todo procedimiento de “blotting” consta de las siguientes etapas:

- ✚ Inmovilización de proteínas sobre la membrana ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión) o mediante aplicación directa.
- ✚ Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
- ✚ Incubación del “blot” con anticuerpos primarios contra la(s) proteína(s) de interés.
- ✚ Incubación del “blot” con anticuerpos secundarios o reactivos que actúan como ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
- ✚ Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteínas.

Hay tres métodos para transferir proteínas a las membranas: transferencia capilar, transferencia por difusión y transferencia electroforética. En el caso de los geles de poliacrilamida el método de elección es la transferencia electroforética, la transferencia es mucho más efectiva si se realiza aplicando una diferencia de potencial entre el gel y la membrana.

Actualmente se han desarrollado dos técnicas de diagnóstico molecular de patógenos en enfermedades sistémicas como la escaldadura foliar: métodos inmunoenzimáticos de Tissue Blot Immunoassay (TBIA) y Dot Blot Immunoassay (DBIA).

2.3.1. Dot Blot Immunoassay (DBIA): Manchado de membrana de nitrocelulosa.

Técnica simple que inmoviliza DNA sin fraccionar a una membrana de nitrocelulosa o nylon. Se realiza luego un análisis de hibridación que determina la relativa

abundancia de las secuencias de interés en las preparaciones del DNA blotted o manchado.

Se detecta la presencia de los agentes causales observando el extracto combinado de 20 hojas TVD (primera hoja con papada visible en la caña de azúcar, del inglés top visible dewlap) por cada 5 hectáreas de campo comercial ó 3 hectáreas de semillero, si la muestra resulta positiva se procede al TBIA. Será positiva si el extracto provoca una mancha en la membrana de nitrocelulosa.

2.3.2. Tissue Blot Immunoassay (TBIA): Impresión de tejidos en membrana de nitrocelulosa.

Se usa para examinar la nervadura de cada hoja en su impresión en una membrana de nitrocelulosa y poder así determinar la incidencia y severidad de la enfermedad.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, CULTURAL Y FISIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS VENEZOLANOS DE

Xanthomonas albilineans.

RESUMEN

Este trabajo esta dirigido a caracterizar los aislamientos de *X. albilineans* presentes en focos de escaldadura existentes en áreas afectadas de tres estados venezolanos: Aragua, Yaracuy y Lara, para compararlos y determinar si existen variantes fenotípicas y genotípicas presentes en el país y perfeccionar su diagnóstico. Para ello, se emplearon procedimientos tradicionales. Las características culturales, morfológicas y bioquímicas de los aislamientos estudiados fueron poco variables. Existen variaciones entre los aislamientos venezolanos de *X. albilineans* con respecto a la producción de ácido a partir de fructosa, la utilización de la gelatina, para la tolerancia al NaCl, la temperatura máxima de crecimiento, la morfología de las colonias y la longitud de las células bacteriana. Sin embargo, se confirma lo señalado por otros autores sobre la relativa homogeneidad de las propiedades bioquímicas y fisiológicas de los aislamientos evaluados en comparación con las morfológicas.

CHAPTER III

CHARACTERIZATION MORPHOLOGICAL, CULTURAL AND PHYSIOLOGICAL OF ISOLATIONS BACTERIANOS VENEZUELANOS OF *Xanthomonas albilineans*.

ABSTRACT

This work is aimed at characterizing isolates of *X. albilineans* present in pockets of scald in affected areas of three Venezuelan States: Aragua, Yaracuy, and Lara, to compare them and determine whether phenotypic and genotypic variants present in the country and improve their diagnosis. For this reason, traditional procedures were used. Cultural, morphological and biochemical characteristics of the studied isolates were little variable. There are variations between the Venezuelan isolations of *X. albilineans* with regard to the production of acid from fructose, the use of gelatine, for tolerance to NaCl, the maximum temperature of growth, the morphology of the colonies and the bacterial cells long. However, it is confirmed the points made by other authors on the relative homogeneity of the biochemical and physiological properties of the insulation evaluated in comparison with the morphological.

3.1. INTRODUCCIÓN

La bacteria *X. albilineans* es el agente causal de la escaldadura foliar en caña de azúcar, enfermedad que afecta los vasos xilemáticos causando severos síntomas; entre los que destacan, finas líneas blancas en las hojas, marchitez, necrosis y proliferación de yemas laterales (Birch, 2001; Huerta-Lara et al., 2003b; Champoiseau et al., 2006). Frecuentemente, está presente en infecciones latentes siendo imposible su diagnóstico visual (Rott et al., 1997; Pan et al., 1999; Wang et al., 1999; Huerta et al., 2003a).

Consistentemente, este patógeno es diseminado por esquejes infectados utilizados como semilla asexual en la propagación de los cultivos a nivel local, así como también en el intercambio nacional e internacional de materiales vegetales. Es así como los estudios de diversidad genética y patogénica pueden soportar directamente las medidas de control legal, tanto en programas de mejoramiento genético nacional e internacional (Louws et al., 1999; Guevara y Ovalle, 2005).

La evaluación de la diversidad de poblaciones es necesaria para el establecimiento de una taxonomía estable y el desarrollo de estrategias durables para el manejo de bacterias fitopatógenas. Básicamente, si la diversidad es el grado de variación genética dentro de una población bacteriana, esto ayuda a ordenar la caracterización sistemática bacteriana en múltiples niveles taxonómicos o filogenéticos (Huerta et al., 2009).

Muchos investigadores han referido la caracterización de *X. albilineans*, fundamentada en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Dye, 1966; Schaad y Stall, 1988; Van den Mooter y Swings, 1990; Bradbury, 1986; Palleroni y Bradbury, 1993; Holt et al., 1994).

Especies de este género se definen como bacilos Gram negativos (0,4-0,9 x 0,7-2,0 µm) que se presentan generalmente sin agrupación característica, no producen esporas y son móviles a través de un único flagelo polar y su respiración es estrictamente aerobia (Vauterin et al., 1993). La temperatura óptima de crecimiento de *X. albilineans* es de 25 a 28°C. En medio Wilbrink, las colonias son amarillas, brillantes, convexas, de bordes lisos, pequeñas y viscosas, pero no mucoides. Los pigmentos son aril brominados característicos, insolubles en agua, llamados xanthomonadinas. Algunos autores han señalado aislamientos del patógeno con características bioquímicas y fisiológicas que pueden diferir de los patrones descritos (Yang et al., 1993a; Autrey et al., 1995b; Vauterin et al., 1995).

Los pocos trabajos referenciados en el país centran su identificación en caracteres culturales, morfológicos y patógenicos (Ordosgoitti et al., 1977), otros en algunas pruebas bioquímicas y serológicas (Jiménez, 2004) y más reciente en el uso de marcadores moleculares para su detección (Oropeza et al., 2008).

La caracterización morfológica, cultural y fisiológica de aislamientos bacterianos por métodos tradicionales tienen una gran desventaja, los caracteres empleados están influenciados por las condiciones nutricionales, ambientales, y edad del microorganismo evaluado; por lo que muchas veces son imprecisos (Schaad et al., 2001, 2003).

Comercialmente existen productos y protocolos para evaluar la actividad metabólica bacteriana e identificar los miembros del género *Xanthomonas* y otras bacterias fitopatogénicas (Jones et al., 1993). Los resultados obtenidos mostraron compuestos distintivos para el género, otros que posibilitaron la diferenciación de la mayoría de los grupos genómicos y algunos específicos a los grupos de *Xanthomonas campestris* pv. *pisi* y *X. albilineans*, ambos responsables de la mayor parte de los resultados atípicos dentro del género (Vauterin et al., 1995; Lopes et al., 2001); utilizando este

sistema, sólo pudieron identificar el 31% de los aislamientos de *X. albilineans* analizados.

Aun cuando *Xanthomonas albilineans* es distinguida y reconocida representativamente como especie, existe una gran heterogeneidad entre los diferentes aislamientos (Van Den Mooter y Swings, 1990). Se han identificado diferentes formas de variación que incluyen características como la morfología de las colonias y células bacterianas, las proteínas totales de la pared celular, los esteroides metílicos de los ácidos grasos, la reacción ante bacteriófagos, la reacción serológica y la diversidad genómica (Rott, 1995).

Considerando sus características bioquímicas y fisiológicas se ha determinado que los aislamientos de *Xanthomonas albilineans*, constituyen una especie bien definida en la cual no han podido establecerse diferentes biotipos (Rott, 1995; Yang et al., 1993a). Sin embargo, algunos autores indican la presencia de cepas con características que difieren de los patrones establecidos para la especie, básicamente con respecto a la producción de ácido a partir de arabinosa, fructosa, manosa y glucosa, así como la utilización del almidón y la gelatina (Yang et al., 1993a; Vauterin et al., 1995; Autrey et al., 1997).

Estudios de la morfología de las células y de las colonias en cultivo, han mostrado diferencias relacionadas con el tamaño y la existencia de células filamentosas (North, 1926; Birch, 1980) observó que las colonias pequeñas o de lento crecimiento tenían grandes proporciones de células filamentosas y que éstas representaban los aislamientos más agresivos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Colecta de los aislamientos bacterianos

De inspecciones realizadas desde junio de 1999 en áreas comerciales de caña de azúcar de los estados Aragua, Yaracuy y Lara, se tomaron muestras vegetales con síntomas típicos presentes en hojas, tallos y brotes por variedad.

En total, se procesaron 126 muestras en 16 variedades comerciales diferentes de caña de azúcar para coleccionar los aislamientos bacterianos presentes, la ubicación geográfica por variedad se puede observar en el Cuadro 2, a continuación:

Cuadro 2. Variedades de caña de azúcar muestreadas y su ubicación geográfica.

VARIETADES	MUNICIPIO	ESTADO	VARIETADES	MUNICIPIO	ESTADO
B60-321	Iribarren	LARA	PR 69-2176	José Félix Rivas	ARAGUA
B75-403	José Félix Rivas	ARAGUA	RB 74-474	Torres	LARA
				Zamora	ARAGUA
B80-408	Palavecino	LARA	V 65-55	Peña	YARACUY
CC 85-92	José Félix Rivas	ARAGUA	V 66-28	Peña	YARACUY
	José Rafael Revenga				
	Girardot				
CP 74-2005	José Félix Rivas	ARAGUA	V 69-16	Peña	YARACUY
CP 80-1743	José Félix Rivas	ARAGUA	V 71-51	Peña	YARACUY
CR 69177	Torres	LARA	V 84-15	Peña	YARACUY
PR 61-632	Iribarren	LARA	V 98-158	Peña	YARACUY

Se tomaron las hojas TVD (primera hoja con cuello visible) afectadas en campo según el procedimiento para diagnóstico de enfermedades (visualizado en la Fig.4): en semilleros se tomo una muestra por cada tres hectáreas y en campos comerciales una muestra por cada cinco hectáreas. Cada muestra está compuesta por 20 hojas colectadas y se realiza en cañas entre 7- 9 meses de edad. Se desprenden desde su base y luego se cortan los primeros 30 cms de su parte apical, se amarran y etiquetan, inmediatamente son conservadas en una cava de anime con geles de enfriamiento.



Figura 4. Procedimiento para la toma de muestra en el diagnóstico.

La colecta se tomó por visualización de síntomas característicos en las plantas de caña de azúcar afectadas por la escaldadura (ver Cuadro 3), en algunos casos se tomaron brotes laterales afectados; como también tejidos aparentemente sanos. Para efectos de diagnóstico fitopatológico se realizó el muestreo y toma de muestra completamente al azar independientemente de la presencia de síntomas en la misma.

Cuadro 3. Sintomatología de las variedades de caña de azúcar muestreadas.

VARIETADES	MUNICIPIO	SÍNTOMAS	VARIETADES	MUNICIPIO	SÍNTOMAS
B60-321	Iribarren	SF,BL,MT,H,BR,T	PR 69-2176	José Félix Rivas	SF,BL,MT,H,BR,T
B75-403	José Félix Rivas	SF,BL,MT,H,BR,T	RB 74-454	Torres*	SF,BL,H,T,BR,SIT
				Zamora*	SF,BL,MT,H,T,BR
B80-408	Palavecino	SF,BL,MT,H,BR,T	V 65-55	Peña	SF,BL,MT,H,BR,T
CC 85-92	José Félix Rivas*	SF,BL,MT,H,BR,T, TH,CM	V 66-28	Peña	SF,BL,MT,H,BR,T, SIT.
	José Rafael Revenga*	SF,BL,MT,H,BR,T, TH,CM			
	Girardot*	SS,SF,BL,SIT,MT, H,BR			
CP 74-2005	José Félix Rivas	SF,BL,MT,H,BR,T	V 69-16	Peña	SF,BL,MT,H,BR,T
CP 80-1743	José Félix Rivas	SF,BL,MT,H,BR,T	V 71-51*	Peña	SF,BL,MT,H,BR,T
CR 69177	Torres	SF,BL,MT,H,BR,T	V 84-15	Peña	SF,BL,MT,H,BR,T
PR 61-632	Iribarren	SF,BL,MT,H,BR,T	V 98-158*	Peña	SF,BL,MT,H,BR,T

H: Hojas T: Tallos BR: Brotes

SS: Sin síntomas.

SF: Síntomas foliares: presencia de rayas blancas de ancho variable; necrosis foliar.

BL: Desarrollo de brotes laterales con la presencia de rayas blancas finas en las hojas.

SIT: Síntomas internos de los tallos: haces vasculares de coloración rojiza.

MT: Muerte de tallos.

*: Aislamientos utilizados para la caracterización morfológica, bioquímica y patogénica.

TH: Tratamiento hidro-térmico

CM: Cultivo de meristemas

En la mayoría de las colectas se desconocía la información si el material sembrado había recibido tratamiento sanitario por termoterapia.

3.2.2. Cultivo y preservación de los aislamientos bacterianos colectados

El material vegetal fue previamente lavado con agua y jabón a chorro corrido, luego se aplicó hipoclorito de calcio al 2% por 20 minutos y posteriormente desinfectado con alcohol 70% durante un minuto y dos lavados en agua destilada estéril. Luego fragmentos de 1-1.5 cm² de tejido foliar infectado (incluyendo los brotes laterales) fueron macerados en 1 ml de solución salina estéril (NaCl 0.85%), como se indica en la Fig.5.



Figura 5. Procedimiento para el aislamiento del agente causal.

Se tomaron algunas secciones y se maceraron suavemente en los extremos para observar el flujo bacteriano en microscopio de contraste con el objetivo de 100X.

Se sembraron 0.1 ml de los macerados, que fueron diseminados con espátula de vidrio en tres placas de medio con Wilbrink modificado (1 l de agua destilada; 5g de peptona; 10g de sacarosa; 0.5g de K₂HPO₄·3H₂O; 0.25g de MgSO₄·7H₂O; 0.05g de Na₂SO₃; 10g de agar bacteriológico; pH 6.9), suplementado con ciclohexamida (100mg/l) y extracto de levadura (5g/l) (Rott et al., 1997; Davis et al., 1994).

Las placas fueron incubadas a 30°C hasta los siete días y las colonias con características típicas de *Xanthomonas albilineans* fueron seleccionadas, se les realizó la tinción de Gram, se sembraron en medio YDC (1 l de agua destilada, 10g de extracto de levadura; 20g de glucosa; 20g de CaCO₃; 15g de agar bacteriológico pH

7.0) y se comprobó si crecían en medio Agar Nutriente (1 l de agua destilada; 3g de extracto de carne; 5g de peptona; 15g de agar bacteriológico; pH 7.2).

Después de dos pases sucesivos de una colonia y comprobada su pureza, los aislamientos fueron conservados en eppendorfs con el medio de Wilbrink a 4°C, en medios mínimos (100 ml caldo nutritivo, 0,5 g NaCl, 1,5 g agar bacteriológico) a temperatura ambiente y en caldo Wilbrink con 15% de glicerol a -20°C (Rott et al., 1995, Rott y Chatenet, 1998).

3.2.3. Caracterización cultural y morfológica

Se hicieron observaciones morfológicas y fueron estudiadas las características culturales en diferentes medios de cultivos, además se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas de acuerdo a los métodos recomendados por otros investigadores (Holt et al., 1994; Kado y Heskett, 1970; Schaad y Stall, 1988).

Se estudiaron las características culturales de los aislamientos patogénicos en los medios de cultivos: AN, YDC y Wilbrink modificado por Bell y Cottrell – Dolmer, descrito por Lin y Bernard (1973) e incubadas a 30° C. Aquí se determinó la forma (filamentosa, punciforme, circular, rizoide e irregular), elevación (espaciada, plana, elevada, convexa, cóncava, abultada), bordes (entero, ondulado, filamentoso, irregular, rizado), aspecto (brillante, opaca, mucoide, no mucoide), color y velocidad de crecimiento de las colonias.

Las características morfológicas se determinaron mediante la tinción con rojo congo y la tinción de Gram (Schaad y Stall, 1988; Schaad et al., 2001; Romeiro, 2001). La descripción morfológica de las colonias se hizo sobre medio Wilbrink modificado. La técnica de tinción con rojo congo consistió en preparar un frotis con una porción de la cepa bacteriana sobre un portaobjeto al cual se le había agregado una gota de rojo congo, se extendió lo más posible, se dejó secar y se le agregaron tres gotas de

alcohol ácido de tal manera que cubriera todo el frotis y se dejó secar nuevamente. Una vez seco se observó al microscopio óptico bajo el lente de inmersión (100X).

La tinción de Gram permite separar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas, la prueba está muy relacionada con la composición de la pared celular y consiste en colorear las células bacterianas con colorantes básicos y decolorarlas con solventes neutros. Las bacterias Gram negativas tienen una pared celular más delgada con menos contenido de peptidoglucano (5% en comparación con las Gram positivas que tienen 90%), lo que las hace más permeable y al ser teñidas con cristal violeta, luego lavadas con agua y alcohol, pierden el colorante primario y retienen el secundario (safranina); observándose al microscopio las bacterias de un color rosado (Schaad y Stall, 1988).

Se realizaron preparaciones para microscopía óptica y electrónica de transmisión por tinción negativa (Sigeo, 1990) con el fin de detectar: tamaño, forma, arreglos, flagelación, presencia de endospora, cápsula y gránulos de sustancias de reserva de las células bacterianas. Se midieron entre 25 y 160 células de los diferentes aislamientos logrados a partir de microfotografías ópticas y electrónicas. Se utilizó un software para las mediciones en el estudio morfométrico. Con los valores obtenidos se realizó un análisis de varianza simple, utilizando el Paquete de Sistema de Análisis Estadísticos SAS (Versión 6.12, 1998), para establecer las diferencias entre los aislamientos a través de la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$).

3.2.4. Caracterización fisiológica y bioquímica:

Se establecieron las propiedades bioquímicas más importantes para la determinación del género y especie. El cultivo in vitro de los aislamientos se hizo utilizando el medio Wilbrink durante 48 horas. Se realizaron las pruebas bioquímicas de acuerdo con las metodologías descritas para la caracterización a nivel de género (Ramos y Barbosa, 2005). Para la diferenciación de la especie fueron empleadas las pruebas

establecidas por Dye y Lelliott, (1974); Bradbury, (1986) y el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (Holt et al., 1994).

Las propiedades fisiológicas y bioquímicas estudiadas fueron las siguientes: prueba de KHO, determinación de temperatura óptima de crecimiento, determinación de la relación con el oxígeno (Medio Hugh y Leifson), reacción básica en bactoagar dextrosa rojo fenol, presencia de oxidasa, catalasa, hidrólisis de la gelatina, reducción de nitratos, hidrólisis del almidón, hidrólisis de esculina, hidrólisis de ureasa, utilización y/o fermentación de varios carbohidratos y crecimiento en caldo de cloruro de sodio.

3.2.4.1. Prueba de KOH

La prueba de KOH se utiliza para determinar si las bacterias son Gram positivas o Gram negativas, es más sencilla y más rápida que la tinción de Gram. Consistió en colocar en un portaobjeto una gota de KOH al 3%, con una ansa de platino se tomó una porción de la bacteria con 72 h de crecimiento y se mezcló haciendo movimientos giratorios con el hidróxido; si las bacterias son Gram negativas forman un hilo mucoso que se mantiene por unos segundos al levantar el ansa de la suspensión. Esto se explica por el rompimiento de la pared celular y la salida del ácido desoxirribonucleico (ADN), responsable de la viscosidad. Las bacterias Gram positivas tienen una pared celular más gruesa, por lo que el KOH no ejerce ningún efecto sobre ella por lo tanto no se forma el hilo característico observado en las bacterias Gram negativas (Schaad y Stall, 1988).

3.2.4.2. Prueba de determinación de temperatura óptima de crecimiento

La capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas se utiliza como una herramienta para identificar cepas bacterianas. Para la prueba se utilizaron tres tubos de ensayo con el medio YDC y se inocularon con aislamientos bacterianos de 72 h de

crecimiento, posteriormente se incubaron por 7 días a temperaturas controladas en estufa a 35 - 39 °C. Se considera como reacción positiva la presencia de turbidez en el medio.

3.2.4.3. Crecimiento en caldo de cloruro de sodio

Muchas especies de bacterias fitopatógenas son capaces de tolerar diferentes concentraciones de NaCl, lo cual permite diferenciarlas. Para esta prueba se inocularon cuatro tubos de ensayo para probar cuatro concentraciones salinas (0,5-1,0 -2 y 5%) y se conservaron dos repeticiones para cada una, cada tubo contenía el medio base (3 g de extracto de carne, 5 g de peptona, 2,5 g de glucosa y 1 l de agua destilada) con tres gotas de una suspensión bacteriana; luego los tubos se dejaron en agitación por 3 días. La presencia de turbidez en el medio es evidencia de una reacción positiva.

3.2.4.4. Determinación de la relación con el oxígeno: Medio Hugh y Leifson

Para conocer el metabolismo respiratorio y fermentativo de las bacterias en el proceso de degradación de la glucosa, se utiliza el medio Hugh y Leifson (2 g de peptona, 5 g de NaCl, 0,3 g de K₂HPO₄, 3 g de bactoagar, 3 ml de azul de bromotimol al 1% y 1l de agua destilada).

Se inocularon tres tubos con el medio base con inóculo bacteriano de 72 h de crecimiento, luego se le aplicó una capa de aceite de parafina estéril con el fin de sellarlo y crear condiciones anaeróbicas; se dejaron en incubación por 3 días. Un cambio de color del medio de verde a amarillo es indicativo de una reacción positiva (Schaad et al., 2001).

3.2.4.5. Reacción básica en bactoagar dextrosa rojo fenol

Esta prueba permite conocer si las bacterias fitopatógenas presentan reacción fermentativa mediante la producción final de ácidos. Se procedió a inocular en tres tubos con medio bacto agar dextrosa rojo fenol (31 g de agar rojo fenol, 10 g de dextrosa y 1 l de agua destilada), inóculo bacteriano con 72 h de crecimiento. Se incubaron por 3 días, si el medio cambia de color rojo a amarillo, indica que la bacteria muestra reacción ácida al bacto fenol; si el cambio de color es del rojo a un rojo más intenso se considera una reacción básica (Schaad et al., 2001).

3.2.4.6. Prueba para presencia de oxidasa

Está basada en la producción de una enzima llamada oxidasa por parte de algunas bacterias, por la presencia de un sistema de citocromo oxidasa; este sistema está presente normalmente en organismos aeróbicos, los cuales pueden utilizar el oxígeno como receptor final de hidrógeno. La oxidasa es capaz de oxidar el tetrametil-p-phenyldiamina dihydrochloride, demostrándose la presencia del citocromo c en la cadena respiratoria.

Para la producción de oxidasa se utilizó un cultivo bacteriano de 72 h de crecimiento, se colocó una gota del reactivo de Kovacs (Tetrametil-p-phenyldiamina al 1% p/v) sobre un papel de filtro, se tomó una porción de la bacteria frotándose sobre el papel, si se presenta una coloración violeta en un lapso de 10 segundos la prueba se considera positiva, entre 10 - 60 segundos la prueba es positiva retardada y si no hay reacción después de 60 segundos la prueba es negativa (Schaad y Stall, 1988).

3.2.4.7. Prueba de catalasa

Ciertas bacterias producen H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) en presencia de oxígeno libre; la catalasa es una enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. El fundamento de esta prueba está en que el peróxido de

hidrógeno es tóxico a las bacterias, pero su acción es contrarrestada por la enzima catalasa la cual lo destruye (Schaad y Stall, 1988).

La verificación de la producción de catalasa se determinó agregando 1ml de H₂O₂ al 3% a un tubo de ensayo que contenía 5 ml de suspensión bacteriana; la reacción positiva se evidencia por la producción de oxígeno, observada por la presencia de burbujas, indicador de que la bacteria está produciendo catalasa.

3.2.4.8. Prueba para la hidrólisis de la gelatina

Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir una enzima llamada gelatinasa, lo que resulta, cuando atacan, en una pérdida de la propiedad como gel en la proteína insoluble: gelatina. Para esta prueba se utilizaron tres tubos de ensayo con medio nutriente gelatina (3 g de extracto de carne, 5 g de peptona, 120 g de gelatina y 1 l de agua destilada) se inocularon con aislamientos de 72 h de crecimiento y se incubaron a temperatura ambiente y se observaron reacciones a los 3, 7, 14 y 21 días. Para ello se colocaron los tubos en la nevera a 4°C por 30 minutos, si al sacar los tubos de la nevera los medios fluyen rápidamente significa que la gelatina ha sido hidrolizada por lo cual la reacción es positiva, caso contrario es negativa (Schaad y Stall, 1988).

3.2.4.9. Prueba para la hidrólisis de esculina

La producción de β-glucosidasas hidroliza a la esculina que reacciona con el Fe³⁺ dando complejos negruzcos. Para esta prueba se utilizó el medio para esculina (0,5 g de NH₄ H₂ PO₄, 0,5 g de K₂HPO₄, 0,2 de MgSO₄.7H₂O, 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, citrato de amonio férrico 0,05%, esculina 0,1% y 1 l de agua destilada) dispensado en tubos de ensayos que fueron inoculados e incubados por tres días a 28°C. Una reacción positiva es considerada la presencia de una coloración marrón oscura en el medio para esculina.

3.2.4.10. Prueba para la hidrólisis del almidón

Se conoce que algunas bacterias presentan una enzima extracelular, la amilasa, que hidroliza el almidón hasta maltosa. Para esta prueba se utilizaron tres placas de petri con agar nutritivo y 0,2 % de almidón soluble, sobre cada una de ellas se estirió la bacteria y fueron incubadas hasta observarse un buen crecimiento, luego se cubrió cada placa con una solución de yodo diluido en alcohol a 50%. La reacción positiva se evidencia con la formación de una zona clara alrededor del crecimiento de la bacteria que demuestra la hidrólisis del almidón.

3.2.4.11. Prueba para la hidrólisis de ureasa

Estas bacterias son degradadoras de urea a través de las ureasas, a productos finales como dióxido de carbono y amoníaco. El amoníaco provoca la alcalinización del medio y se pone de manifiesto por el viraje de color amarillo a rojo. Para esta prueba se inocularon tres tubos de ensayo con medio base (0,5 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g de NaCl , 5 g de extracto de levadura, rojo cresol 0,0016% y 1 l de agua destilada) y posteriormente se incubaron por 5 días a temperatura de 29°C. Un incremento en la alcalinidad es indicado por un cambio de color amarillo a rojo, evidenciando una actividad de la ureasa.

3.2.4.12. Prueba para la reducción de nitratos

Las bacterias fitopatógenas se comportan de diferente forma en la utilización de nitratos, los cuales son reducidos a estados menos oxidados. Por lo general las Xanthomonas no los reducen. Para esta prueba se inocularon tres tubos con medio base (1 g KNO_3 , 5 g de peptona, 3 g de extracto de levadura, 3 g de bactoagar y 1l de agua destilada) y tres ansadas de inóculo de 72 h de crecimiento, luego se le agregó a cada tubo una capa de agar noble para crear la condición de anaerobiosis y se dejaron

en incubación por 7 días a una temperatura de 29°C. La producción de gas o la turbidez del medio indican desnitrificación.

3.2.4.13. Utilización y/o fermentación de varios carbohidratos

Para comprobar la utilización de los carbohidratos por parte de las bacterias en estudio se preparó el medio base C de Dye (0,5 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g de NaCl, 1 g de extracto de levadura, 12 g de bactoagar, 0,7 ml de solución de bromo cresol púrpura al 1,5% en alcohol, fuentes de carbono al 0,5% y 1 l de agua destilada), el mismo fue dispensado en tubos de ensayo y se le agregó asépticamente las fuentes de carbono mediante filtros miliporo. Los azúcares utilizados fueron: fructosa, glucosa, manosa, arabinosa y lactosa. Para esta prueba se utilizaron tres tubos de ensayo con medio y se inocularon con aislamientos de 72 h de crecimiento y se incubaron a temperatura de 29°C por 21 días. Un cambio de color del medio de púrpura a amarillo es indicativo de la producción de ácidos.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Caracterización cultural y morfológica

Las características culturales van a variar de acuerdo a los medios de cultivos utilizados, por lo que los aislamientos colectados una vez purificados en medio de Wilbrink se mantuvieron en medio Agar Nutriente, para garantizar evaluaciones bajo condiciones lo más estables posibles.

Entre las pruebas que comprobaron la identificación de los aislamientos colectados tenemos la formación de colonias en el medio de Wilbrink, el cuál, es selectivo para *X albilineans*. El crecimiento obtenido sobre dicho medio para los nueve aislamientos colectados: SC, ST, LM, TO, CA, 53X, 53Y, VY1 y VY2 (Cuadro 4); concuerda con lo citado para la identificación de dicha especie por otros investigadores (Ordosgoitti

et al., 1977; Davis, et al., 1994, 1997; Comstock, et al., 1997; Birch, 2001; Comstock, 2001; Huerta, et al., 2003; Jiménez, 2004).

Cuadro 4. Identificación de aislamientos colectados y purificados.

Aislamientos colectados	Variedad de procedencia	Lugar de la colecta
SC	CC 85-92	Aragua
ST	CC 85-92	Aragua
LM	CC 85-92	Aragua
TO	RB 74-454	Aragua
CA	RB 74-454	Lara
53X*	Desconocida	Lara
53Y*	Desconocida	Lara
VY1	V 98-158	Yaracuy
VY2	V 71-51	Yaracuy

* Donado por el laboratorio de Bacteriología de la UCOLA, Lara.

De un total de 126 muestras procesadas en 16 variedades diferentes de caña de azúcar se lograron aislar y mantener sólo 7 aislamientos de 4 variedades comerciales diferentes de caña de azúcar. Se evaluaron también 2 aislamientos donados por el laboratorio de Bacteriología de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado.

Las características morfológicas de los aislamientos realizados se corresponden con las descritas para esta especie (Ricaud, 1975; Ricaud y Ryan, 1989; Vauterin et al., 1993; Birch, 2001). Las células son bacilares, Gram negativas, de 0.39-0.63 x 1.15-1.70 µm, móviles con un único flagelo polar (Figura 6).

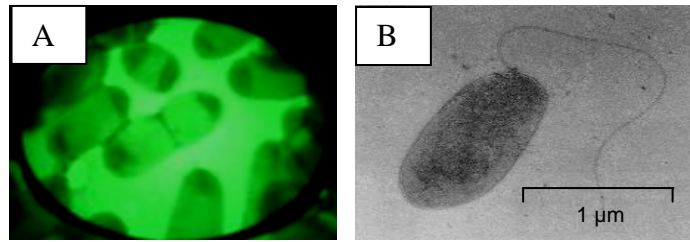


Figura 6. Dipping en aislamiento 53X de *Xanthomonas albilineans*. (a) célula en división celular y (b) observación de un flagelo por bastón bacteriano.

En relación a las características culturales observadas en las colonias a los 7 días después de la siembra en medio Agar Wilbrink, se determinaron que fueron: pequeñas, circulares, lisas, convexas, de bordes enteros, brillantes, no mucoides, translúcidas y de color amarillo miel a pálido (Figura 7). Crecimiento lento en medio Agar Nutriente y en medio de cultivo YDC algo más rápido y abundante con consistencia gelatinosa. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores (Schaad y Stall, 1988; Jiménez, 2004).

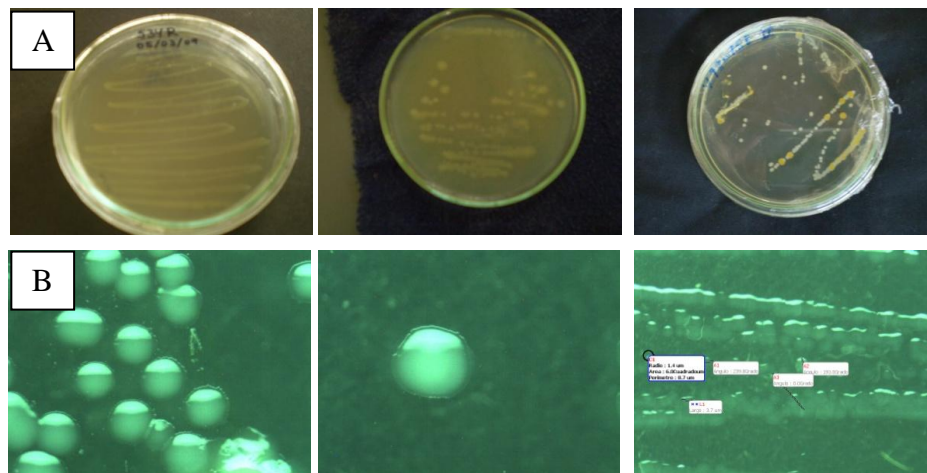


Figura 7. Colonias típicas de *Xanthomonas albilineans*: a) de aislamientos colectados en medios diferentes y b) detalles del estudio morfométrico.

Pese a estos caracteres coincidentes, se observaron pequeñas variaciones en tan sólo dos de los nueve aislamientos logrados en cuanto a tamaño, tonalidad y velocidad de

crecimiento de las unidades formadoras de colonias, que fueron particularmente evidentes en los aislamientos 53X y VY2; donde su tamaño fue menor, sus tonalidades más claras y su velocidad de crecimiento mayor. Sin embargo, es necesario profundizar en este aspecto mediante su estudio morfométrico para poder arribar a resultados concluyentes.

Se encontró relativa variabilidad en la longitud de las células bacterianas entre los aislamientos colectados (Cuadro 5), sin relación directa con su procedencia geográfica o varietal.

Cuadro 5. Longitud de las células bacterianas en los aislamientos evaluados.

Aislamiento	Longitud de células bacterianas μm	Variedad y ubicación geográfica
SC	1,7045 \pm 0,6037 a	CC85-92 Aragua
ST	1,7008 \pm 0,5685 a	CC85-92 Aragua
LM	1,6969 \pm 0,5326 a	CC85-92 Aragua
TO	1,6916 \pm 0,5300 a	CC85-92 Aragua
CA	1,6000 \pm 0,6105 ab	RB74-454 Lara
VY1	1,5999 \pm 0,6094 ab	V98-158 Yaracuy
53Y	1,5727 \pm 0,5155 ab	*Variedad desconocida
53X	1,1775 \pm 0,5454 b	*Variedad desconocida
VY2	1,1525 \pm 0,3626 b	V71-51 Yaracuy

Letras distintas difieren para Rangos Múltiples de Duncan $p \leq 0,05$.

* Donado por el laboratorio de Bacteriología de la UCOLA, Lara.

En el caso de la variedad CC85-92, los aislamientos aragueños: SC (Santa Clara), ST (Santa Teresa) y LM (La Mora) no difirieron estadísticamente ($p \leq 0,05$) entre sí, cuya longitud estuvo entre 1,70- 1,69 μm y se caracterizaron por poseer las células de mayor tamaño. Para la variedad RB74-454 los aislamientos TO (Tocoron) y CA

(Carora) aragüeño y larense, respectivamente, difirieron estadísticamente, aunque la tendencia fue similar, es decir, su longitud varió entre valores de 1,69-1,60 μm . Se define entonces, un grupo intermedio conformado por los aislamientos CA (RB74-454, Lara), VY1 (V98-158, Yaracuy) y 53Y (Lara). Los aislamientos VY2 (V71-51, Yaracuy) y 53X (variedad desconocida) se caracterizaron por poseer las células de menor tamaño, entre 1,15-1,17 μm .

Lograr información sobre la variabilidad morfológica de esta especie y su correlación con las variaciones serológicas, moleculares y patogénicas de los aislamientos es muy limitado en el ámbito internacional.

En la literatura se han señalado diferencias con respecto al tamaño de las colonias en cultivo y la morfología celular en esta especie (Ricaud y Ryan, 1989), así como la existencia de células filamentosas (North, 1926), que han sido asociadas a las colonias pequeñas o de lento crecimiento y a la agresividad de los aislamientos (Birch, 1980). Sin embargo, en nuestro estudio estas células filamentosas no fueron observadas, pero sí que las colonias más pequeñas están asociadas a un crecimiento más rápido.

3.3.2. Caracterización fisiológica y bioquímica

Los resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas se muestran en el Cuadro 6. Estos confirmaron la presencia de la especie *Xanthomonas albilineans*, presentando coincidencia en general en los aislamientos analizados, similares a los obtenidos por otros investigadores (Vauterin et al., 1993; Holt et al., 1994).

Considerando las características bioquímicas y fisiológicas se ha determinado que los aislamientos evaluados, constituyen una especie bien definida pero presentan pequeñas diferencias por la cual se han podido establecer diferentes biotipos, caso contrario de otras investigaciones (Rott y Chatenet, 1998; Yang et al., 1993a).

Cuadro 6. Características fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos evaluados.

Características	Aislamientos								
	SC	ST	LM	TO	53Y	53X	CA	VY1	VY2
Presencia de xanthomonadina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Máxima temperatura de crecimiento:									
37°	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39°	-	-	-	-	-	+	+	+	+
40°	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Máxima tolerancia al NaCl,									
0,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0%	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Anaerobiosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reacción básica	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de ácidos a partir de carbohidratos:	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Fructosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa/sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa/maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+

SC: CC85-92Santa Clara

LM: CC85-92La Mora

53X y 53Y (UCOLA)

VY1: V98-158Yaritagua

ST: CC85-92Santa Teresa

TO: RB74-454Tocoron

CA: RB74-454Carora

VY2: V71-51Yaritagua

Todos los aislamientos coinciden en la presencia de xanthomonadina, con un máximo crecimiento a 37°C, aeróbicos, de reacción básica, oxidasa y catalasa positiva.

No se encontró variación en la utilización del almidón, la esculina, la ureasa y la reducción de nitratos entre los aislamientos estudiados. Pero sí se encontraron diferencias en el comportamiento de los aislamientos para la licuefacción de la gelatina, para la tolerancia al NaCl, la temperatura máxima de crecimiento y la producción de ácidos a partir de la fructosa.

En este estudio fue confirmada la acción inhibidora de la arabinosa y la lactosa igualmente encontrada por Dye (1966) y en contraste con lo descrito por Rivera (1985). Sin embargo, al igual que lo obtenido por estos últimos autores cuando caracterizaron los aislamientos de los focos de escaldadura ocurridos en Cuba entre 1978-1982, se observó variabilidad en la producción de ácido a partir de fructosa y la utilización de la gelatina, destacándose en este sentido las cepas C4 y C10, que también mostraron diferencias con respecto a la longitud celular (Martín et al., 2000).

La coincidencia general que se obtuvo entre las restantes pruebas bioquímicas en la población bacteriana estudiada, confirma lo señalado por otros autores (Yang et al., 1993a; Vauterin et al., 1995), sobre la homogeneidad de las propiedades bioquímicas y fisiológicas de esta especie y su clara delimitación dentro del género *Xanthomonas*.

3.4. CONCLUSIÓN

Existen variaciones entre los aislamientos venezolanos de *Xanthomonas albilineans* con respecto a la producción de ácido a partir de fructosa, la utilización de la gelatina, la tolerancia al NaCl, la temperatura máxima de crecimiento, la morfología de las colonias y la longitud de las células bacterianas, no encontrándose una correspondencia directa entre éstas y las características serológicas y moleculares de los aislamientos.

CAPITULO IV

CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS VENEZOLANOS DE *Xanthomonas albilineans* SOBRE VARIETADES COMERCIALES DE CAÑA DE AZÚCAR

RESUMEN

Con el objeto de evaluar la respuesta de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) a *Xanthomonas albilineans*, vitro plantas de las variedades: V 71-51, PR 61-632, CC 85-92 y RB 74-454, fueron inoculadas bajo condiciones de invernadero por el método de decapitación a los 45 días de trasplantadas y aclimatadas, empleando una suspensión bacteriana de 10^{-6} (2×10^7 unidades formadoras de colonias /ml) de nueve aislamientos colectados: SC, ST, LM, TO, CA, 53X, 53Y, VY1 y VY2 en tres zonas diferentes del país (Aragua, Yaracuy y Lara). Los tratamientos testigo o control fueron inoculados con agua destilada estéril. Se obtuvieron resultados positivos al probar la patogenicidad de todos los aislamientos sobre vitro plantas de caña de azúcar y plántulas de maíz dulce. Los síntomas observados fueron líneas blancas paralelas a la nervadura central de la hoja. La mayor incidencia se presentó en las variedades CC85-92 y RB 74-454, con valores de 51 - 49% de incidencia y 90 - 60% de severidad y las variedades V71-51 y PR 61-632 presentaron una incidencia entre 15 - 30 % y una severidad entre 6 - 20%. Las variedades estudiadas se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con los resultados de incidencia, variedades susceptibles: CC85-92 y RB 74-454 y variedades resistentes: V71-51 y PR 61-632.

CHAPTER IV

CHARACTERIZATION PATHOGENIC OF ISOLATION BACTERIANOS VENEZUELANOS OF *Xanthomonas albilineans* ON COMMERCIAL VARIETIES OF SUGARCANE

ABSTRACT

In order to evaluate the response of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) to *Xanthomonas albilineans*, vitro plants of varieties: V 71-51, PR 61-632, CC 85-92 and RB 74-454, were inoculated under greenhouse conditions by the method of decapitation within 45 days of transplanted and acclimatize, using a bacterial suspension of 10^{-6} (2×10^7 colony- forming units per mililiter) of nine collected isolates: SC, ST, LM, TO, CA, 53 X, 53Y, VY1 and VY2 in three different areas of the country (Aragua, Yaracuy and Lara). Treatments controls were inoculated with sterile distilled water. Positive results were testing the pathogenicity of the isolations on vitro plants of sugar cane and sweet corn seedlings. The observed symptoms were white lines parallel to the midrib of the leaf. The highest incidence occurred in CC85-92 and RB 74-454 varieties with values of 51 - 49 per cent of incidence and 90 - 60% of severity and V71-51 and PR 61-632 varieties had an incidence between 15-30% and severity between 6-20%. The studied varieties can be classified into two groups according to the results of incidence, susceptible varieties: CC85-92 and RB 74-454 and resistant varieties: V71-51 and PR 61-632.

4.1. INTRODUCCIÓN

Los síntomas foliares típicos inducidos por *Xanthomonas albilineans*, están dados por la producción de un grupo de compuestos tóxicos por parte de la bacteria. La albicidina es la principal de estas fito-toxinas y se considera un factor altamente específico de patogenicidad, aunque no el único. La clorosis que ésta provoca en las hojas se debe al bloqueo en la diferenciación de los cloroplastos, inhibiendo la replicación del ADN plasmídico en las células del xilema invadidas por la bacteria. La fitotoxina además, parece ser importante en el desarrollo sistémico de la enfermedad, ya que los aislamientos mutantes *tox⁻* no son capaces de inducir los síntomas en las plantas inoculadas. Se ha señalado también, que presenta actividad bactericida sobre otros procariotas Gram-positivos y negativos (Birch y Patil, 1985, 1987a, 1987b).

Mediante análisis de restricción se determinó la agrupación de al menos dos genes que codifican la síntesis de la albicidina, resultando un fragmento de 48 Kb altamente específico para *Xanthomonas albilineans* (Rott et al., 1996a); a partir del cual se diseñaron iniciadores para la identificación de esta especie mediante PCR. Posteriormente se determinó que estos genes ocupaban un tamaño de 69 Kb en el cromosoma bacteriano, lo cual es superior a lo descrito para otras fitotoxinas bacterianas (Wall y Birch, 1997).

El estudio de los genes de diferentes bacterias (Walker et al., 1988; Birch et al., 1990; Basnayake y Birch, 1995) que confieren resistencia a la albicidina tiene un gran interés en la actualidad para determinar el papel de la fitotoxina en el desarrollo de la enfermedad y potencialmente para conferir resistencia en plantas de caña de azúcar transgénicas (Zhang y Birch, 1997b). Hasta el momento han sido identificados varios mecanismos de resistencia (Zhang y Birch, 1996). A partir del clonaje y secuenciación del gen (*albD*) de *Pantoea dispersa* (sin. *Erwinia herbicola*) se determinó que el mismo codificaba la síntesis de un péptido de 235 aminoácidos con

actividad hidrolasa, que detoxifica la albicidina, el cual no presentó homología con ninguna secuencia conocida (Zhang et al., 1998).

Debido a que la biosíntesis de la albicidina es altamente sensible a la composición del medio, fue desarrollado y optimizado un medio químicamente definido (SMG3), en el cual se obtiene una mayor cantidad de toxina a partir de menos biomasa (Zhang et al., 1999), lo que ha facilitado el estudio de los factores que intervienen en los mecanismos de patogénesis de *Xanthomonas albilineans*.

La bacteria puede estar ordenadamente ubicada en niveles infra-subespecíficos de acuerdo a sus diferencias en patogenicidad. Las razas patogénicas pueden diferir en virulencia, causando un rango de severidad en los síntomas cuando son inoculadas en plantas hospederas; estas variaciones patogénicas pueden ser detectadas por mediciones de ADN. El análisis de secuencias transcriptas en la región intergénica entre 16 y 23 S del ADN ribosomal ha comenzado a estandarizar una técnica en la identificación de bacterias desconocidas (Goncalves y Rosato, 2002). La ventaja de usar esta información genotípica para identificar bacterias es que los caracteres involucrados no se ven afectados por las condiciones nutricionales, ambientales y físicos relacionados con la edad de los microorganismos; lo que hace a estas metodologías más estables y precisas que las pruebas fisiológicas o bioquímicas (Alvarez et al., 1996; Davis et al., 1997; Louws et al., 1999; Pan et al., 1999; Wang et al., 1999; Schaad et al., 2001).

Hasta el momento, no se ha demostrado consistentemente la existencia de una variación en este sentido dentro de la especie. El desarrollo de nuevos brotes de la enfermedad ha sido atribuido varias veces al desarrollo de nuevas cepas del agente causal, existiendo investigaciones que ofrecen ciertas evidencias sobre la posible presencia de diferentes razas de esta bacteria en Mauricio (Autrey et al., 1997). Sin embargo, otras investigaciones, comparando aislamientos de Australia y Hawaii, demostraron que las diferencias observadas en ambos países con respecto a la

severidad de los síntomas estaban dadas por cambios en la composición varietal y los factores climáticos y no por la presencia de diferentes razas del patógeno (Birch, 1980).

Recientemente Filotet, (1999) realizando un estudio de patogenicidad de dos aislamientos procedentes de Barbados y del Sureste de Asia, en cinco variedades de caña de azúcar, encontró que el procedente de Barbados se comportó más agresivo y virulento.

La aparente ausencia de razas fisiológicas en *X. albilineans* no significa que dentro de la especie no exista variación en cuanto a la agresividad, habiéndose encontrado que los aislados más agresivos atacan las variedades resistentes en un grado proporcional a la concentración del inóculo. Por otra parte, la ausencia de variedades de caña diferenciadoras de razas fisiológicas se debe probablemente a las características botánicas y la complejidad genética del cultivo y la vida efímera de clones con resistencia monogénica. Así, la ocurrencia de razas fisiológicas es extremadamente difícil a causa de los mecanismos de resistencia poligénica de origen polifilético que opera en la caña de azúcar (Tokeshi, 1986).

La variación en la colonización del follaje de los cultivares de caña de azúcar que difieren en su resistencia a la escaldadura foliar y el progreso de las poblaciones del patógeno durante cosechas sucesivas es, sin embargo, todavía desconocida. Algunos investigadores han reportado que el tamaño de las poblaciones epifíticas parece crítica pero no lo suficiente como para causar la infección del tallo, después de que ha ocurrido la transmisión aérea del patógeno causal de la hoja (Daugrois et al., 2003, 2005).

En las evaluaciones de variedades para la determinación de resistencia a escaldadura foliar se buscan los métodos más adecuados para ubicar a cada variedad dentro del

tipo de reacción correcta (Guevara y Ovalle, 2005; Iglesias et al., 2003; Ovalle et al., 1995).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal a inocular

Para las inoculaciones se utilizaron cuatro variedades de caña de azúcar, dos resistentes: V 71-51, PR 61-632 y dos susceptibles: CC 85-92, RB 74-454 (según recomendaciones de CENICAÑA - Colombia); las cuales se limpiaron por termoterapia, se multiplicaron por vía *in vitro* y se conservaron aclimatadas por 45 días después del trasplante en invernadero hasta su inoculación. También se utilizaron plántulas de maíz híbrido extra-dulce Swett Valey de 7 días de germinadas en sustrato esterilizado para la reactivación de algunos aislamientos que presentaban muy lento crecimiento.

4.2.2. Identidad de los aislamientos colectados

Se evaluaron nueve aislamientos: SC, ST, LM, TO, CA, 53X, 53Y, VY1 y VY2 de diferentes variedades de caña de azúcar (CC85-92, RB74-454, V98-158 y V 71-51) y diferentes localidades de tres estados del país: Aragua, Yaracuy y Lara. En el punto 3.2.1 el Cuadro 4 señala los aislamientos colectados y purificados, y en el punto 3.2.2 el procedimiento para el aislamiento, cultivo y preservación de los mismos.

4.2.3. Pruebas de patogenicidad

El método empleado para caña de azúcar fue el de gota sobre corte de cogollo (decapitado por encima de la zona meristemática), se inocularon 0.5 ml de la suspensión bacteriana encima del ápice descogollado y posteriormente se cubrieron con papel de aluminio a manera de tapones (Koike, 1965; Rivera, 1985). El mismo

método fue utilizado en maíz dulce Swett Valey para la reactivación de aislamientos que perdían velocidad de crecimiento en su incubación (Sordi y Tokeshi, 1986; 1987).

Para las pruebas de patogenicidad fueron inoculadas seis plantas por aislamiento y variedad con tres repeticiones, distribuidas completamente al azar. El inóculo fue preparado en medio Wilbrink a partir de una colonia crecida en placa durante 48 horas (ver procedimiento en Fig.8). Las suspensiones bacterianas inoculadas se prepararon a partir de diluciones ajustadas en una solución tampón de fosfato 0,01M (pH 7,2), utilizando la dilución de 10^{-6} (2×10^7 ufc/ml) (Rivera, 1985; Rott et al., 1995).



Figura 8. Método de decapitado en prueba de patogenicidad en caña de azúcar.

La inoculación se realizó cuando las vitro plantas tenían 45 días de aclimatización bajo invernadero. El control fue inoculado con agua destilada estéril. A los 2 después de la inoculación (ddi) los encapsulados de aluminio fueron retirados. Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero e inspeccionadas diariamente hasta los 30 días post-inoculación.

Las observaciones iniciales registradas fueron: tiempo de ocurrencia de los primeros síntomas para la interacción variedad x aislamiento, finalmente se analizará la agresividad de los aislamientos por su colonización en el tallo, medida por el conteo de ufc(unidades formadoras de colonias) g⁻¹ de tejido fresco después de 35 ddi.

Las variables de respuesta valoradas para caracterizar la enfermedad en el tiempo y detectar susceptibilidad a escaldadura de las variedades comerciales evaluadas fueron: incidencia y severidad.

4.2.4. Pruebas de incidencia y severidad

La evaluación de la incidencia se realizó diariamente la primera semana después de la inoculación, para detectar oportunamente la aparición de síntomas y luego semanalmente a partir del día de inoculación hasta los 30 días post inoculación. La incidencia se determinó basándose en el número total de plantas y las que presentaron síntomas de escaldadura, tales como, líneas blancas paralelas a la nervadura principal en hojas inoculadas y de rebrote, con la ecuación:

$$I_i = \frac{\sum n_i}{N_i}$$

Donde I_i , n_i y N_i son, la incidencia de la enfermedad, el número de plantas enfermas y el número total de plantas evaluadas en el momento i . El análisis de varianza y la comparación de medias entre tratamientos con diferencia significativa se realizó con SAS® y la prueba de Tukey ($p=0,05$).

La severidad se determinó de acuerdo con la escala de severidad del Cuadro 7, elaborada con el Programa Dos-log®, basándose en la proporción de tejido foliar enfermo en relación con el total de cada planta. De acuerdo con el promedio de severidad de las plantas enfermas y a la población total de la variedad se determinó el

porcentaje promedio de severidad por tratamiento (Huerta et al., 2003). El análisis estadístico se realizó con el Programa Statistica®5.1 empleando la prueba del signo, la cual permite detectar diferencia significativa entre dos muestras apareadas en la estadística no paramétrica.

Cuadro 7. Escala logarítmica para evaluar severidad de *Xanthomonas albilineans* en caña de azúcar.

Clase de severidad	Límite Inferior %	Límite Superior %	Síntomas en hoja
0	0	0	Hoja sana
1	0	5,7	1-2 líneas blancas estrechas
2	5,7	19,7	≥2 líneas blancas estrechas
3	19,7	50,0	20-50% albina o clorótica
4	50,0	80,2	50-20% de tejido verde
5	80,2	91,2	20-10% tejido verde, resto albino
6	91,2	96,5	10 - 4% tejido verde, resto muerto
7	96,5	100	Hoja muerta o totalmente albina

4.2.5. Reaislamiento de la bacteria de plantas inoculadas

A los 30 días se tomaron dos plantas por tratamiento, se desinfectaron y se procedió para obtener los reaislamientos presentes en las plantas inoculadas. Se realizó el reaislamiento del patógeno y se comprobó su identidad mediante n-PCR.

Cuando se lograron los reaislamientos (Postulados de Koch) estos fueron inoculados en plántulas de maíz dulce para su reactivación (Figura 9), posteriormente los aislamientos logrados a partir de las hojas inoculadas se conservaron en medios mínimos para ser almacenados a temperatura ambiente y en glicerol (15%) para ser conservados a -20°C.

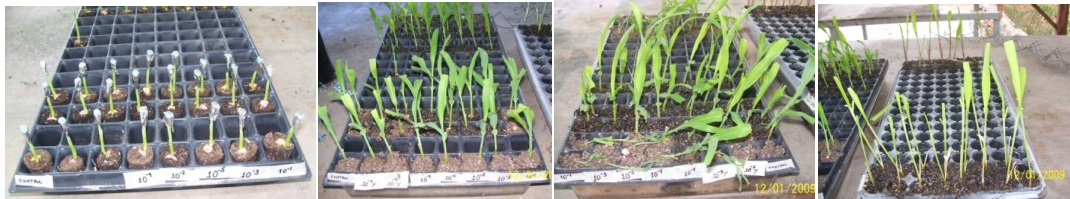


Figura 9. Reactivación de aislamientos de *Xanthomonas albilineans* en maíz dulce

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Pruebas de incidencia y severidad

El desarrollo de la enfermedad fue mayor en la variedad CC 85-92 con una incidencia máxima del 51 % y una severidad del 90 % (Cuadro 8), le sigue en orden de significancia la variedad RB 74-454 con una incidencia del 49% y una severidad del 60%; por último se agrupan las variedades PR 61-632 y V 71-51 con una incidencia entre 15 – 30 % y una severidad entre 6 – 20%.

Cuadro 8. Incidencia máxima y severidad de escaldadura foliar en plantas inoculadas.

Variiedad	IM (%)	Severidad
CC 85-92	50,76 a	90% (4) a
RB 74-454	49,44 b	60% (3) a
V 71-51	29,58 c	20% (2) b
PR 61-632	15,40 c	6% (1) b

Letras distintas difieren para Tuckey $p \leq 0.05$.

Los primeros síntomas de escaldadura se detectaron en la variedad CC 85-92, 7 días después de la inoculación (ddi) con 5% de incidencia y 10 % de severidad (Figura 10). A los 21 ddi se detectó la enfermedad en todas las variedades inoculadas,

alcanzando su máxima expresión a los 28 ddi independientemente del aislamiento inoculado. Sólo la variedad PR 61-632 presentó síntomas a partir de los 14 ddi, con una incidencia del 2% y una severidad de 3%.

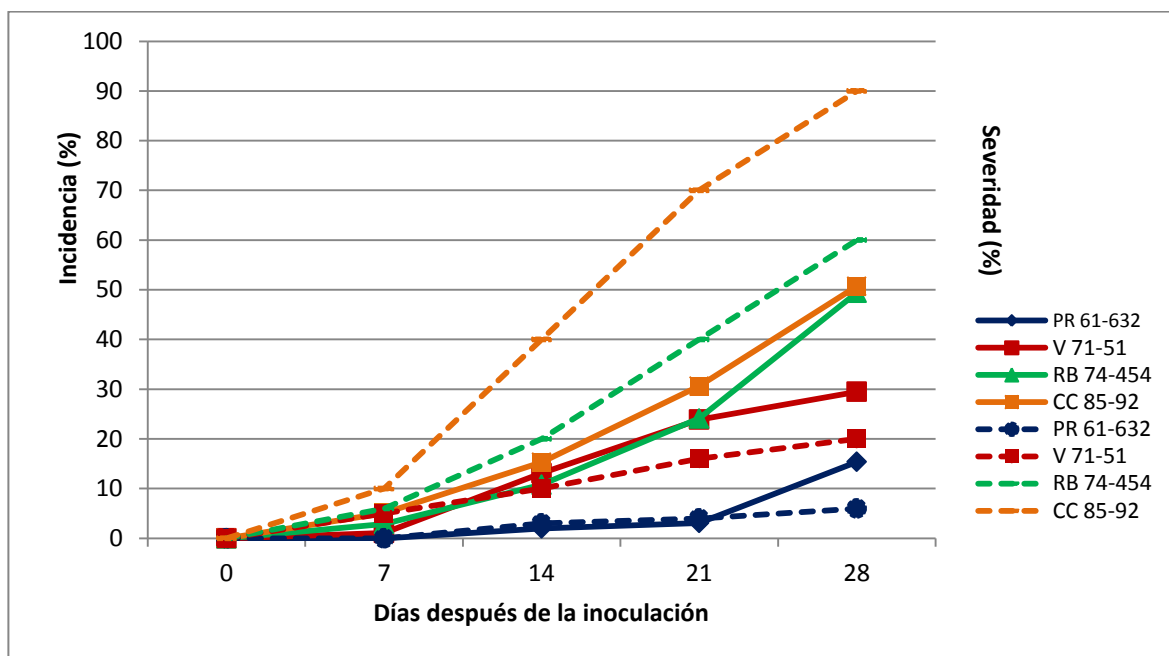


Figura 10. Progreso de la escaldadura foliar en variedades inoculadas con *X. albilineans*. (Líneas continuas: incidencia y discontinuas: severidad).

La enfermedad después de los 30 ddi empieza a presentar dificultad para su evaluación visual por el enmascaramiento de síntomas y por la senescencia foliar, esto fue observado también por Rott et al., 1995.

Las variedades utilizadas como testigo no presentaron síntomas aún cuando estaban bastante próximas o cercanas a las inoculadas, contrario a lo demostrado en otras investigaciones donde usualmente ocurren contaminaciones por salpicaduras o transmisión aérea de la bacteria en ensayos de campo (Rott et al., 1995; Huerta et al., 2003b, 2009). Lo que significa que trabajar bajo invernadero ofrece mejores condiciones para evaluar el progreso de la enfermedad.

El progreso de la enfermedad tiene la misma tendencia para incidencia y severidad en todas las variedades de caña de azúcar acá evaluadas, es ascendente hasta los 28 ddi y a partir de ese momento se hace aparentemente uniforme; dado que evaluaciones a los 28 ddi y 35 ddi dieron los mismos resultados.

A los 35 ddi se procedió a evaluar la dinámica poblacional de cada aislamiento (Cuadro 9) por cada una de las variedades inoculadas, se contaron las unidades formadoras de colonias presentes por gramo fresco de tejido vegetal inoculado y macerado para los reaislamientos.

Cuadro 9. Dinámica poblacional de los aislamientos de *X albilineans* evaluados, bajo condiciones de invernadero ($\times 10^7$ ufc g^{-1} de tejido fresco después de 35 ddi).

Aisl.	SC	ST	LM	TO	CA	53X	53Y	VY1	VY2
CC85-92	3,9	3,4	3,4	3,8	3,2	3,5	3,5	3,3	3,7
RB74-454	3,6	3,0	3,0	3,7	3,0	3,0	3,1	3,3	3,6
V71-51	1,5	2,0	2,4	2,0	2,2	2,2	2,1	2,2	2,8
PR61-632	0,9	1,9	1,7	1,8	1,7	1,9	2,0	1,8	1,9

En esta evaluación los nueve aislamientos utilizados no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, sin embargo, fue fácil observar aparente agresividad de los aislamientos SC, TO y VY2 en comparación con los demás, por la colonización agresiva de los tallos de las plántulas, basados en el número de ufc g^{-1} de tejido fresco. Sobre la única evidencia de que los síntomas característicos se presentaron muy temprano, a los 7 ddi en la variedad más susceptible CC 85-92; existe una significativa heterogeneidad génica y una estrecha relación entre aislamiento x variedad, tal cual como lo hacen debatible otros investigadores (Autrey et al., 1995a; Rott y Davis, 1996; Davis et al., 1997).

En el país no existen trabajos experimentales para comparar los resultados aquí obtenidos en función de variedades susceptibles y resistentes para escaldadura foliar. Los grupos utilizados por Rott et al., (1997), para clasificar a las variedades de caña inoculadas, de acuerdo a incidencia son: intermedia o tolerante (incidencia >15 y $\leq 60\%$) y resistentes (incidencia $\leq 15\%$), y en relación con severidad son: altamente susceptibles ($>95\%$), susceptibles ($>60\%$), intermedias ($>20\%$ y $\leq 60\%$) y resistentes ($\leq 20\%$). Esto ubica a las variedades acá evaluadas: CC 85-92 y RB 74-454 como susceptibles, V 71-51 y PR 61-632 como resistentes.

Los resultados obtenidos indican que las variedades con mayor incidencia (CC 85-92 y RB 74-454) coinciden precisamente con las que se cultivan en una amplia superficie del país, por sus características azucareras, ubicando a la enfermedad como factor de riesgo para el incremento de la superficie a sembrar en los últimos años en algunas áreas de los estados Lara y Aragua.

4.3.2. Reaislamiento de la bacteria de plantas inoculadas

De todas las variedades inoculadas se reaisló la misma bacteria para cada aislamiento, después de aislados en medio Wilbrink e incubados por cuatro días a 30°C , se comprobaron sus características culturales, morfológicas y fisiológicas; posteriormente en aislamientos puros de 72 hr se comprobó por PCR su identidad con el primer específico para *X albilineans*, ALA4/L1. Se corroboró la identidad de cada aislamiento inicial con el reaislado por la visualización de las amplificaciones a 360 pb (Figura 11), iguales resultados fueron reportados por Pan et al., (1999).

Avances en la biología molecular proveen de nuevas herramientas e información para determinar y garantizar con una técnica sencilla y precisa que los aislamientos logrados conservan su identidad inicial.

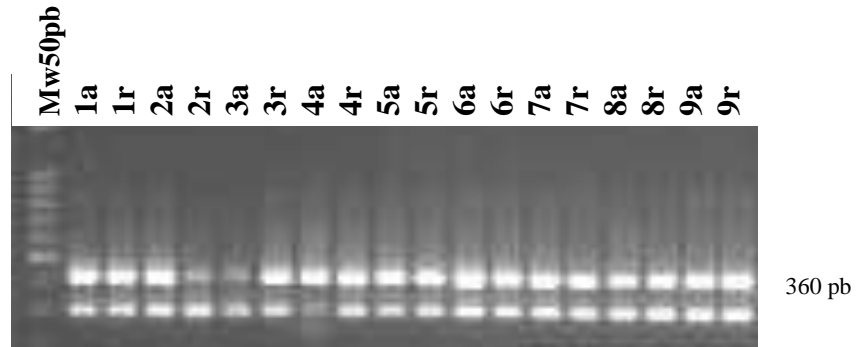


Figura 11. Amplificaciones obtenidas mediante PCR, para los nueve aislamientos.
 1: SC, 2:ST, 3:LM, 4:TO, 5:CA, 6:53X, 7:53Y, 8:VY1 y 9:VY2, a: aislado y r: reaislado.

4.4. CONCLUSIONES

Evaluar la patogenicidad de esta enfermedad en nuestras variedades comerciales es información básica para los programas de mejoramiento genético en caña de azúcar, en este estudio se concluye que las variedades CC 85-92 y RB 74-454 son susceptibles a la escaldadura foliar ocasionada por la bacteria *X albilineans* y las variedades V 71-51 y PR 61-632 son resistentes. Los nueve aislamientos evaluados no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, sin embargo, fue fácil observar aparente agresividad de los aislamientos SC, TO y VY2 en comparación con los demás.

CAPITULO V

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS VENEZOLANOS POR TÉCNICAS SEROLÓGICAS

RESUMEN

Se compararon tres métodos serológicos diferentes: aglutinación, inmunodifusión y ELISA indirecta para detectar en nueve aislamientos venezolanos diferentes, de tres estados del país: Aragua, Yaracuy y Lara; la presencia del agente causal de la escaldadura foliar en caña de azúcar. Se preparó el antisuero contra *Xanthomonas albilineans* de un aislamiento colombiano (CENICAÑA), de muy alta titulación (1:2400) y especificidad. Se obtuvieron buenas reacciones serológicas con los aislamientos puros de suspensiones bacterianas en las pruebas de aglutinación e inmunodifusión (doble difusión en placa) para los nueve aislamientos evaluados. En la prueba de ELISA indirecta se pudo detectar la presencia del agente causal en la savia cruda de plantas inoculadas y resultaron negativas las plantas sanas no inoculadas. Se enfatiza la importancia del uso de métodos simples y sensibles para el diagnóstico de enfermedades en caña de azúcar.

CHAPTER V

CHARACTERIZATION OF ISOLATION BACTERIANOS VENEZUELANOS BY TECNICS SEROLOGICAL

ABSTRACT

Three different serological methods were compared: agglutination, immunodiffusion and indirect ELISA to detect nine different from three States Venezuelan isolations: Aragua, Yaracuy and Lara; the presence of the causal agent of the leaf scald in sugar cane. Preparation of antiserum against *Xanthomonas albilineans* of Colombian isolation (CENICAÑA), very high qualifications (1: 2400) and specificity. Good reactions serological with pure isolates of bacterial suspensions on the evidence of agglutination and immunodiffusion (double diffusion plate) for the nine tested isolates were obtained. Indirect ELISA test could detect the presence of the causal agent in inoculated plants raw sap and not inoculated healthy plants were negative. It emphasizes the importance of the use of simple and sensitive methods for the diagnosis of diseases in sugar cane.

5.1. INTRODUCCIÓN

X. albilineans es una bacteria muy variable. Muchas variantes serológicas, genéticas y patogénicas han sido identificadas. Hasta el momento se ha determinado la existencia de seis lisovares, de los cuales el I y el II están representados por un aislamiento cada uno de la Florida y Australia respectivamente; el III por aislamientos de diferentes orígenes geográficos (Reunión, Mauricio, Sudáfrica y Australia); el lisovar IV resultó más heterogéneo y se encuentra formado por aislamientos de diferentes zonas geográficas (Guadalupe, India, Australia); el V lo integran dos aislamientos del Caribe y el VI los de la región de África Tropical, siendo el grupo más homogéneo (Rott et al., 1995).

Las propiedades lisotípicas, serológicas y los perfiles de proteínas han sido correlacionados entre sí y con el origen geográfico de los aislamientos (Rott et al., 1995; Yang et al., 1993a). El estudio de 65 aislamientos de 22 zonas geográficas, estableció la existencia de dos grupos bien definidos de acuerdo al análisis de proteínas realizado utilizando los métodos electroforéticos en gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio. El primero de éstos estuvo representado por 48 aislamientos de todas las localidades excepto Fiji y África Tropical y el segundo, por 17 de estas dos localidades. Los mencionados aislamientos fueron sometidos además al análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) mediante cromatografía líquida y se establecieron tres grupos que incluyeron indistintamente aislamientos de todas las regiones estudiadas (Yang et al., 1993b).

Las técnicas serológicas han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico de fitobacterias (Comstock , 2001), incluyendo el género *Xanthomonas* (Alvarez et al., 1996). La variabilidad antigénica detectada en *X. albilineans* debe ser considerada cuando se aplican métodos serológicos para su diagnóstico, pues su efectividad puede ser afectada si no se dispone de antisueros capaces de reaccionar con los serovares conocidos de la bacteria (Rott et al., 1997).

Para el diagnóstico serológico de *X. albilineans* han sido evaluadas diferentes técnicas, entre ellas la microaglutinación y la doble difusión en agar (IDD) (Ricaud y Ryan, 1989), la inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI) (Rott et al., 1995; Rott, 1995; Guzman et al., 1997), el ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Comstock y Lentini, 2005; Ramos y Barbosa, 2005; Wang et al., 1999), la aglutinación en látex (Autrey et al., 1997) y el TBIA (Tissue blot enzyme immunoassay) (Davis et al., 1994; 1997), utilizando antisueros y anticuerpos monoclonales para esta especie (Alvarez et al., 1996).

La microaglutinación y la IDD tienen una aplicación limitada ya que dependen de muchos factores físicos-químicos y no permiten detectar la bacteria directamente en el tejido foliar, lo que ha sido posible mediante las restantes técnicas serológicas (Rott et al., 1997; Ricaud y Ryan, 1989; Autrey et al., 1997).

La variabilidad antigénica en *X. albilineans* fue descubierta por Baudin y Chatenet, (1980). Con posterioridad, Rott y Chatenet, (1998), establecieron la existencia de tres serovares mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), lo que fue confirmado más tarde mediante la utilización de otras técnicas serológicas, como la aglutinación, el Dot Blot y el ELISA (Davis et al., 1997; Rott et al., 1997).

El serovar I, denominado "Mascarena", se encuentra ampliamente distribuido, agrupando cepas del 68% de las localidades estudiadas, incluyendo países de todos los continentes afectados por la enfermedad, como, Argentina, Australia, EE.UU, Guadalupe, India, Sudáfrica y Taiwán. El serovar II, denominado "Africano", contiene cepas de Burkina Faso, Camerún, Kenya, Costa de Marfil, Reunión y más recientemente Mauricio (Autrey et al., 1995b) y las Islas Reunión. El serovar III, llamado inicialmente "Antillano", contiene cepas de las islas caribeñas (Guadalupe, Saint Kitts, Martinica), Oceanía (Fiji) y Asia (Sri Lanka).

De acuerdo al análisis realizado por estos investigadores, en la mayoría de los países (89%) existía sólo un serovar, pero en Guadalupe, Martinica y Saint Kitts fueron encontrados los serovares I y III, aunque correspondían a aislamientos distanciados en el tiempo. Así, el serovar III fue identificado en aislamientos de Guadalupe y Saint Kitts realizados 20 años más tarde, mientras todos los aislamientos recientes pertenecían al serovar I. Por el contrario, los aislamientos de Martinica realizados en 1932 y 1957 pertenecían al serovar I, mientras que el obtenido en 1989 fue clasificado como serovar III (Rott et al., 1997).

Se ha podido demostrar que los lisovares V y VI se corresponden con los serovares III y II respectivamente y que el serovar I agrupa al resto de los lisovares. Estos resultados demuestran que las propiedades serológicas y lisotípicas pueden ser usadas para estudiar la estructura de las poblaciones de *X. albilineans* (Rott et al., 1995, 1997).

Aunque no existen resultados conclusivos sobre la correspondencia de las variantes serológicas con diferencias patogénicas, se han observado diferencias en la virulencia entre aislamientos de los serovares I y II e incluso dentro de aislamientos del mismo serovar (Autrey et al., 1997).

Por otra parte, *X. albilineans* ha sido diferenciada de otras especies de *Xanthomonas* utilizando anticuerpos monoclonales (AcM). Los tres serovares determinados por Rott et al., (1995), fueron claramente delimitados mediante ELISA utilizando los AcM Xa1, Xa2 y Xa3 y separados además en ocho subgrupos con los AcM Xa5, Xa6 y Xa8. El AcM Xa7 resultó útil para la rápida identificación de *X. albilineans* ya que reaccionó con todos los aislamientos evaluados (Alvarez et al., 1996).

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Prueba de aglutinación

Esta prueba consiste en hacer reaccionar cantidades equivalentes de los reactantes Ag y Ac, la formación de gránulos aglutinados o agregados indican una reacción positiva. Su procedimiento:

1. Tomar el jugo puro extraído tanto de la muestra como del testigo y realizar diluciones seriadas hasta 1:10.000.
2. En láminas portaobjetos grabadas o especiales para el conteo de células, colocar en cada pozo 30 μ l de la dilución correspondiente, dejar secar sólo o pasar suavemente por mechero de alcohol (Figura 12).
3. Observar bajo microscopio la concentración bacteriana presente en cada pozo.



Figura 12. Prueba de aglutinación.

5.2.2. Inmunodifusión (doble difusión en placa)

Se prepara un gel de agarosa al 0,7% (0,07 gr de agarosa en 10 ml de PBS buffer fosfato), se agita con calor hasta que hierva. Vaciar en las placas de petri bajo cámara de flujo laminar y dejar enfriar.

Cada placa es perforada con un dispositivo de 7 orificios, uno central y seis alrededor equidistantes a éste. En cada orificio o pozo externo se agrega una muestra a evaluar y en el orificio central se coloca el antígeno a enfrentar (Figura 13). Se

utilizaron dos controles negativos: *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. La interpretación se hará de acuerdo a la aparición de líneas precipitadas.



Figura 13. Inmunodifusión (doble difusión en placa).

5.2.3. Elisa indirecta

La técnica inmunoenzimática ELISA se basa en la interacción específica de un antígeno y un anticuerpo, la reacción se visualiza a través de la acción de un conjugado enzima-anticuerpo sobre un sustrato. Se utilizan microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de adsorción (fenómeno de superficie) de moléculas y con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA.

La técnica utilizada fue ELISA indirecta (Peralta et al., 1997; Martín et al., 2000), el sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario; la detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran cantidad de antígenos. Su procedimiento:

1. Macerar 0,1 g de hoja en 300 µl (dilución 1/10) de buffer carbonato -

bicarbonato (0,05M, pH 9,6). Centrifugar los trozos de hojas y coleccionar el jugo (Figura 14). Si se trata de aislamientos bacterianos, se trabaja con cultivos puros de 72 h, cada placa de petri se diluye con 1 µl de agua destilada estéril (10^6 ufc/ ml) de allí se utiliza una dilución 1/10 con buffer carbonato - bicarbonato (0,05M, pH 9,6).

2. Colocar 100 µl de aislamiento bacteriano, savia de las hojas maceradas o jugo de tallo centrifugado en cada una de los pozos de una placa de microtitulación o elisa. En cada placa se colocaron controles positivos y negativos, como también blancos. Dejar incubar por 1 h a 37°C. Sensibilización.
3. Adicionar a cada pozo 100 µl de PBS + Tween 0,05% + Leche descremada 5% y dejar incubando durante 30 minutos. Bloqueo.
4. Después de la incubación y entre cada uno de los pasos a realizar, lavar la placa tres veces con PBS + Tween (PBST).
5. Diluir el antisuero en PBST + Leche descremada 2,5% y adicionar a cada pozo 100 µl. Incubar por una hora (antisuero primario CENICANÑA dilución 1/2.000). Repetir el paso 4. Reacción antígeno – anticuerpo.
6. Después de la incubación con el antisuero primario (antiescaldadura), diluir el conjugado anti rabbit con fosfatasa alcalina (dilución 1/8.000) en PBST + Leche descremada 2,5% y adicionar a cada pozo 100 µl a cada pozo (antisuero secundario). Incubar por una hora. Repetir el paso 4. Reacción enzima conjugado – Anti-rabbit.
7. Adicionar 100 µl a cada pozo de p-nitrofenilphosphate disodium salt (PNPP) 0,6 mg / ml en diethanolamina al 10%. Dejar incubando durante 45—60

minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Reacción enzima – sustrato.

8. Leer a 450 nm en el lector de ELISA LABSYSTEMS MULTISKAN – EX Versión 1.0. Tipo 355. Son positivos los pozos que presenten una coloración amarilla, valores mayores a 0,05 en el espectrofotómetro o tres veces el valor de la absorbancia de los controles negativos.

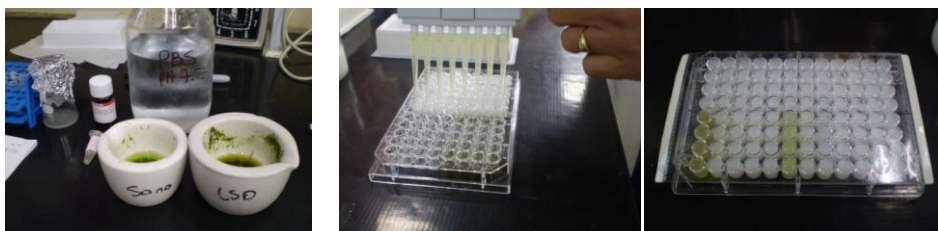


Figura 14. Elisa indirecta.

5.2.4. Producción y purificación del antisuero CENICAÑA.

El antisuero se inició con la producción del antígeno a partir de cultivos puros de *X. albilineans* en medio de Wilbrink, los cuales se lavaron tres veces en tampón salino de fosfato (PBS) 0,01M pH 7,2 estéril, posteriormente se centrifugó a 10.000rpm durante 15 minutos bajo refrigeración; las células bacterianas se suspendieron a una concentración de 0,5 de densidad óptica y 600nm en un espectrofotómetro. La suspensión bacterial se dializó en glutaraldehído al 2% en PBS durante 4 h, seguido de dos lavados con PBS por diálisis.

El antígeno preparado se congeló previa comprobación de la muerte de las células, para luego ser utilizado en la preparación del antisuero. Con el antígeno preparado se inmunizaron conejos de la raza New Zealand de cuatro meses de edad, para la obtención de antisueros; el proceso de inmunización se llevó a cabo mediante cuatro inyecciones intravenosas (0,5-1,0-2,0 y 3,0 ml) cada 4 días, seguidas de tres inyecciones intramusculares (1,5-2,0 y 2,5 ml), mezcladas con volúmenes iguales de

adyuvante incompleto de Freund, cada ocho días. A los 15 días de la última inyección, se tomaron muestras de sangre y con el suero obtenido se hizo una titulación de anticuerpos producidos, por medio de la prueba de microaglutinación, para determinar el momento oportuno de la sangría final. Se obtuvieron de 30-40 ml de sangre y el suero obtenido se congeló para su posterior purificación.

La purificación de inmunoglobulinas se logró empleando sulfato de amonio, el antisuero purificado se centrifugó en frío a 1.000rpm y se pasó por una membrana Millipore R de 0,22mm de poro, para eliminar contaminantes y finalmente congelarlo para su posterior utilización.

El antisuero purificado se probó por medio del método de ELISA indirecto e Inmunofluorescencia indirecta para determinar su especificidad (Cuadro 10). Para determinar el título y la sensibilidad en la detección del antisuero preparado en CENICANÑA se hicieron pruebas resumidas en el Cuadro 11. Determinándose los títulos óptimos, para el antisuero 1:2000 y para el antígeno 10^6 células / ml.

Cuadro 10. Especificidad del antisuero contra *X albilineans* preparado en Cenicaña.

Reacción	IFA	ELISA
Especie bacteriana		
<i>Pseudomonas rubrisubalbicans</i>	Negativo	Negativo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Negativo	Negativo
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	Negativo	Negativo
<i>Xanthomonas campestris pv. phaseoli</i>	Negativo	Negativo
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Negativo	Negativo
<i>Leifsonia xyli subsp xyli</i>	Negativo	Negativo
<i>Xanthomonas albilineans</i>	Positivo	Positivo

Cuadro 11. Titulación de antisueros contra *X albilineans* preparado en Cenicaña.

Antisuero	1:50	1:300	1:600	1:1200	1:2400	1:20000
Antígeno						
10^7	+	+	+	+	+	+
10^6	+	+	+	+	+	±
10^5	±	±	±	±	±	-
10^4	-	-	-	-	-	-
10^3	-	-	-	-	-	-

Reacción de ELISA: + positiva, ± débil y - negativa.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los tres métodos serológicos implementados: aglutinación, inmunodifusión (doble difusión en placa) y ELISA indirecta se evaluaron positivamente los nueve aislamientos y plantas inoculadas; negativos resultaron las plantas sanas no inoculadas y los controles negativos: *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

Se diagnosticó favorablemente por medio de los tres métodos serológicos, con un antisuero de título 1:2000 aún cuando los resultados revelaron que se podría utilizar hasta en una dilución de 1/2400; así mismo, de los límites de detección de antígenos probados (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7), 10^6 células / ml, fue satisfactorio para la bacteria en aislamientos puros y en savia cruda y clarificada.

5.3.1. Prueba de aglutinación

Por medio de esta prueba se pudo conocer la concentración bacteriana presente en cada aislamiento evaluado.

5.3.2. Inmunodifusión (doble difusión en placa)

La aparición de líneas precipitadas entre los diferentes aislamientos probados y el antisuero de CENICANÑA para escaldadura, demostró su identidad con *X albilineans*. Algunas líneas son más estrechas y cerradas que otras, pero todos los aislamientos probados mostraron identidad con el antisuero. Se corrobora la especificidad del antisuero por la no reacción de los controles negativos utilizados: *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Se hace necesario realizar las mismas pruebas pero con diferentes antisueros para los tres serogrupos conocidos mundialmente: I (serotipo R8), II (serotipo HV5) y III (serotipo G7); con los cuales no se contaron para el momento de las evaluaciones.

5.3.3. Elisa indirecta

Se comprobó la identidad de los nueve aislamientos bacterianos con el antisuero para escaldadura foliar de *Xanthomonas albilineans*, tanto en aislamientos puros como en savias crudas inoculadas (controles positivos), los resultados se muestran en la Figura 15; obsérvese los pocillos con coloración amarilla y los controles negativos (savia de plantas sanas sin inocular) no presentan esa coloración.

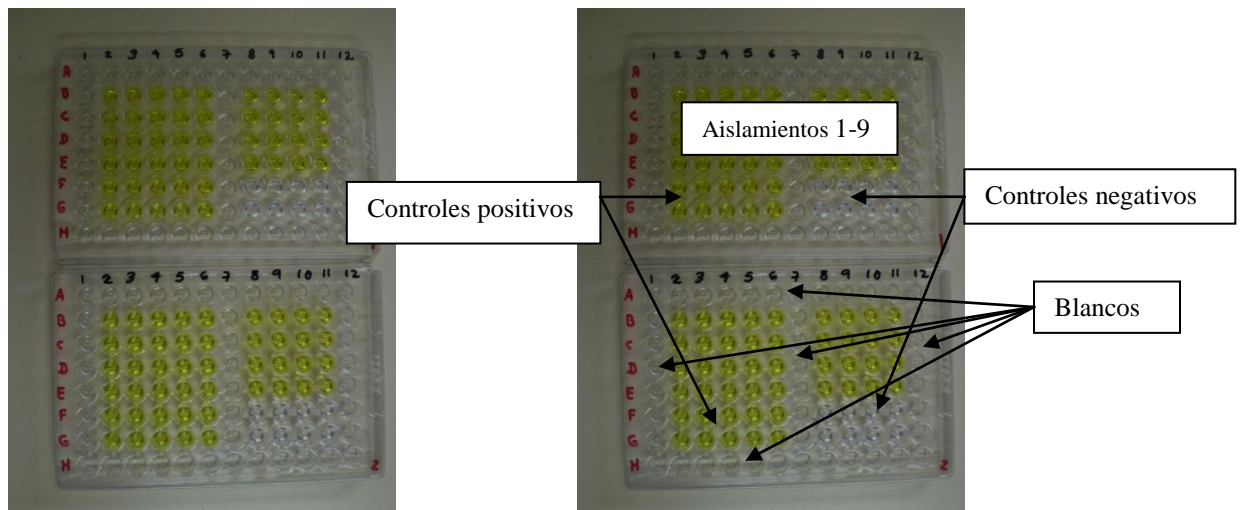


Figura 15. Placa ELISA indirecta con los aislamientos de Aragua, Yaracuy y Lara.

5.4. CONCLUSIONES

Las técnicas serológicas por inmunodifusión además de ser métodos muy confiables y sensibilidad moderada tienen la ventaja de poder asimilar gran cantidad de muestras en algunas horas, luego los resultados positivos y sospechosos se confirman mediante las pruebas de patogenicidad.

ELISA es un método muy rápido, de gran sensibilidad, relativa especificidad y bajo costo, que supera a muchas otras técnicas de diagnóstico empleadas con anterioridad. Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA, todas basadas en el mismo principio. Esta técnica es de gran utilidad en la detección de fitopatógenos.

Todas estas técnicas serológicas requieren de antisueros muy específicos para que la detección del agente sea precisa.

CAPITULO VI

DIAGNÓSTICO FITOPATOLÓGICO PARA *Xanthomonas albilineans* Y COMPARATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS SEROLÓGICAS

RESUMEN

El control de las enfermedades en caña de azúcar se realiza utilizando semilla sana, para lo cual es necesario verificar la ausencia de patógenos en un programa de semilla de calidad fitosanitaria; en este trabajo se contó con métodos de diagnóstico confiables y sensibles. Se presentan los resultados de la implementación de los métodos inmunoenzimáticos del Tissue-blot (TBIA) y Dot-blot (DBIA) para el diagnóstico de escaldadura foliar. Para el TBIA se hicieron impresiones de tejido foliar y para DBIA suspensiones bacterianas; en ambos casos se colocaron las muestras sobre membranas de nitrocelulosa y se empleó un antisuero específico. Los dos métodos mostraron buena especificidad y sensibilidad; la combinación de los dos permitió determinar la presencia e incidencia de la enfermedad en el área evaluada. El muestreo no destructivo facilita la labor en el campo, el transporte y conservación de las muestras. Estos métodos son rápidos, sencillos, económicos y no requieren equipos sofisticados, con la ventaja de poder evaluar simultáneamente un gran número de muestras.

CHAPTER VI

DIAGNOSTIC PHYTOPHATHOLOGICAL THE *Xanthomonas albilineans* AND COMPARISON OF SEROLOGICAL TECHNIQUES

ABSTRACT

Control of these diseases is made using of disease free-seed for which it is necessary to verify the absence of pathogens in program the seed the quality phytosanitary; in this paper was counted on reliable and sensible methods of diagnosis. This presents the results of the implementation of the enzyme immunoassay of tissue-blot (TBIA) and dot-blot (DBIA) for the diagnosis of leaf scald. The TBIA printings were made of leaves and for DBIA bacterial suspensions; in both cases samples were placed on membranes of nitrocellulose and specific antiserum. Both methods showed good specificity and sensitivity; the combination of both allowed determining the presence and incidence the disease in the evaluated area. This is a non destructive sampling that facilitates the work in the field, transport and conservation of the samples. These methods are fast, simple, economic and they do not require sophisticated equipment and a great number of samples could be evaluated simultaneously.

6.1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la escaldadura foliar se basa en la observación de los síntomas visibles, el aislamiento del patógeno (Davis et al., 1994), la utilización de métodos serológicos (Rott et al., 1995; 1997) y más recientemente el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Honeycutt et al., 1995; Pan et al., 1997, 1999; Davis et al., 1997, Wang et al., 1999).

Comstock e Irey (1992) compararon el TBIA, el ELISA y el aislamiento in vitro, para detectar *X. albilineans* en diferentes posiciones del tallo de caña de azúcar y determinaron que los mayores niveles de la bacteria se encuentran en el tercio superior del tallo, tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas, en las cuales el nivel de la bacteria es bajo y su distribución desigual. De acuerdo a los resultados de estos autores, el TBIA y el aislamiento de la bacteria fueron las técnicas más útiles y efectivas para la detección de *Xanthomonas albilineans* en infecciones latentes.

Los límites de detección informados para los ensayos con esta bacteria varían de acuerdo a la técnica y los resultados difieren en diferentes autores. Autrey et al., (1995b, 1997) señalan la posibilidad de detectar 1×10^5 , 1×10^1 y 1×10^0 cel/ml para la inmunofluorescencia, la floculación en látex y el ELISA directo, respectivamente.

Mediante la utilización de diferentes variantes del ELISA se refiere la detección de 10^3 ufc/ml con el uso de anticuerpos monoclonales y entre 10^5 y 2×10^5 ufc/ml cuando se emplean distintos antisueros (Comstock y Lentini, 2005). Las variaciones observadas en el límite de detección informado por varios autores dependen de la calidad del anticuerpo y los procedimientos empleados.

Actualmente, existen diversos métodos de detección de enfermedades en caña de azúcar, los cuales son de interés, puesto que son cada vez más efectivos y precisos en sus resultados porque pueden determinar varias enfermedades en un sólo diagnóstico (Jaufeerally-Fakim et al., 2000).

Muchos trabajos se han hecho comparando diferentes técnicas como: aislamientos, serología, DBIA, TBIA y PCR en la detección del agente causal de la escaldadura foliar en caña de azúcar (Comstock e Irely, 1992; Davis et al., 1997; Wang et al., 1999; Iglesia et al., 2003).

Entre las estrategias que se tienen para mejorar la sanidad del cultivo de la caña de azúcar se encuentran: evitar el ingreso de nuevas enfermedades al país, tener disponibles métodos de control, variedades resistentes y un control estricto en la utilización de la semilla; labores para las que se requiere el diagnóstico preciso de los agentes causales (Guzmán et al., 1996).

Una de las dificultades con las técnicas de diagnóstico lo constituye la especificidad y los niveles de sensibilidad en la detección de los patógenos, por cuanto en algunos casos se encuentran infectando los tejidos en unos niveles muy bajos que no son detectados por dichas técnicas. En este concepto CENICAÑA ha evaluado y desarrollado diferentes métodos que permiten el diagnóstico de patógenos con técnicas específicas y sensibles; además que sean precisas, rápidas, fáciles de ejecutar en el laboratorio, de muestreo en campo fácil y económico para los centrales y cañicultores.

Los métodos del DBIA (Harrison et al., 1990) y el TBIA (Comstock, 1992, Shenck et al., 1997), son pruebas inmunoenzimáticas en donde se emplean antisueros específicos cuya reacción es posteriormente visualizada. Al principio en el uso de la técnica los investigadores se encontraron con frecuencia falsos positivos debido a la oxidación ocurrida en los jugos, lo cual afectaba la reacción final. Por tal razón las sucesivas modificaciones en la metodología han hecho más precisas estas técnicas.

Teniendo en cuenta la dificultad en el diagnóstico por medio de síntomas de estas enfermedades sistémicas y la necesidad de establecer medidas de control basado en la utilización de variedades resistentes y el uso de semilla libre de patógenos, es

importante actualizar y aumentar la precisión del diagnóstico en lotes destinados a la producción de semillas y en las estaciones cuarentenarias; desarrollando métodos confiables y sencillos que permitan evaluar simultáneamente varias enfermedades.

Aunque el objetivo en el diagnóstico es detectar al patógeno existen otras formas de control del agente causal de la escaldadura que valdría considerarse. Bacterias del género *Gluconacetobacter* han sido reportadas como productoras de bacteriocinas y existen antecedentes de su relación antagónica con el hongo *Colletotrichum falcatum*, agente causal de la pudrición roja de la caña de azúcar. La especie *Gluconacetobacter diazotrophicus* es un microorganismo endófito natural de la caña de azúcar que desempeña un papel beneficioso en el metabolismo nitrogenado del vegetal, por lo que resulta de interés el estudio de su posible actividad antagónica hacia la bacteria *Xanthomonas albilineans*, agente causal de la escaldadura foliar (Blanco, 2005).

Existen trabajos en la detección y caracterización de componentes proteicos con posible acción bactericida contra *Xanthomonas albilineans* en los exudados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* cultivado *in vitro*. Los resultados mostraron la presencia en los exudados de *G. diazotrophicus* de una proteína con actividad lítica sobre las células del patógeno limitando su transmisión a los nuevos brotes asexuales, lo cual permitirá desarrollar posteriores investigaciones encaminadas a la utilización del compuesto aislado o microorganismo antagonista del patógeno como control biológico de la enfermedad, y por su carácter de endófito natural, en las estrategias de obtención de variedades resistentes. Se resalta el papel decisivo de los organismos endofíticos en la respuesta defensiva de la planta, aspecto de aplicación práctica para el manejo y control de la enfermedad escaldadura foliar en la caña de azúcar (Cortegaza y Arenciba, 2009).

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron las hojas TVD (primera hoja con cuello visible) en campo según el procedimiento de toma de muestras para diagnóstico de enfermedades: en semilleros,

se tomó una muestra por cada tres hectáreas y en campos comerciales una muestra por cada cinco hectáreas. Cada muestra está compuesta por 20 hojas colectadas y se realiza en cañas entre 7— 9 meses de edad.

Para efectos de aplicación de las metodologías se tomaron muestras de hojas de plantas afectadas por la escaldadura, además de material procedente de plantas aparentemente sanas (asintomáticas).

Con el propósito de determinar el porcentaje de incidencia las muestras conformadas por paquetes de hojas se tomaron al azar en un tablón para semilleros y se transportaron al laboratorio en bolsas plásticas completamente cerradas para conservar la humedad.

6.2.1. Dot Blot Immunoassay (DBIA): Manchado de membrana de nitrocelulosa

Para la extracción del patógeno, las hojas con nervaduras fueron cortadas en trozos pequeños y se pesaron 100mg de hojas provenientes de plantas afectadas y testigos aparentemente sanos. El material fue macerado y suspendido en 1ml de agua destilada estéril a temperatura ambiente, a partir de esta suspensión se determinó también la concentración bacteriana por medio de la prueba de aglutinación.

Posteriormente se tomaron 30 μ l de la suspensión bacteriana y se colocaron directamente sobre una membrana de nitrocelulosa Bio-Rad® de 0,45 μ m, previamente humedecida en TBS (Tris 0,02M con 0,15M de NaCl) pH 7,5.

6.2.2. Tissue Blot Immunoassay (TBIA): Impresión de tejidos en membrana de nitrocelulosa

El procedimiento es el siguiente (Figura 16):

1. Las hojas tomadas al azar se desprenden desde su base, se conforman los paquetes de 20 hojas y luego se cortan los primeros 30 cms de su parte apical, se amarran y etiquetan, inmediatamente son conservadas en una cava de anime con geles de enfriamiento.
2. Se colocan todos los instrumentos necesarios para el procedimiento de impresión de membranas: almohadillas, bisturí, solución de yodo, alcohol (70%) y un nudo de bambú para el corte. En el laboratorio se cortan con un bisturí las áreas de la lámina foliar de la base de cada hoja y se limpian con un trapo húmedo.
3. Se conservan siempre los paquetes de cada muestra compuesta por 20 hojas para que no pierdan su identificación. Se corta sólo 0,5 cm de la base de cada hoja para inmediatamente hacer la impresión en la membrana de nitrocelulosa. Las membranas son cortadas previamente, su tamaño será de acuerdo al número de muestras a evaluar.



Figura 16. Procedimiento para la técnica Tissue Blot Immunoassay TBIA.

- Después de cada impresión se desinfecta el bisturí de corte. Las muestras pueden ser conservadas en nevera hasta por 15 días para cualquier repetición de la prueba.

6.2.3. Procedimiento para las membranas de nitrocelulosa

En recipientes de vidrio se realizó el bloque de las membranas durante una hora a temperatura ambiente en un agitador horizontal, con leche descremada al 1% y albumina de suero de bovino libre de globulinas al 0,5% en TBS (Figura 17).

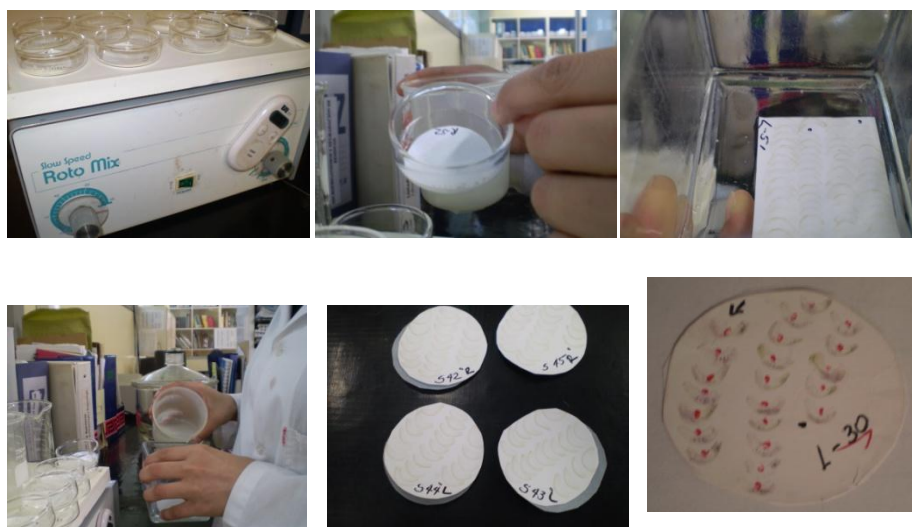


Figura 17. Procedimiento para las membranas de nitrocelulosa

Después de dos lavados rápidos con TBS se agregó el antisero 1:1000 para escaldadura foliar de CENICAÑA, utilizando TBS y leche descremada al 1%, se mantuvo en agitación constante por 3 hr; posteriormente se hicieron tres lavados con TBS de 10 min cada uno.

Se añadió luego el conjugado anti-rabbit con fosfatasa alcalina, se mantuvo en agitación constante por 3 hr; posteriormente se hicieron tres lavados con TBS de 10 min cada uno.

Para visualizar la reacción, se adicionó el sustrato para la fosfatasa alcalina compuesto por una mezcla de bromo cloro-indolilfosfato y nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) en tampón de sustrato pH 9, 5 (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, 5mM MgCl₂); se dejó reaccionar durante 10 min con agitación. Se hizo un lavado rápido de las membranas con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La reacción de DBIA se evaluó a simple vista y la de TBIA mediante un estereoscopio con aumento de 3X.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró que las muestras pueden ser guardadas en refrigeración hasta 4 semanas, conservándose en buen estado. Las evaluaciones por DBIA demostraron que se pueden utilizar hojas de plantas muy jóvenes, lo cual es muy útil cuando se evalúan plantas o vitro-plantas bajo invernaderos. Caso contrario con la TBIA que si las plantas no son muy maduras no se visualizan los vasos xilemáticos de las nervaduras.

Lo recomendable es hacer las impresiones del tejido sobre las membranas lo más rápido posible para evitar el deterioro de la muestra.

En la prueba DBIA, una reacción positiva se observó a simple vista, caracterizado por la presencia de manchas circulares de color azul-violeta; en el caso de los testigos sanos y muestras negativas, no se observó ninguna coloración. Sólo una muestra de plantas sanas resultó positiva.

En la prueba TBIA, en las muestras positivas se observaron manchas azul-violeta sobre la zona de los vasos conductores del xilema de las plantas enfermas muestreadas. En algunos casos la reacción se pudo observar a simple vista o con la

ayuda de una lupa; no se encontró ninguna coloración cuando las plantas estaban sanas.

Se encontró que el método DBIA es capaz de detectar como positiva la presencia de una sola hoja infectada proveniente de una planta enferma entre 19 sanas.

Los resultados mostrados en el Cuadro 12, permiten comparar cuatro pruebas serológicas diferentes, un 98% de detección de plantas enfermas con escaldadura por medio de DBIA y aglutinación en comparación con un 99% por TBIA y el 100% de la ELISA indirecta.

Cuadro 12. Comparación de los porcentajes de detección de los métodos de DBIA y TBIA con relación a aglutinación y ELISA indirecta.

Estado	Nº muestras	DBIA	TBIA	AGLUTINACIÓN	ELISA
Enfermas	80	97,75%	98,75%	98%	100%
Sanas	20	5%	0	0	0

En plantas sanas sólo se detectó por DBIA y cuando la muestra resulta negativa para DBIA no se le realiza ningún otro análisis. El Cuadro 13 resume la sensibilidad de algunas pruebas de diagnóstico utilizadas. Algunas concentraciones bacterianas se acercan a las reportadas por otros investigadores (Guzmán et al., 1999; Davis et al., 1995; Wang et al., 1999); sin embargo las técnicas de DBIA y TBIA tienen la ventaja que pueden aumentar su sensibilidad de detección de la prueba, concentrando la muestra por centrifugación y disminuyendo los volúmenes de re-suspendido.

El recuento de bacterias por aglutinación para el diagnóstico de escaldadura foliar sigue siendo más sensible que el DBIA y TBIA.

Cuadro 13. Sensibilidad para algunas pruebas de diagnóstico.

	Reacción positiva
Aglutinación	5×10^7 cel ml ⁻¹
ELISA indirecta	1×10^6 cel ml ⁻¹
DBIA	5×10^4 cel ml ⁻¹
TBIA	10×10^3 cel ml ⁻¹
PCR	$0,1 \times 10^1$ cel ml ⁻¹

6.4. CONCLUSIONES

Diferentes pruebas inmunoserológicas pudieron detectar con eficiencia una de las enfermedades más importante del cultivo de la caña de azúcar. La sensibilidad del DBIA y el TBIA puede ser mejorada concentrando por centrifugación la muestra.

Las mayores ventajas que ofrecen estos dos métodos fueron su alta sensibilidad y especificidad, son sencillos, rápidos y económicos, no requieren de equipos sofisticados.

Adicionalmente, la utilización de hojas en vez de tallos ofrece una gran ventaja porque es un muestreo no destructivo, más fácil de realizar, transportar y conservar.

CAPITULO VII

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS VENEZOLANOS DE

Xanthomonas albilineans

RESUMEN

Con el fin de buscar técnicas más precisas se estandarizó la metodología de PCR simple usando cebadores específicos para la escaldadura de la hoja en caña de azúcar. Se extrajo el ADN de nueve aislamientos venezolanos colectados en tres estados diferentes y se procedió a amplificar con diferentes marcadores moleculares: ALA4/L1, PGBL1/PGBL2, U1/U2, OL1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e y BOX/ERIC. Se observaron bandas de diferentes tamaños en los fragmentos amplificados. El procedimiento evaluado permitió la detección de la bacteria en muestras procesadas a partir de hojas. Los parámetros analíticos estimados estuvieron por encima del 98%, lo que demostraron la calidad y precisión del método propuesto.

CHAPTER VII

MOLECULAR CHARACTERIZATION THE DIVERSITY GENETICS OF BACTERIAL ISOLATES VENEZUELANOS OF

Xanthomonas albilineans

ABSTRACT

In the search for more precise techniques was standardized methodology of simple PCR using primers specific for the leaf scald the cane sugar. They extracted the DNA of nine Venezuelan isolates collected in three different States and proceeded to amplify with different molecular markers: ALA4/L1, PGBL1/PGBL2, U1/U2, OL1/Y2, Xf1 Xf2 X4c/X4e and BOX/ERIC. Bands of varying sizes in the amplified fragments were observed. The evaluated procedure allowed the detection of bacteria in samples processed from leaves. The analytical parameters were above 98%, which showed the quality and accuracy of the proposed method.

7.1. INTRODUCCIÓN

Con el fin de explorar el genoma de *X. albilineans*, un grupo de investigadores ha optado por una cepa, GPE PC73, que fue aislada recientemente en Guadalupe de un tallo enfermo del cultivar de caña de azúcar H63-1418. Su genoma consta de 1 cromosoma y 3 plásmidos (adaptados de PMID 20017926), causa síntomas graves después de su inoculación en variedades susceptibles de caña de azúcar. Es parte de un grupo de cepas *X. albilineans* que se han asociado con brotes de la enfermedad y epidemias que han ocurrido en varias zonas geográficas (Cuba, Guadalupe, Florida, Mauricio, Texas, Taiwán) en las últimas décadas (Champoiseau et al., 2006; Royer et al., 2004).

La secuencia completa del genoma de *X. albilineans* nos permitirá identificar los mecanismos que hacen posible que esta bacteria ataque específicamente los cultivos de caña de azúcar. Por otra parte, una comparación con los genomas de tres especies de *Xanthomonas* y de *X. fastidiosa*, que ya han sido secuenciados, debe permitir una mejor comprensión de los fenómenos evolutivos que conducen a la especialización parasítica de bacterias patogénicas de plantas limitadas al xilema (Pieretti et al., 2009).

Además, los genes implicados en la biosíntesis de albicidina se han clonado y secuenciado, el análisis in silico de estos genes ha llevado a la elaboración de un modelo para la biosíntesis de la albicidina y una predicción parcial de su estructura (Champoiseau et al., 2006). La proteína HtpG es requerida para la biosíntesis de la albicidina en la membrana celular. Aquí mostramos el requisito de una proteína HtpG para la biosíntesis de un poli-péptido antibiótico (Huang et al., 2000 y 2001; Vivien et al., 2005).

Aunque la albicidina es un factor importante en la patogenicidad *X. albilineans*, no es el único. Las cepas de la bacteria que no producen la toxina son, sin embargo, no capaces de colonizar la caña de azúcar; como aquellos que producen albicidina.

Otros tantos genes de patogenicidad, quedan aún por identificar. Desde el punto de vista evolutivo, *X. albilineans* se encuentra entre el grupo de *Xanthomonas campestris* (un grupo de bacterias que infecta a varios cientos de plantas de zonas templadas y tropicales) y *Xylella fastidiosa*, una bacteria que ataca a numerosas plantas como el café, las uvas, los árboles frutales (cítricos, almendras, aceitunas) y los árboles y arbustos decorativos (roble, arce, laurel)(Pieretti et al., 2009).

Los avances en la biología molecular han permitido cambios significativos en los enfoques utilizados para caracterizar e identificar fitopatógenos y a su vez para diseñar estrategias de manejo. Históricamente, una gran variedad de características fenotípicas han sido utilizadas para clasificar las bacterias. Sin embargo, en ocasiones los resultados son poco reproducibles y no siempre reflejan las relaciones genéticas entre los diferentes aislamientos. En contraste, los métodos basados en el análisis del ADN, son más estables, brindan una información más precisa sobre las relaciones genéticas y los perfiles obtenidos son altamente corregidos mediante análisis estadísticos y programas computarizados.

Desde que se generalizó la secuenciación, las bacterias han dejado de clasificarse por criterios bioquímicos, de necesidades nutricionales, de comportamiento patogénico y otros. Actualmente se alinean secuencias de ADN o de ARN y se determina cuán parecidas son de forma rápida y precisa. Para ello se busca una secuencia que esté muy conservada en los genomas, generalmente el ARN ribosómico 16S (que junto con proteínas constituye la subunidad menor 30S de los ribosomas de procariontes), y se compara. Este método de clasificación es bastante bueno, pero aún existe uno mejor, que está siendo propiciado gracias a la existencia de proyectos de secuenciación masiva de genomas bacterianos. En este caso, y gracias a la genómica comparativa, se observa cómo y cuánto son parecidos los genomas de los distintos microorganismos. La bondad del método reside en que ya no se apoya en una sola secuencia, muy conservada, eso sí, pero sólo una al fin y al cabo, sino en todo el genoma (Mansfield, 2009).

Con la combinación de un medio diferencial (Xan-D) y una PCR específica para el gen *estA* (altamente conservada) se desarrolla un método útil y confiable para la detección y aislamiento de células viables de xanthomonas en materiales vegetales que producen xanthomonadinas. Se ha comprobado la amplificación de PCR utilizando el conjunto de primer de un fragmento de ADN específico de 777pb para todas las cepas que producen xanthomonadinas (Yung et al., 2009).

La caracterización genotípica de *X. albilineans* ha sido realizada empleando métodos dependientes e independientes de la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El porcentaje de homología del ADN, como expresión del nivel de hibridación del ADN total celular ha sido considerado el principal criterio para definir una especie bacteriana. Otros métodos empleados incluyen la caracterización de los perfiles plasmídicos, el análisis de los fragmentos de restricción del ADN total o de los plásmidos y su visualización por tinción (restriction enzyme analysis, REA) o por hibridación a una sonda específica (restriction fragment length polymorphism, RFLP). El método más sofisticado derivado de los anteriores, consiste en la digestión del ADN con enzimas de sitios de cortes poco frecuentes y la separación de los grandes fragmentos originados mediante electroforesis de campo magnético invertido (FIGE) o en campo pulsante (PFGE) (Louws et al., 1999).

Por la hibridación del ADN, los aislamientos de *X. albilineans* mostraron un nivel de homología del 97%, ratificándose su ubicación como una especie bien delimitada dentro del género *Xanthomonas* (Vauterin et al., 1995; 2000).

Los resultados obtenidos mediante RFLP varían de acuerdo a las enzimas y sondas empleadas, encontrándose correspondencia con los serovares del patógeno (Alvarez et al., 1996; Graham et al., 1990) o por el contrario la detección de polimorfismo entre los aislamientos de los serovares I y II, con el establecimiento de cuatro grupos

genómicos (Jaufeerally-Fakim et al., 2000). Estudios similares con aislamientos del brote de escaldadura ocurrido en la Florida, delimitaron dos grupos genéticos diferentes, uno de los cuales constituía una nueva variante del patógeno en el área, sugiriendo su introducción (Davis et al., 1997).

Posteriormente un gran número de aislamientos de diferentes zonas geográficas fueron separados en cuatro grupos genómicos, mientras algunos no fueron asignados a ningún grupo dado el patrón deferencial obtenido (Davis et al., 1997).

Análisis posteriores de aislamientos de numerosas zonas geográficas mediante PFGE, permitieron establecer 55 haplotipos, representados en diez grupos genómicos, cinco de los cuales resultaron heterógenos (A, B, C, D, y E) y el resto (F, G, H, I y J) estuvo formado por un solo aislamiento (Davis et al., 1997), demostrándose la utilidad y superioridad de esta técnica para el estudio de las poblaciones de *X. albilineans* con relación a las serológicas utilizadas anteriormente.

Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Permaul et al., 1996), secuencias repetitivas dispersas a través del genoma (rep-PCR) (Lopes et al., 1997,2001) y el polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar (AFLP) (Rott y Chatenet, 1998), han sido métodos rápidos, sensibles y confiables para estudiar la diversidad e identificar aislamientos de *X. albilineans*. La rep-PCR y el RAPD, por tener menos requerimientos en reactivos e infraestructura que el AFLP y la PFGE, se han convertido en importantes herramientas para los laboratorios que inician los análisis genómicos de diferentes fitopatógenos.

Todos los procariontes estudiados hasta hoy, incluyendo *Xanthomonas* fitopatógenas, tienen familias de secuencias repetitivas a través del genoma, las cuales pueden ser utilizadas como sitios específicos para su amplificación mediante PCR (Louws et al., 1999). Tres familias, no relacionadas al nivel de la secuencia del ADN genómico, han

sido estudiadas con más detalle, la secuencia extragénica palindrómica repetitiva de 35 a 40 pb (secuencia REP), la secuencia consenso intergénica repetitiva enterobacteriana de 124 a 127pb (secuencia ERIC) y los elementos BOX de 154 pb.

Estas secuencias parecen estar localizadas en diferentes posiciones intergénicas alrededor del cromosoma, por lo que los iniciadores diseñados producen la amplificación selectiva de diferentes regiones genómicas localizadas entre las secuencias REP, ERIC y BOX, que son nombradas colectivamente como rep-PCR.

Las bandas amplificadas son fraccionadas en geles de agarosa y el patrón obtenido semeja un código de barras, análogo al utilizado para los productos comerciales, en este caso como huellas específicas de cada aislamiento bacteriano.

La comparación de los perfiles electroforéticos obtenidos por la amplificación del ADN con los iniciadores BOX, ERIC y REP se ha convertido en una importante herramienta en el estudio de poblaciones biológicas, debido a su simplicidad y potencialidad para analizar rápidamente un gran número de muestras a partir de una mínima cantidad de ADN (Louws et al., 1994; Díaz et al., 2001; Pérez et al., 2003).

Las secuencias REP, ERIC y los elementos BOX tienen facilidades para formar estructuras estrechas y pueden jugar un papel importante en la organización del genoma bacteriano. Sobre la base del conocimiento de la naturaleza clonal y la dinámica de poblaciones de las bacterias patógenas, Louws et al., (1994) han planteado la hipótesis de que a través de la evolución, cada línea especializada o patovar de un patógeno tiene una única distribución o reordenamiento de las secuencias repetitivas en el genoma, lo que pudiera generar patrones genómicos correlacionados con un patovar específico.

La rep-PCR ha sido extensivamente utilizada para identificar, diferenciar aislamientos y evaluar la diversidad genética de fitopatógenos. Cada iniciador ha

resultado útil para el análisis genómico de diferentes bacterias, incluyendo las fitobacterias Gram-negativas y Gram-positivas, como, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Gonclaves y Rosato, 2002).

El análisis de aislamientos de *X. oryzae* (2 patovares) y *X.campestris* (19 patovares) por rep-PCR permitió estimar la identidad y la relación entre los mismos (Louws et al., 1994), destacándose que cada uno de los iniciadores brindó un patrón de bandas común a los aislamientos dentro del mismo patovar.

El único trabajo relacionado con *X. albilineans* ha sido realizado con 27 aislamientos brasileños mediante los iniciadores ERIC y BOX. Los resultados obtenidos permitieron separar esta especie de otras bacterias y revelaron la existencia de variaciones genómicas intraespecíficas, con el iniciador BOX se obtuvo un único grupo, mientras con ERIC fue posible determinar la heterogeneidad de los aislamientos que se separaron en tres grupos diferentes, sugiriendo la necesidad de tener en consideración la variabilidad detectada en los programas de mejoramiento de caña de azúcar para la obtención de genotipos resistentes. Es de señalar, sin embargo, que no se han encontrado diferencias en la patogenicidad de los aislamientos estudiados (Lopes et al., 1998b).

En un estudio reciente, se compararon el AFLP, rep-PCR y los niveles de homología por hibridación del ADN, utilizando al género *Xanthomonas* como modelo. Se observó una alta correlación, demostrando que estas técnicas genómicas, revelan verdaderamente las relaciones genotípicas y filogenéticas de los organismos. Sobre la base de estos resultados, Rademaker et al., (2000) han propuesto el uso de rep-PCR y AFLP para la determinación rápida y segura de la diversidad taxonómica y las relaciones filogenéticas de las poblaciones bacterianas.

El uso de la PCR como herramienta de diagnóstico de bacterias fitopatógenas se ha incrementado dada su rapidez, sensibilidad y especificidad (Louws et al., 1999). En el género *Xanthomonas* ha sido utilizada para la detección de *X. axonopodis* pv. *citri* (Hartung et al., 1996), *X. campestris* pv. *phaseoli* (Audy et al., 1996) y *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Para *X. albilineans* su uso es reciente (Honeycutt et al., 1995; Lopes et al., 2001; Pan et al., 1997, 1999; Davis et al., 1997; Wang et al., 1999).

Recientemente, ha sido revelado el polimorfismo en la longitud y las secuencias de las regiones ITS (intergenic transcribed spacer), por lo que se han diseñado iniciadores que han permitido detectar, identificar y diferenciar especies bacterianas (Mansfield, 2009). Además ha sido amplificada la región entre los genes tARN y se han diseñado los iniciadores T3A, T5A, y T5B.

Para el diagnóstico de *X. albilineans* por PCR han sido utilizados diferentes iniciadores. Honeycutt et al., (1995), diseñaron el iniciador Ala4, el cual unido al Ile2 (tARN no específico), permitieron amplificar un segmento de 70pb específico para el diagnóstico de *X. albilineans* en plantas enfermas y con infecciones latentes.

Posteriormente Lopes y Damann (1997 y 2001), sugirieron el uso de los iniciadores T3A y T5B para el diagnóstico mediante PCR con inmunocaptura. Pan et al., (1997), propusieron la utilización de los iniciadores Ala4 (Honeycutt et al., 1995) y L1 (Jensen et al., 1993), con lo que amplificaron un fragmento de 360pb de la región ITS del ADN ribosomal 16S/23S en aislamientos representativos de los diferentes serovares. Sin embargo, fueron amplificados también tres fragmentos de 280, 420 y 460pb a partir de bacterias saprófitas no identificadas, comúnmente encontradas en el cultivo de la caña. Lo anterior puede deberse al carácter universal del iniciador L1 y a la limitada especificidad del Ala4. Recientemente estos mismos autores, a partir del clonaje y secuenciación del fragmento amplificado de 360 pb, diseñaron los iniciadores PGBL1 y PGBL2, altamente específicos para el diagnóstico de la bacteria (Pan et al., 1999).

Un sistema de PCR múltiple para la detección simultánea de *X. albilineans* y *Leifsonia xyli subsp. xyli* fue presentado; el procedimiento posee una alta especificidad y sensibilidad para ambos patógenos, reduciéndose así el tiempo y el costo del diagnóstico de ambas enfermedades bacterianas, las más importantes del cultivo en la actualidad (Davis et al., 1997).

Por otro lado, Wang et al., (1999) propusieron la BIO-PCR (amplificación biológica inicial por cultivo in vitro seguida de PCR), como una alternativa tan sensible como el aislamiento en medio selectivo, lo cual elimina la necesidad de confirmar la identidad de la bacteria posteriormente.

A pesar de la factibilidad de los procedimientos de diagnóstico propuestos, su aplicación en los servicios de rutina para la detección de la escaldadura foliar, se dificulta debido a la toma, conservación y transporte de las muestras a analizar. Los métodos utilizados hasta el momento consisten en la extracción del jugo por presión positiva, adicionando como preservativo el formaldehído 1.4% para prevenir la fermentación y el crecimiento de microorganismos contaminantes, la centrifugación de pequeñas secciones de tallo (Comstock e Irey, 1992), y en la mayoría de los casos el envío directamente al laboratorio de las muestras de tallos de las diferentes variedades a evaluar.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Aislamientos bacterianos evaluados y extracción de ADN.

Los aislamientos de *X. albilineans* fueron cultivados en medio Wilbrink. La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el método descrito por Ausubel et al., (1992) y se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280 nm; también se usaron los primers universales U1 y U2 para ponderar la cantidad y calidad del ADN. Se usaron

dos controles: agua destilada estéril (C1: negativo) y un aislamiento puro de *Xanthomona capsii* (C2: positivo). En el Cuadro 14 se determina el ordenamiento de los nueve aislamientos evaluados en los geles de PCR.

Cuadro 14. Ordenamiento de los aislamientos en los geles de PCR.

N° de colecta	Variedad	Localidad
Control (C1)	Agua destilada estéril	En ampolla, uso farmacéutico.
Control (C2)	<i>Xanthomona capsii</i>	Laboratorios D & D, Turmero, Edo. Aragua.
1	CC85-92	Sector Santa Clara, Edo. Aragua.
2	CC85-92	Sector Santa Teresa, Edo. Aragua.
3	CC85-92	Sector La Mora, Edo. Aragua
4	RB74-474	Sector Tocorón, Edo. Aragua.
5	Variedad desconocida	Donado Laboratorio de Bacteriología UCLA, Edo. Lara. Codificación 53Y
6	Variedad desconocida	Donado Laboratorio de Bacteriología UCLA, Edo. Lara. Codificación 53X
7	RB-74-474	Carora, Edo. Lara
8	V98-158	INIA-Yaritagua, San Felipe, Edo. Yaracuy
9	V71-51	INIA-Yaritagua, San Felipe, Edo. Yaracuy

7.2.2. Protocolo para la amplificación y visualización de marcadores moleculares ALA4/L1, PGBL1/PGBL2, U1/U2, OL1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e y BOX/ERIC.

Para la amplificación del ADN se emplearon los iniciadores específicos, universales y otros, visualizados en el Cuadro 15 junto a la talla esperada de los fragmentos amplificados para las reacciones. Los primer BOX y ERIC se emplearon en una PCR mixta para la identificación de patrones diferenciales.

Cuadro 15. Primers utilizados en la PCR.

Primer	Secuencia 5' → 3'	Fragmento amplificado	
ALA 4	CCCGACTGGCTCCACCACTG	360 pb	Específicos para <i>X albilineans</i>
L1	CAAGGCATCCACCGT		
PBG1	CTTTGGGTCTGTAGCTCAGG	288 pb	
PBG2	GCCTCAAGGTCATATTCAGC		
U1	CCAGCAGCCGCGGTAATACG	600-13000 kb	Universales
U2	ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC		
OL1	GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC	292 pb	<i>Ralstonia solanacearum</i>
Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT		
Xf1	ACGCAAGACCCATCGTCATTC	450 pb	<i>X.c.pv. phaseoli.var fuscans</i>
Xf2	ATGGCTAAGGAAAACTTTCAGG		
X4c	GGCAACACCCGATCCCTAAACAGG	730 pb	<i>X.c.pv.phaseoli</i>
X4e	CGCCGGAAGCACGATCCTCGAAG		
BOXA1R	CTACGGCAAGCGACGCTGACG		Mixta
ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC		
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGACGG		

Los primer fueron amplificados en un coctel de reacción de volumen final de 25 µL constituido por las concentraciones siguientes: Buffer 1X(50Mm KCl, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 0.1% Tritón X100), 2,5 mM de MgCl₂, dNTPs 20 µM, iniciadores 0,5 µM, 1 U Tag polimerasa SIGMA y 5 ng/µL de ADN genómico. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC 100. Las condiciones de amplificación se especifican en el Cuadro 16.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis a 80 V en solución 0.5X TBE (45 mM Tris, 45mM de ácido bórico y 1mM EDTA) en gel de agarosa 0,8% conteniendo bromuro de etidio (0.5 µg/ml de gel). Se utilizó un marcador de 1Kb y de 50pb (Promega). Las imágenes se capturaron del

transiluminador luz ultravioleta Fisher Biotech (Fisher Scientific) y fueron fotografiadas con cámara digital HP Photosmart R717, 6.2MP.

Cuadro 16. Programas de amplificación

Fases	Condiciones de amplificación
Desnaturalización inicial (1 ciclo)	95°C por 5 min
35 ciclos:	
Desnaturalización	95°C por 1 min
Hibridación	60°C por 1 min
Elongación	72°C por 10 min
Extensión final (1 ciclo)	72°C por 10 min

7.2.3. Análisis y procesamiento de los datos

Se construyeron matrices básicas de datos realizando codificaciones binarias de presencia (1)/ ausencia (0) a partir de los resultados del conteo directo de los fragmentos amplificados. Para medir las relaciones entre los aislamientos bacterianos evaluados según los marcadores utilizados en las PCR, se establecieron análisis de agrupamiento UPGMA con el índice de similaridad de Jaccard para la construcción de dendogramas con el programa estadístico PASBETA versión 2.0 para facilitar la descripción.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Cantidad, calidad y pureza del ADN extraído

La evaluación de la cantidad, calidad y pureza del ADN extraído fue mediante la amplificación de la región ribosomal 16S. Se comprobó (Figura 18) una excelente cantidad y calidad del ADN extraído en todos los aislamientos bacterianos evaluados, incluso amplificó el control positivo C2 (*Xanthomona capsii*), para esto se utilizó el par de primers universales U1 y U2; estos marcadores moleculares fueron capaces de

amplificar los ADN bacterianos en esta región ribosomal puesto que son genes comunes y conservados en todos los aislamientos evaluados.

Esto nos permite corroborar que esta técnica es un método efectivo, reproducible y confiable para determinar calidad de ADN, tal como lo han reportado otros investigadores (Lu et al., 2000; Carballo, 2008).

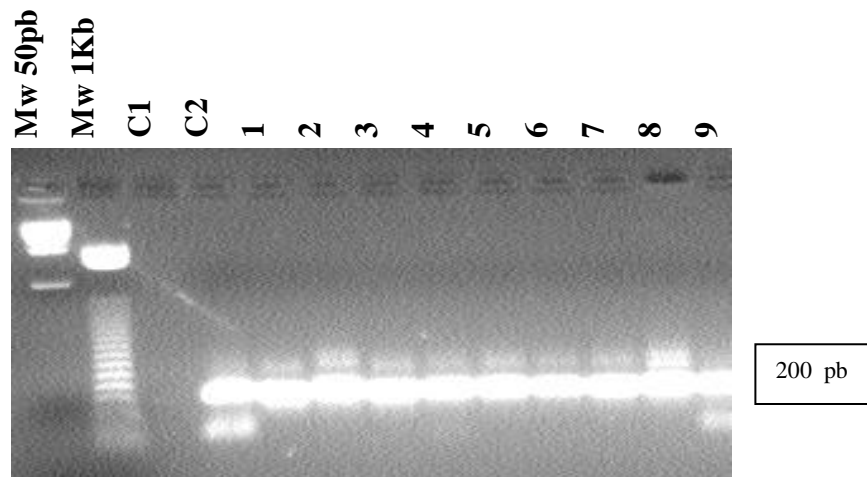


Figura 18. Amplificación de la región ARN 16S.

Con esta técnica se tienen resultados más acertados en relación a cantidad y calidad de ADN, por lo que todas las muestras de ADN evaluadas que amplificaban para el ADNr 16S eran seleccionadas para las amplificaciones con los otros primers.

7.3.2. Marcadores específicos para *Xanthomonas albilineans*

Considerando la identificación molecular de aislamientos bacterianos de *Xanthomonas albilineans* mediante los SCAR ALA4/L1 y PGBL1/PGBL2 que son específicos para esta bacteria (Figura 19 y 20), se evidenciaron problemas para amplificar los aislamientos SC y CA; los otros aislamientos: ST, LM, TO, 53Y, 53X, VY1 y VY2 amplificaron para el SCAR ALA4/L1 fragmentos de diferentes tamaños, entre 340 y 360 pb (Figura 19).

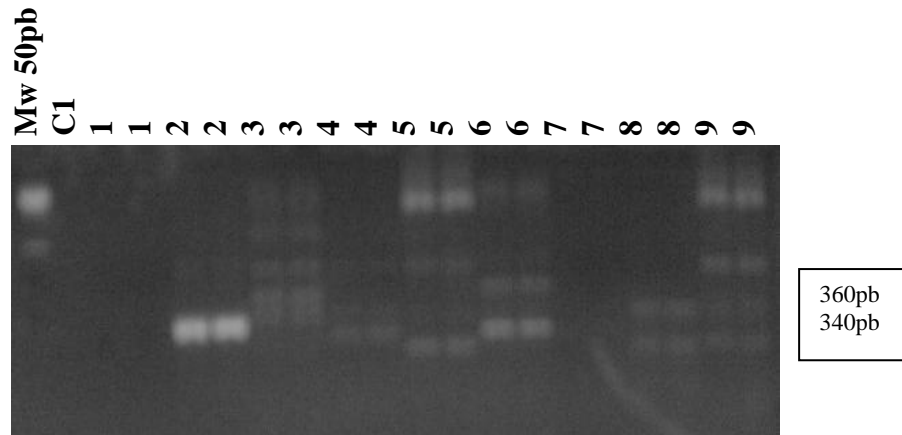


Figura 19. SCAR ALA4/L1 específico para *X. albilineans*.

Posteriores corridas con los aislamientos SC y CA demostraron amplificaciones para este marcador molecular, con evidencia de que había poco ADN extraído en ambas muestras y que al preparar las diluciones para la PCR los fragmentos amplificados se observaban ligeramente.

Un fragmento de ADN, único en tamaño, de aproximadamente de 290 pb fue amplificado para todos los aislamientos evaluados con el SCAR PGBL1/PGBL2 (Figura 20). Nuestros resultados sugieren que pocas variaciones pueden estar ocurriendo dentro de la región ITS ribosomal de los diferentes aislamientos evaluados.

En evaluaciones previas de la concentración mínima de ADN capaz de amplificar estos primers (ALA4/L1 y PGBL1/PGBL2) se encontró una sensibilidad entre 10fg y 1pg de ADN bacteriano, lo cual es un equivalente de 24 y 4 bacterias viables en 100µl de agua.

Pudo comprobarse resultados similares por otros investigadores (Pan et al., 1997, 1999, 2001) donde se establece que el primer ALA4/L1 puede reconocer algunos

microorganismos saprofíticos de la caña de azúcar que estén presentes, lo que no ocurre con el primer PGBL1/PGBL2.

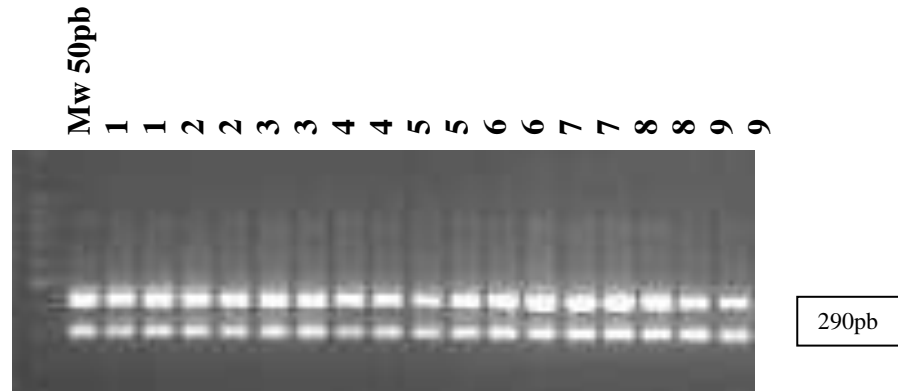


Figura 20. SCAR PGBL1/PGBL2 específico para *X. albilineans*.

Ambos cebadores amplificaron para todos los aislamientos evaluados de *X. albilineans*, cada uno a tamaños de fragmentos diferentes, estos resultados altamente reproducibles, sugieren que pueden ser utilizados como herramientas útiles en la identificación y en el estudio de la variación genética dentro de esta especie.

La disponibilidad de estos cebadores ayudará en las medidas de detección y control de la enfermedad de la escaldadura foliar en caña de azúcar.

7.3.3. Estudios de diversidad

La amplificación de los SCAR: OL1/Y2, Xf1/Xf2 y X4c/X4e en aislamientos de *Xanthomonas albilineans* fueron utilizados para estudios de diversidad. Dado que los estudios de secuenciación del genoma completo de esta bacteria limitada al xilema han evidenciado su estrecha relación con otras xanthomonas y otros géneros, se evaluaron los iniciadores específicos para *X phaseoli*: Xf1/Xf2 y X4c/X4e; así como también el OL1/Y2 específico para *Ralstonia solanacearum*.

El patrón electroforético generado por la amplificación del iniciador OL1/Y2 se observa en la Figura 21, donde resultó una doble banda de tamaño aproximadamente de 290 pb, para todos los aislamientos evaluados.

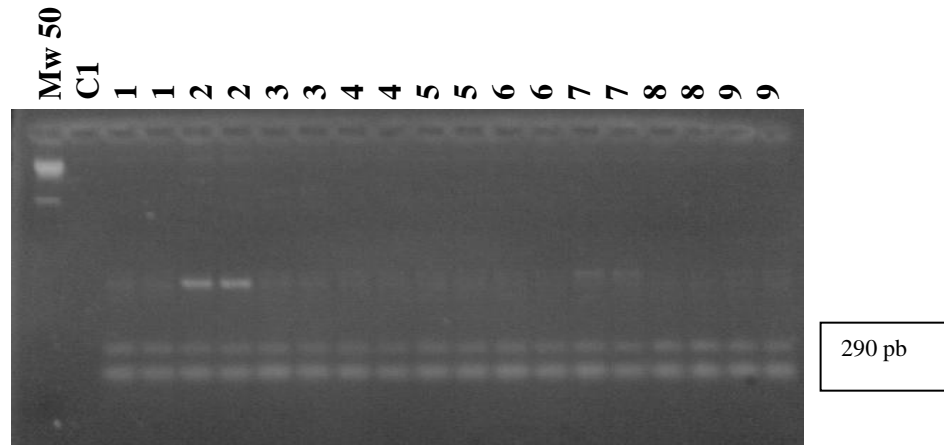


Figura 21. SCAR OL1/Y2 específico para *Ralstonia solanacearum*.

Las relaciones genéticas entre los nueve aislamientos para el conjunto de los tres diferentes iniciadores no específicos para *X. albilineans* se pueden visualizar (Figura 21, 22 y 23) en los patrones electroforéticos variados en números de bandas y tamaño de los fragmentos amplificados.

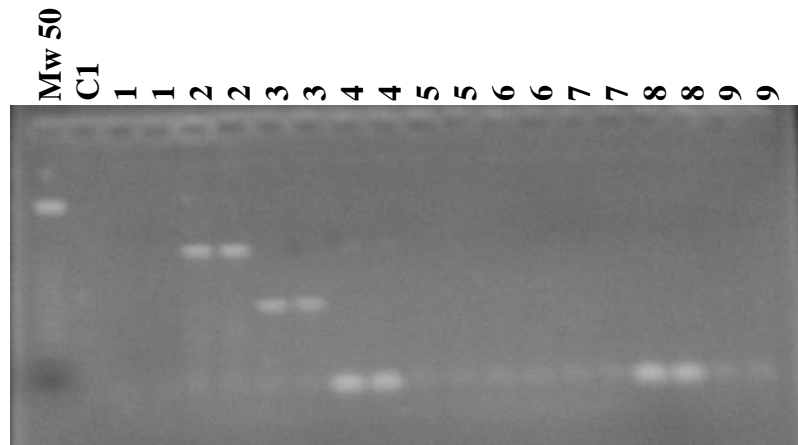


Figura 22. SCAR Xf1/Xf2 específico para *X c. pv. phaseoli var fuscans*.

Las comparaciones en los patrones de amplificación para estos iniciadores revelan la presencia de variantes genotípicas entre los aislamientos evaluados. Se determina la presencia de aislamientos diferentes.

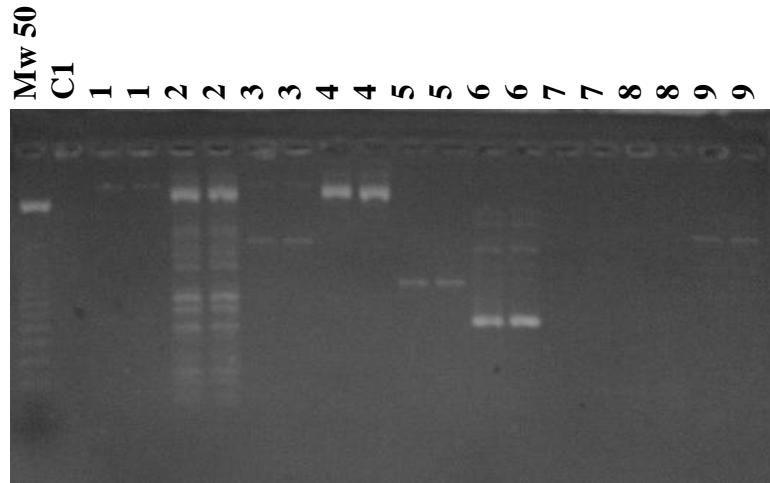


Figura 23. SCAR X4c/X4e específico para *X. c. pv. phaseoli*.

Para estudiar mejor la diversidad genética de esta bacteria se genotipificaron los aislamientos a través de la amplificación de secuencias repetidas en mosaico del elemento BOX y ERIC en PCR anidada (Figura 24).

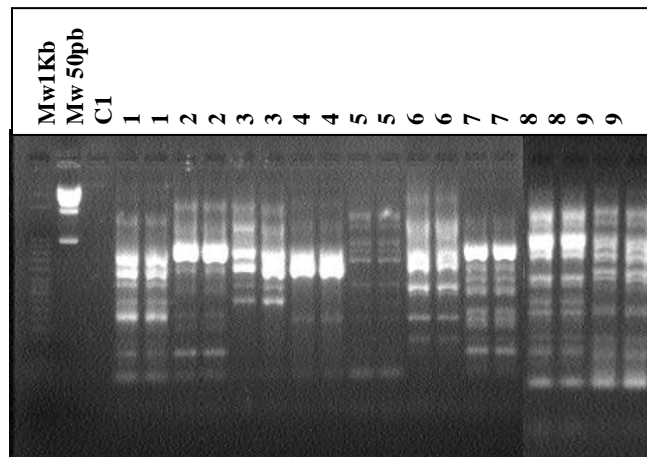


Figura 24. PCR anidada de BOX/ERIC para aislamientos de *X. albilineans*.

El patrón electroforético formado por la amplificación de las secuencias conservadas y repetitivas en el ADN genómico de *X. albilineans*, resultó en múltiples bandas, con variaciones en el tamaño de aproximadamente 200 a 1200 pb, con la mezcla de los iniciadores BOX/ERIC; con esta mezcla fue posible la amplificación de un mayor número de fragmentos por aislamiento evaluado.

La comparación de patrones de amplificación, reveló la presencia de tres grandes grupos con un alto grado de resolución entre los aislamientos y presentaban un índice de similitud mayor al 75% (Figura 25).

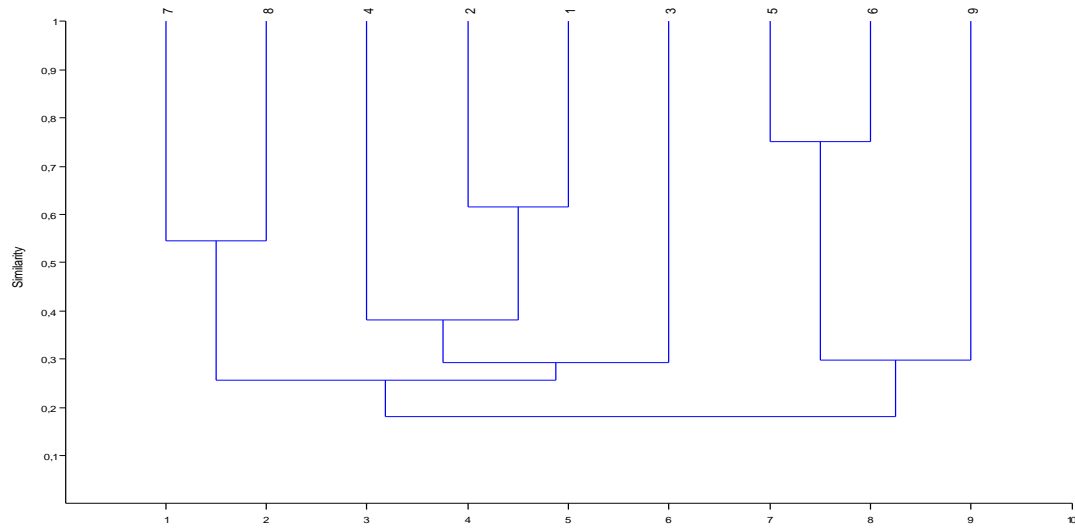


Figura 25. Dendrograma de SCAR no específicos OLI1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e y BOX-ERIC para *X. albilineans*.

El perfil obtenido mediante la PCR de los primers no específicos para *X. albilineans* conforman un primer grupo con los aislamientos: V71-51, 53Y y 53X, un segundo grupo por los aislamientos: LM, SC, ST y TO, por último el tercer grupo por los aislamientos: V 98-158 y CA.

Se pudo observar una gran variabilidad genética entre los aislamientos cuando se relacionan en función de los iniciadores no específicos para *X. albilineans* (Figura 26), se define un grupo totalmente diferente de todos los demás conformado por el aislamiento CA, un grupo menor constituido por V98-158 y LM, finalmente un grupo grande y diverso por los aislamientos 53X, 53Y, SC, ST, TO y V71-51. Las mayores variaciones y más contrastantes fueron observadas, manteniendo el criterio de iniciadores no específicos para escaldadura foliar.

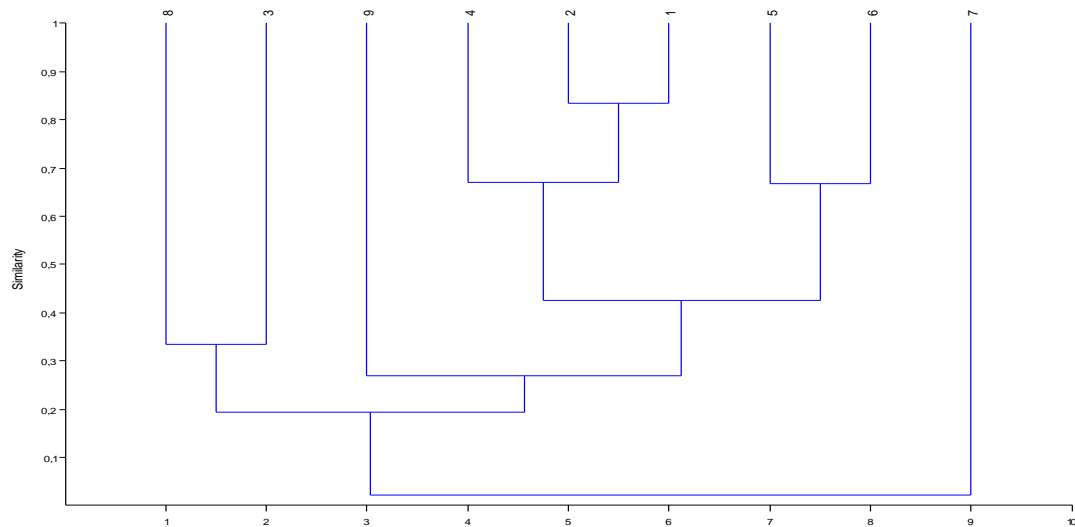


Figura 26. Dendrograma obtenido con los resultados de los SCARs: OLI1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e.

Cuando confrontamos los resultados de los dendogramas con la mezcla de iniciadores BOX/ERIC (Figura 27) y estos a su vez en función al iniciador específico ALA4/L1 (Figura 28) se encontraron las mismas respuestas. Se establecen tres grupos, uno por los aislamientos aragüesños: SC, ST y LM, otro grupo por un aislamiento yaracuyano V98-158, el larense CA y el aragüesño TO, por último el grupo del aislamiento yaracuyano V71-51 y los 53Y y 53X.

Al tipificar únicamente por el iniciador específico ALA4/L1 el dendograma (Figura 29) visualiza sólo dos grupos uno menor constituido por los aislamientos: V98-158, ST y LM y otro grupo mayor por los aislamientos restantes: V71-51, CA, 53Y, 53X, SC y TO.

Al considerar todos los iniciadores (Figura 30) se conforman tres grupos, grupo I: V71-51, 53Y y 53X, grupo II: SC, ST y TO, finalmente grupo III: LM, V98-158 y CA. Existe la tendencia de mantenerse afines los aislamientos V71-51, 53Y y 53X.

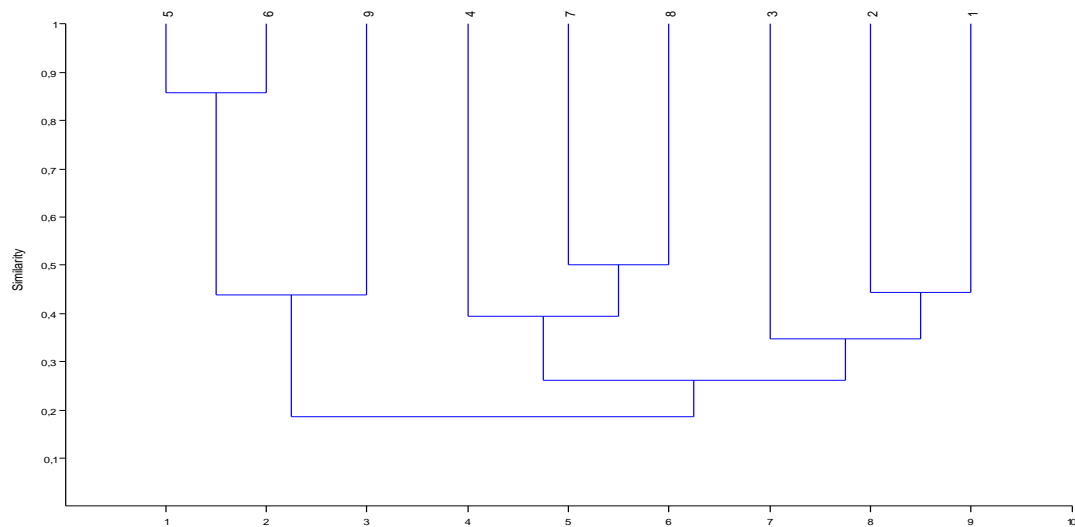


Figura 27. Dendograma BOX/ERIC y SCAR ALA4/L1

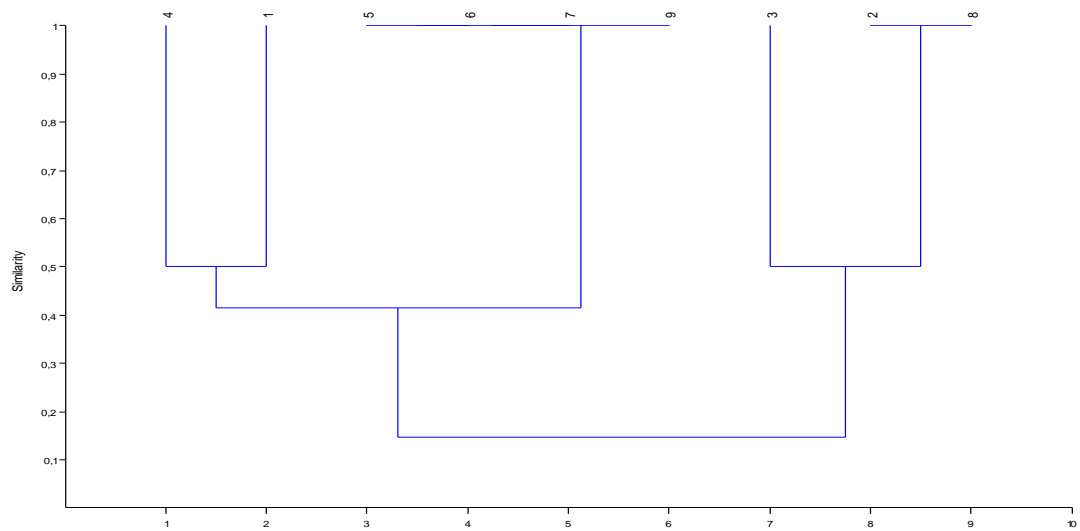


Figura 28. Dendrograma sólo SCAR ALA4/L1.

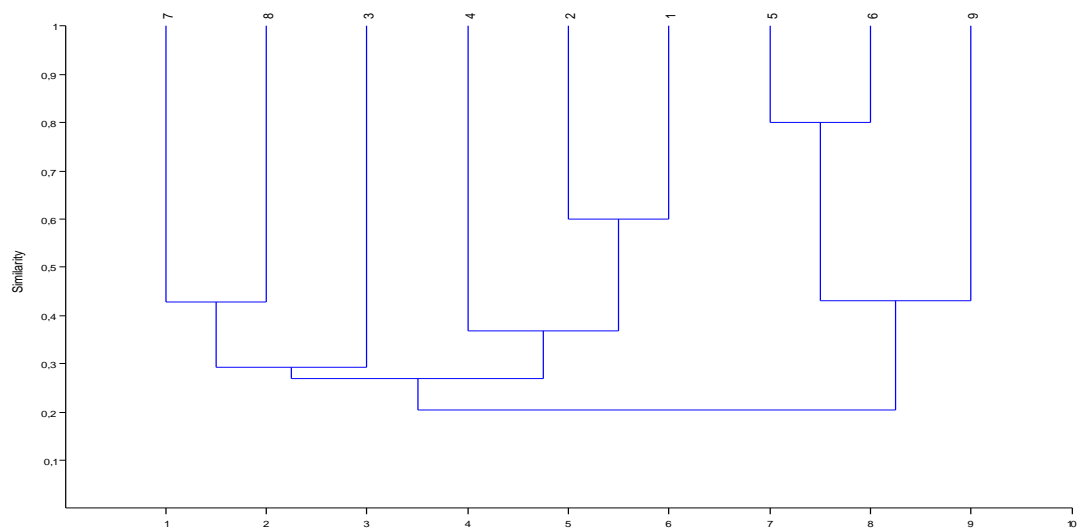


Figura 29. Dendrograma SCARs: OLI1/Y2, Xf1/Xf2, X4c/X4e, BOX/ERIC, ALA4/L1

En los resultados obtenidos no se encontró amplificación con los controles negativos utilizados.

7.4. CONCLUSIONES

La PCR es reconocida como el método de diagnóstico más potente desarrollado hasta el momento, las posibilidades de detección son mucho más amplias, su uso se incrementa por su rapidez, sensibilidad y especificidad. Algunas desventajas podrían ser consideradas como: los exigentes requerimientos que tienen en cuanto a infraestructura y manipulación para evitar la ocurrencia de contaminaciones exógenas y falsos positivos. La variante de PCR múltiple permitiría detectar más de un agente patogénico en una sola corrida con la amplificación simultánea de más de una secuencia diana en una reacción.

7.5. CONCLUSIONES GENERALES

Los aislamientos venezolanos procedentes de las tres regiones evaluadas difieren serológicamente y molecularmente, determinándose este relacionado con nuevas variantes de la bacteria no detectadas con anterioridad en el país.

La presencia de variación intraespecífica dentro de los aislamientos de *Xanthomonas albilineans*, se establecen por primera vez en el país.

Se identificaron tres grupos genómicos entre los aislamientos venezolanos de *Xanthomonas albilineans* (GG-1-GG-3) que están formados por los haplotipos combinados BOX y ERIC; los cuales agruparon el 75% de los aislamientos obtenidos y presentaron una homología superior al 91%.

En las variedades V71-51, CC 85-92 y RB74-454 se encontró la presencia de más de un grupo genómico de *Xanthomonas albilineans*.

El procedimiento de PCR anidada (n-PCR) validado resultó igualmente eficaz que el aislamiento in vitro del patógeno y permitió la detección de las variantes serológicas y moleculares de *X. albilineans* presentes en el país, con parámetros de desempeño superiores al 98%.

Se detectó la presencia de la escaldadura en variedades del Banco de Germoplasma y áreas de producción del país, así como en líneas de variedades sometidas a saneamiento por tratamiento hidrotérmico y cultivo de meristemo.

7.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, A., SCHENCK, S., BENEDICT, A. 1996. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains with monoclonal antibody reaction patterns and DNA fingerprints. *Plant Pathology* 45: 358-366.

APONTE, A., ORDOSGOITTI, A. 1991. Resultados de las investigaciones en enfermedades de la caña de azúcar en Venezuela en el período 1986-1989. *Caña de azúcar*, Vol. 09(1):53-65.

AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SEIDMAN, J., SMITH, J., STRUHL, K. 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. I, Greene Publishing Associates and Wiley- Interscience, New York.

AUTREY, L., SAUMTALLY, S., DOOKUN, S., SULLIVAN, S., DHAYAN, S. 1995a. Aerial transmission of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, *Proc. Int. Soc- Sugar Cane Technol.*, 21:508-526.

AUTREY, L., SAUMTALLY, S., DOOKUN, A., MÉDAN, H. 1995b. Studies on variation in the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. Proc.XXI Congress of ISSCT, Thailand, 21:485-497.

AUTREY, L., SAUMTALLY, S., DOOKUN, A. 1997. Studies on variation in the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*. Proceedings XXI Congress of ISSCT, Bangkok (Thailand). 485-497.

BASNAYAKE, W., BIRCH, R. 1995. A gene from *Alcaligenes denitrificans* that confers albicidin resistance by reversible antibiotic binding, *Microbiology*, 141: 551-560.

BÉRES, M., RAMÍREZ, E., CARMONA, A., NASS, H. 2005. Detección molecular de *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli subsp. xyli* en caña de azúcar. Póster presentado en el VI Congreso Azucarero Nacional. San Cristóbal, Táchira.

BIRCH, R., G. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Molecular Plant Pathology* 2(1):1-11.

BIRCH, R., PATIL, S. 1987a. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogens, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30:199-206.

BIRCH, R., PATIL, S. 1987b. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30:207-214.

BIRCH, R., PEMBERTON, J., BASNAYAKE, W. 1990. Stable albicidina resistance in *Escherichia coli* involves an altered outer membrane nucleoside uptake system, *J. Gen. Microbiol.*, 136:51-58.

BLANCO LÓPEZ YOLANDA. 2005. Posible control biológico de la escaldadura foliar en caña de azúcar. Tesis. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Biología.

BRADBURY, J.F.1986. Guide to plant pathogenic bacteria. C.A.B. International Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey. England. 199-200.

BUSINES TIPS ON CUBA. 2002. Industria azucarera cubana. 6:24-28.

CENICAÑA. 1998. Diagnóstico de enfermedades: Escaldadura de la hoja y raquitismo de la soca. Colombia. Carta Trimestral N° 1, Vol. 20:17.

CENICAÑA. 2002. Diagnóstico de enfermedades: Incidencia de la escaldadura de la hoja y raquitismo de la soca. Colombia. Carta Trimestral N° 00, Vol. 00:00.

CENICAÑA.1997. Incidencia de Escaldadura de la hoja. Colombia. Carta Trimestral N° 4, Vol. 19:12-13.

CHAMPOISEAU, P., DAUGROIS, J., GIRARD, J., ROYER, M., ROTT, P. 2006. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scalds pathogen. *Phytopathology*. 96(1): 33-45.

CHAMPOISEAU, P., DAUGROIS, J., PIERETTI, I., COCIANCICH, S., ROYER, M., ROTT, P. 2006. High variation in pathogenicity of genetically closely related strains of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen, in Guadeloupe. *Phytopathology* 96:1081-1091.

CHINEA, M., NASS, H., DABOIN, y DIEZ, M. 2000. Enfermedades y daños de la caña de azúcar en Latinoamérica. Barquisimeto. 107 p.

CHINEA, M.A. 2004. Las enfermedades de la caña de azúcar en Cuba durante las últimas 5 décadas. Panorama fitopatológico de la caña de azúcar en Cuba.

COMSTOCK, J., IREY, M. 1992. Detection of the sugarcane leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, using tissue blot immunoassay, ELISA and isolation Techniques. *Plant Disease*, 76:1033-1035.

COMSTOCK, J. 2001. Foliar symptoms of sugarcane leaf scald. *Sugar J.*, 64(3):23-32.

COMSTOCK, J.C., and LENTINI, R.S. 2005. Sugarcane leaf scald disease. SS-AGR-201. University of Florida, IFAS Extension. Gainesville, FL 32611.

CÓRIO DA LUZ, W. 2000. Classificação dos seres vivos para o novo milênio. Parte I- O sistema de 25 Reinos em três domínios, *RAPP*. 8:1-25.

CORTEGAZA, L., ARENCIBIA, A. 2009. Evaluación de la respuesta defensiva de la caña de azúcar ante la bacteria patógena *Xanthomonas albilineans* Ashby Dowson en interacción con *Guconacetobacter diazotrophicus*. *Fitosanidad* 13(1).AP-C42.

COVA, J., CARDONA, R., NASS, H. y URIBE, E.2005. Enfermedades de la caña de azúcar (*Saccharum spp*) presentes en el estado Portuguesa, Período 2003-2005. Póster presentado en el VI Congreso Azucarero Nacional. San Cristóbal, Táchira.

DAUGROIS, J.H., CHAMPOISEAU, P., ROTT, P. 2005. Epiphytic colonization and infection by *Xanthomonas albilineans* of two sugarcane cultivars differing in resistance to leaf scald disease. *Proc. ISSCT* 25:678-685.

DAUGROIS, J.H., DUMONT, V., CHAMPOISEAU, P., COSTET, L., BOISNE-
NOC, R., ROTT, P. 2003. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by two
strains of *Xanthomonas albilineans*. Eur.J.Plant Pathol., 109(5):445-458.

DAVIS, M., ROTT, P., BAUDIN, P., DEAN, J. 1994. Evaluation of selective media
and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of
sugarcane leaf scald disease. Plant Dis. 78:78-82.

DAVIS, M., ROTT, P., WARMUTH, C., CHATENET, M., BAUDIN, P. 1997.
Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans* , the sugarcane leaf
scald pathogen. Phytopathol. 87:316-324.

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND
ZELLKULTUREN GMBH (DSMZ) .2004. Bacterial Nomenclature up-to-date.
Braunschweig, Germany. 72.

DÍAZ, M., PERALTA, E. 2004. Caracterización, diversidad y diagnóstico molecular
de *Xanthomonas albilineans* en Cuba: Identificación de nuevas variantes bacterianas
causantes del brote actual de escaldadura foliar de la caña de azúcar en el país.
CENSA – INICA – MINAZ – UNIVERSIDAD DE LA HABANA.

DÍAZ, M., PERALTA, E., IGLESIAS, A., PAZOS, V., CARVAJAL, O., PÉREZ,
J., GIGLIOTTI, E., CAMARGO, L. 2001. Genetic diversity of *Xanthomonas*
albilineans (Ashby) Dowson in Cuba. Publication no. P-2002-0027-CRA.

DYE, D. W.1966. A comparative study of some atypical "Xanthomonads", N. Z. JI.
Science, 9:843-854.

DYE, D.W. 1962. The Inadequacy of the Usual Determinative tests for the
Identification of *Xanthomonas* spp. N.Z.JI. Sci., 5:393-416.

DYE, D., LELLIOT, R. 1974. Genus II. *Xanthomonas*, In: R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Edition. Williams and Wilkins, Baltimore. 243-249 p.

FILOTET, G. 1999. Comparative study of two isolates of *Xanthomonas albilineas* (Ashby) Dowson, originated from different geographical zones. Proceedings of an international symposium of new aspects of resistance research on cultivated plants: bacterial disease. Aschersleben, Germany, 5:61-62.

FRISON, E., PUTTER, C. 1993. Technical guidelines for the safe movement of sugar cane germplasm, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Board for Plant Genetic Resources, Rome.

GONCALVES, E., ROSATO, Y. 2002. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:355-361.

GRIVET, I., ARRUDA, P. 2001. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 122-127.

GRAHAM, J., HARTUNG, J., STALL, R., CHASE, A. 1990. Pathological, restriction fragment length polymorphism, and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts. *Phytopathology*, 80:829-836.

GUEVARA, L., OVALLE, W. 2005. Effect of treatments to eliminate systemic pathogens from sugarcane setts. *Proc. ISSCT.* 25:623-628.

GUZMÁN, M., ANGEL, J., VICTORIA, J., ALVÁREZ, A. 1996. Diagnóstico de la escaldadura de la hoja *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en caña de azúcar. Fitopatología Colombiana 21(1):10-17.

HARRISON, N., DAVIS, M. 1990. Comparison of serological techniques for diagnosis of Ratoon stunting disease. En: Sugarcane (England) Supplement. 5-9p.

HE, Y.W., ZHANG, L.H. 2008. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. Microbiol. Rev. 32: 842-857.

HOGENHOUT, S.A., LORIA, R. 2008. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. Cur. Op. Plant Biol. 11: 449-456.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEAT, P.H., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. Williams & Wilkins ed.

HONEYCUTT, R., SOBRAL, B., McCLELLAND, M. 1995. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. Microbiology. 141: 3229-3239.

HUANG, G., ZHANG, L., BIRCH, R. 2000. Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. Gene. 258(1-2):193-199.

HUANG, G., ZHANG, L., BIRCH, R. 2001. A multifunctional polyketide-peptide synthetase essential for albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. Microbiology. 147(3):631-642.

HUERTA, M., ORTEGA, L., LANDEROS, C., FUCIKOVSKY, L., MARIN, M. 2003a. Respuesta de 10 variedades de caña de azúcar a la escaldadura de la hoja *Xanthomonas albilineans* (Sabih) Dowson, en la región central costera de Veracruz. *Agrociencia* 37(5):511-519.

HUERTA, M., SANDOVAL, J., CARDENAS, E., ROJAS, R., FLORES, S., MARIN, M. 2003b. Evaluación de resistencia de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) Co997 y MEX64-1487, analizando colonización y dinámica poblacional de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en sus tallos. *Mex. Rev. Phytophatol.* 21:316-322.

HUERTA, M., SANDOVAL, J., CARDENAS, E., ROJAS, R., FLORES, S., MARIN, M. 2003c. 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. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 316-322.

HUERTA, M., ROJAS, R., BAUTISTA, J., REYES, D., BECERRIL, M., ROMERO, O., FRANCO, O., JIMENEZ, D., ARAGON, A., SIMON, A., GUILLEN, D.2009. Genetic and pathogenic diversity of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, in Mexico. *Research Journal of Biological Sciences* 4(3):312-319.

IGLESIAS, A., DÍAZ, M., ALVÁREZ, E., PERALTA, E., PAZOS, V. 2003. Optimización del diagnóstico múltiple de la escaldadura foliar y el raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. *Rev. Protección Veg.*18 (1):15-18.

JANSEN, P., COOPMAN, R., HUYS, G., SWINGS, J., BLEEKER, M., VOS, P., ZABEAU, M., KERSTERS, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting methods AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142:1881-1893.

JAUFEERALLY-FAKIN, Y., AUTREY, J., DOOKUN, A., TOTH, I., DANIELS, M. 2000. Genetic identification of the leaf scald pathogen, *Xanthomonas albilineans*, in Mauritius using a new set of specific primers. Sugarcane International 7-13.

JIMÉNEZ, O. 2004. Diagnóstico de *Xanthomonas albilineans* y evaluación del comportamiento varietal en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Tesis de Maestría. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. 148 p.

JIMÉNEZ, O., CONTRERAS, N., NASS, H. 2004. *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar en los estados Lara y Yaracuy. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 21:231-243.

JONES, J., CHASE, R., HARRIS, G. 1993. Evaluation of the biological GN microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria, Plant Disease. 77(6):553-558.

KADO, C., HESKETT, M. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60(6):969-976.

KLETT, P., ROTT, P. 1994. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe, Journal of Phytopathology 142: 283-291.

KOIKE, H. 1965. The aluminium-cap method for testing sugarcane varieties against leaf scald disease. Phytopathology 55(3):317-319.

KOIKE, H. 1968. Leaf scalds of sugarcane in Continental United States a first report. Plant Disease 52 (8):646-649.

LOPES, S., and DAMANN, K. 1997. PCR detection of *Xanthomonas albilineans* from vascular sap of cane. Sugarcane 5:13-18.

LOPES, S., DAMANN, K., GRELEN, L. 2001. Xanthomans albilineans diversity and identification based on rep-PCR fingerprints, Current Microbiology, 42:155- 159.

LOUWS, F., RADEMAKER, J., DE BRUIJN, F. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. Ann. Rev. Phytopathol. 37:81-125.

LU, J., PERNG, C., LEE, S., WAN, C. 2000. Use of PCR with universal primers and RFLP for detection and identification of common bacterial pathogens in CSF. J. Clin. Microbiol 38:2076-2080.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J.2000. Brock biology of microorganism, 9^a ed. Prentice-Hall, Inc.

MAIDAK, B.L., COLE, J.R., PARKER, C.T.J., GARRITY, G.M., LARSEN, N.LI.B., LILBURN, T.G., MC CAUGHEY, M.J., OVERBEEK, R., PRAMANIK, S., SCHMIDT, T.M., TIEDJE, J.M., WOESE, C.R.1999. A new version of the RDP (Ribosoma Database Project). Nucleic Acids res. 27:171-173.

MANSFIELD, J.W. 2009. From bacterial avirulence genes to effector functions via the *hrp* delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. Mol. Plant Pathol. 10: 721- 734.

MARTÍN, D., PAZOS, V., PERALTA, E. 2000. Detección de infecciones latentes de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en plántulas de caña de azúcar en Cuba. Rev. Protección Veg. 15:123-130.

MATOS, M., PERALTA, E., PERÉZ, J., CORTEGAZA, L., SANTANA, O., CHINEA, A., CARVAJAL, O. 2003. Evaluación de la presencia de los serovares I y III de *Xanthomonas albilineans* en plantas procedentes de áreas comerciales y vitroplantas de caña de azúcar. Rev. Protección Veg. 18(3):159-161.

NORTH, D.S.1926. Leaf scald, a bacterial disease of sugarcane. Agric.Rep.No.8. Colonial sugar Refining Co., Ltd., Sydney, Australia.

OCHIAI, H., HORINO, O., MIYAJIMA, K., KAKU, H.2000. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* strains from Sri Lanka. Phytopathology 90:415- 421.

ORDOSGOITTI, A., MANZANO, A., PIÑERO, A.1997. La escaldadura de la caña de azúcar en Venezuela. Agronomía Tropical 27:235-252.

OROPEZA, M., CARBALLO, J., ALVEZ, B., CONTRERAS, N., ALONSO, G. 2008. Estandarización de métodos moleculares para la detección de bacterias fitopatógenas asociadas al cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum sp.*). Memorias del Instituto de Biología Experimental Vol. 5: 205-208.

OVALLE, W., COMSTOCK, J., JUAREZ, J., SOTO, G.1995. First report of leaf scalds sugarcane (*Xanthomonas albilineans*) in Guatemala. Plant Disease, 79: 211.

PALLERONI, N.J. and BRADBURY, J.F. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980). Int. J. Syst. Bacteriol., 43:606-609.

PALLERONI, N.J., HILDEBRAND, D.C., SCHROTH, M.N., HENDSON, M. 1993. Deoxyribonucleic acid relatedness of 21 strains of *Xanthomonas* species and Pathovars. J. Appl. Bacteriol. 75:441-446.

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 Disease*. 81 (2): 189-194.

PAN, Y., GRISHAM, M., BURNER, D., LEGENDRE, B., WEI, Q. 1999. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the agent causal bacterium of sugarcane leaf scalds disease. *Plant Disease* 83(3):218-222.

PERALTA, E.L., MARTÍNEZ, B., MARTÍN, D., JONES, P. 1997. Quality control for the production of pathogen-free plantlets in cuban sugarcane biofactories, Abstracts of ISSCT Pathology and Molecular Biology Workshop, South Africa, May, 1997.

PERÉZ, J., MATOS, M., MONTALBÁN, J., PERALTA, E., PÉREZ, G., CARVAJAL, O; CHINEA, A. 2003. Desarrollo de la escaldadura foliar *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson de la caña de azúcar en Cuba: patógeno, variedades y clima. *Rev. Protección Veg.* 18(3):162-167.

PERMAUL, K., PILLAY, D., PILLAY, B. 1996. Random- amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis shows intraspecific differences among *Xanthomonas albilineans* Strains. *Letters in Applied Microbiol.* 23:307-311.

PIERETTI I., ROYER M., BARBE V., CARRERE S., KOEBNIK R., COCIANCICH S., COULOUX A., DARRASSE A., GOUZY J., JACQUES M.A., LAUBER E., MANCEAU C., MANGENOT S., POUSSIER S., SEGURENS B., SZUREK B., VERDIER V., ARLAT M., ROTT P. 2009. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. *BMC Genomics* 10:616.

QUIRINO, M.2003. Polimorfismos de seqüência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana de açúcar homólogos a genes de resistência. Tesis de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Brasil.

RADEMAKER, J., HOSTE, B., LOUWS, F., KERSTERS, J., VAUTERIN, L., VAUTERIN, P., DE BRUIJN F. 2000 . Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50:665-677.

RAMOS, R., BARBOSA, E. 2005. 8. Identificação de bactérias fitopatogenicas em Manual de práticas em fitobacteriologia. 2ª Edição. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE – Brasil. 67-112 p.

RICAUD, C. y RYAN, C.C. 1989. Leaf scald. In: RICAUD, C., EGAN, B., GILLASPIE, A., HUGHES, C. Eds. *Diseases of sugarcane: Major diseases*. Amsterdam. Elsevier Science, 39–58p.

RICAUD, C.1975. Factors affecting the severity of leaf scald disease of sugarcane in different countries. *Proc. India Sugar Technol. Assoc., Seminar Paper*, 6pp.

RIVERA, N.D. 1985. Epidemiología y pérdidas de *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* y estudio de la marchitez causada por *Fusarium moniliforme* y *Cephalosporium sacchari* en caña de azúcar. Informe Problema ramal (01.913.07), INISAV, MINAGRI, 1985, p.5-173.

ROMEIRO, R. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Capítulo 4. Universidad Federal de Viçosa. Editora UFV. 279p.

ROTT, P.1995. Leaf scald of sugarcane. Agriculture and Development; CIRAD CA,51-58.

ROTT, P., CHATENET, M. 1998. Genetic diversity and variability in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*. Annual Report Sugarcane, CIRAD, Montpellier. France, 27p.

ROTT, P., DAVIS, M. 2000. Leaf scald. In: A guide to sugarcane diseases. P. ROTT, R.A. BAILEY, J.C. COMSTOCK, B.J. CROFT and A.S. SAUMTALLY (Eds), Montpellier, France, CIRAD/ISSCT, 38-44.

ROTT, P., COSTET, L., DAVIS, M., FRUTOS, R., GABRIEL, D.1996. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. J. Bacteriol.178 (15):4590-4596.

ROTT, P., MOHAMED, I., KLETT, P., SOUPA, D., DE SAINT-ALBIN, A., FELDMANN, P., LETOURMY, P. 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. Phytopathology 87(12):1202-1213.

ROTT, P., SOUPA, D., BRUNET, Y., FELDMANN, P., LETOURMY, P. 1995. Leaf scald *Xanthomonas albilineans* incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivar in Guadeloupe. Plant Pathology 44: 1075-1084.

ROYER, M., COSTET, L., VIVIEN, E., BES, M., COUSIN, A., DAMAIS, A., PIERETTI, I., SAVIN, A., MEGESSIER, S., VIARD, M., FRUTOS, R., GABRIEL, D., ROTT, P. 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory and resistance genes. Molecular Plant-Microbe Interactions. 17(4): 414-427.

SAETTLER, A., SCHAAD, N., ROTH, D. 1989. Detection of bacteria en seed and other planting material. St. Paul Minnesota. APS Press. The American Phytopathological Society. 122 p.

SAUMTALLY, S., MÉDAN, H., AUTREY, L. 1998. Evolution of aerial infection of leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in sugarcane. Seminarios Interamericanos Caña de Azúcar. Biology: Pathology.493-496.

SAUMTALLY, S., MÉDAN, H., AUTREY, L. 1998. Detection, transmission and control of leaf scald of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. Seminarios Interamericanos Caña de Azúcar. Biology: Pathology.477-484.

SCHAAD, N., STALL, R. 1988. Differentiation of commonly isolated species and pathovars. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. N.W. Schaad (ed). 2^a Edition APS, St. Paul, Minnessota. 88-89.

SCHAAD, N., JONES, J., CHUN, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.373p.

SCHAAD, N., FREDERICK, R., SHAW, J., SCHNEIDER, R., HICKSON. R., PETRILLO, M., LUSTER, D. 2003. Advances in molecular based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. Ann. Rev. Phytopathol. 41:305-324.

SCHENCK, S., HU, J., LOCKHART, S. 1997. Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. *Sugarcane* 4:5-14.

SIGEE, D. 1990. Microscopical techniques for bacteria. In: Klement, Z.; Rudolph, K.; Sands, D.C. (Ed). *Methods in Phytobacteriology*, Academiai Kiado, Budapest, Chapter 9, 153-190.

SORDI, R., and TOKESHI, H. 1986. Presence of *Xanthomonas albilineans* in guttation droplets of sugarcane and sweet corn leaves showing leaf scald disease symptoms. *STAB*. 4(6):60-63.

SORDI, R., and TOKESHI, H. 1987. Use of Cuba sweet corn as indicator plant of sugarcane leaf scald, caused by *Xanthomonas albilineans*. *Summa Phytopathologica* 13:93-110.

SWINGS, J.G., and CIVEROLO, E. L. 1993. *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas albilineans: cause of leaf scald of sugarcane*. ROTT, P. Chapman & Hall, London. United Kingdom. 70-76 pp.

TOKESHI, H. 1986. Ocorrência ou Não de raças fisiológicas de *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar, *STAB*, 6:68-72.

TOKESHI, H. 1997. Doença da cana de açúcar. ESALQ./USP, Editora Agronômica, CERES Ltda/SA. P.10-13.

TRUJILLO, G. 1998. Fundamentos de bacterias fitopatogénas. Alcance 56. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. Venezuela. 52 – 53pp.

VAN DEN MOOTER, M., SWINGS, J. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 Xanthomonas strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40:348-369.

VAUTERIN, L., SWINGS, J. 1997. Are classification and phytopathological diversity compatible in Xanthomonas. *Journal of Industrial Microb. & Biotechnol.*, 19:77-82.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., SWINGS, J. 1995. Reclassification of Xanthomonas, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:472-489.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., YANG, P., ALVAREZ, A., KERSTERS, K., SWINGS, J. 1993. Taxonomy of the genus Xanthomonas, In: Xanthomonas, Swings J.G. and E.L. Civerolo (Ed.), Chapman & Hall, London, Cap.3, pp. 157-192.

VAUTERIN, L., RADEMAKER, J., SWINGS, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus Xanthomonas, *Phytopathology* 90:677-682.

VICTORIA, J. y GUZMÁN, M. 1998. Diagnóstico de enfermedades: incidencia de la escaldadura de la hoja y raquitismo de la soca. *Carta Trimestral Cenicaña. Colombia*. 20 (1):17.

VICTORIA, J. 1994. Escaldadura de la hoja en Colombia. Situación, prevención y control. CENICAÑA. Colombia. Serie Divulgativa N° 5.

VIVIEN, E., COCIANCICH, S., DUPLAN, I., PIERETTI, P., ROTT, P., ROYER, M. 2006. Pathological and epidemiological studies. Sugarcane leaf scald. In: Albidin biosynthesis pathways. Annual Report Sugarcane CIRAD, France.13-16p.

VIVIEN, E., MEGESSIER, S., PIERETTI, I., COCIANCICH, S., FRUTOS, R., GABRIEL, W., ROTT, P., ROYER, M. 2005. *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *Microbiol Lett.* 251(1):81-9.

WALKER, M., BIRCH, R., PEMBERTON, J. 1988. Cloning and characterization of an albicidin resistance gene from *Klebsiella oxytoca*. *Microbiology*, 2: 443-454.

WALL, M., BIRCH, R. 1997. Genes for albicidin biosynthesis and resistance span at least 69 kb in the genome of *Xanthomonas albilineans*. *Letters in Applied Microbiology*, 24:256-260.

WANG, Z., COMSTOCK, J., HATZILOUKAS, E., SCHAAD, N. 1999. Comparison of PCR, Bio-PCR, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of leaf scald of sugarcane. *Plant Pathol.* 48:245-252.

WILBRINK, G. 1920. De Gomziekte van het Suikerriet, hare Oorzaak en hare Bestrijding, *Arch. Suikerind. Ned. Indie.* 28:1399-1525.

WOESE, C.R., KANDLER, O. and WHEELIS, M.L. 1990. Towards a natural system of organism: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4576-4579.

YANG, P., ROTT, P., VAUTERIN, L., HOSTE, B., BAUDIN, P., KERSTERS, K., and SWINGS, J. 1993a. Intraspecific variability of *Xanthomonas albilineans*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16:420-426.

YANG, P., VAUTERIN, L., VANCANNEYT, M., SWINGS, J. and KERTERS, K. 1993b. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 47-71.

YUNG-AN LEE, AI-NING SUNG, TZU-FEN LIU, YUNG-SHAN LEE.
2009. Combination of Chromogenic Differential Medium and *estA*-Specific PCR for Isolation and Detection of Phytopathogenic *Xanthomonas* spp. Applied and Environmental Microbiology, 75 (21):6831-6838.

ZHANG, L., BIRCH, R. 1996. Biocontrol of sugar cane leaf scald disease by an isolate of *Pantoea dispersa* which detoxifies albicidin phytotoxins, Lett. Appl. Microbiol., 22:132-136.

ZHANG, L., BIRCH, R. 1997a. The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:9984-9989.

ZHANG, L., BIRCH, R. 1997b. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*, J. Appl. Microbiol. 82:448-454.

ZHANG, L., XU, J., BIRCH, R. 1998. High affinity binding of albicidin phytotoxins by the AlbaA protein from *Klebsiella oxytoca*, Microbiology, 144:555- 559.

ZHANG, L., XU, J., BIRCH, R. 1999. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. Nature-Biotechnology, 17:1021-1024.