

Técnicas de inmunofluorescencia indirecta y microaglutinación en portaobjeto para el diagnóstico rápido de *Ralstonia solanacearum* Smith en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Damaris Herrera y Yonis Hernández*

Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas, Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.
Apdo. 4579. Maracay 2101. Aragua. Venezuela

RESUMEN

Ralstonia solanacearum es una bacteria patógena de las plantas ampliamente distribuida a nivel mundial. Es la causante de la marchitez bacteriana, una de las principales enfermedades limitantes de la producción de solanáceas en Venezuela. Para lograr un manejo eficiente del patógeno se hace necesaria su identificación rápida y precisa. El objetivo de esta investigación fue ajustar el protocolo para la aplicación de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y microaglutinación en portaobjeto que permitan el diagnóstico rápido e identificación en laboratorio de *R. solanacearum* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). El antisuero a la bacteria fue obtenido inmunizando con bacterias formalizadas, conejas de 2,5 kg y 2,5 meses de edad. Los antígenos utilizados para las pruebas serológicas fueron cultivos bacterianos puros de 48 h de crecimiento y extractos de plantas enfermas, y los controles, extractos de plantas sanas y bacterias patógenas de otros cultivos. Para la sensibilización de la técnica de microaglutinación en portaobjeto se utilizó proteína A de *Staphylococcus aureus*. Los anticuerpos obtenidos fueron específicos. Se determinó la sensibilidad y especificidad de los métodos. El límite de detección fue desde 10^4 a 10^8 UFC/mL para ambas técnicas. No se observó la presencia de reacciones cruzadas con otros géneros y especies de bacterias estudiadas excepto con *Pseudomonas syringae* pv. tomato en la técnica de microaglutinación en portaobjeto, pero una reacción fácilmente diferenciable a la del antígeno homólogo.

Palabras clave: bacteria, detección, marchitez bacteriana, moko, serología

Immunofluorescence indirect techniques and microagglutination in slides for rapid diagnosis of *Ralstonia solanacearum* Smith in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is a plant pathogenic bacterium widely distributed worldwide. Bacterial wilt is a disease caused by this bacterium, one of the main constraints in the production of Solanaceae in Venezuela. To achieve an efficient management of the pathogen it becomes necessary a quick and accurate identification. The objective of this research was to adjust the protocols for the laboratory diagnosis and identification of *R. solanacearum* with indirect immunofluorescence and agglutination on slides. The antiserum to the bacteria was obtained by immunizing with formalized bacteria, rabbits of 2.5 kg and 2.5 months old. The antigens used for serological tests were pure bacterial cultures 48 h of growth and extracts of diseased plants. The controls were extracts of healthy plants and

*Autor de correspondencia: Yonis Hernández
E-mail: yonisbact@gmail.com

pathogenic bacteria of other crops. For the sensibilization of the microagglutination in slide technique was used protein A of *Staphylococcus aureus*. Obtained antibodies were specific. The sensitivity and specificity of the methods were determined. The limit of detection was from 10^4 to 10^8 UFC/mL for both techniques. There was no presence of cross-reactivity with other genera and species of bacteria studied, except with *Pseudomonas syringae* pv. tomato in microagglutination in slide technique, but an easily differentiable reaction to the antigen homologous.

Key words: bacteria, detection, bacterial wilt, mocus, serology

INTRODUCCIÓN

Ralstonia solanacearum es una bacteria del suelo patógena de plantas, ampliamente distribuida a nivel mundial. Puede ser clasificada en razas de acuerdo al rango de hospedantes y en biovares basado en pruebas bioquímicas. La sobrevivencia de la bacteria se da por largos períodos de tiempo por asociación con restos de plantas, plantas asintomáticas, en raíces o en el agua (Muñoz, 1996; García *et al.*, 1999ab; Siri *et al.*, 2004; López, 2004; Gómez, 2005).

La bacteria afecta solanáceas como papa, tomate, berenjena, tabaco, ají dulce, pimentón, chile, algunas especies diploides y triploides de banana, malezas de varias familias, jengibre, mora, maní, merey, guanábana y la palma alexandra (Muñoz, 1996; García *et al.*, 1999a; Siri *et al.*, 2004; López, 2004; Gómez, 2005). Se ha demostrado que muchas especies de plantas cultivadas como remolacha, frijol, caupí y repollo, que son consideradas plantas no hospedantes, pueden mantener poblaciones elevadas de muchas cepas de los biovares I y III (López, 2004).

La marchitez bacteriana, una de las enfermedades causadas por *R. solanacearum*, es una de las principales limitantes en la producción de solanáceas en Venezuela y otros países, especialmente en papa y tomate (Muñoz, 1996; García *et al.*, 1999b). Se han registrado pérdidas de 29% en la producción de frutos frescos de híbridos de tomate. En Indonesia, las pérdidas varían de 15 a 32%, según las variedades transplantadas (García *et al.*, 1999a). En Guatemala es un problema importante para los agricultores que cultivan el rubro, tanto por los daños directos que causa como por los altos costos de los tratamientos para tratar de controlarla, teniendo una incidencia que puede llegar hasta 80% y en casos muy severos a 100% (López, 2004).

En el caso de la papa, limita el cultivo en Asia, África, América Central y del Sur, ocasionando severas pérdidas en todas las regiones (García *et al.*, 1999b). En China se ha presentado como causa de reducciones severas del rendimiento en batata, estimándose desde un 30-40% hasta un 70-80% (Clark y Moyer, 1988). En Venezuela, la presencia de la marchitez bacteriana de la papa en las principales áreas productoras del estado

Mérida representa un riesgo para la producción del rubro, fundamentalmente de los tubérculos destinados a semilla (García *et al.*, 1999b).

Para la marchitez bacteriana uno de los aspectos más importantes de la enfermedad es el diagnóstico y detección del agente causal, para lo cual se utilizan técnicas serológicas y enzimáticas como ELISA, inmunofluorescencia e inmunocaptura que detectan bajas concentraciones de *R. solanacearum* (Álvarez *et al.*, 2008). La inmunofluorescencia es considerada, así como otras, una pieza clave para la detección e identificación de *R. solanacearum* tanto en plantas enfermas como en semillas (EPPO, 2004).

Por lo antes planteado, el objetivo de esta investigación consistió en ajustar el protocolo para la utilización de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y de microagglutinación en portaobjeto en el diagnóstico rápido de *R. solanacearum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se efectuó en el laboratorio de Bacterias Fitopatógenas del Instituto de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Campus Maracay, estado Aragua.

Producción del antisuero

Para la obtención del antisuero se usaron células formalizadas (Trujillo y Saettler, 1981) de *R. solanacearum* que fueron inyectadas en forma intravenosa en la oreja derecha de dos conejas de dos meses y medio de edad y aproximadamente 2,5 kg de peso. Se administraron cinco dosis a intervalos de tres días a cada coneja, siguiendo el esquema descrito en el Cuadro 1 (Amat y García, 1997; Álvarez *et al.*, 2008). A los 8 y 15 d de la última inmunización, se procedió a efectuar el sangrado para la obtención del antisuero (Trujillo y Saettler, 1981). Dos meses después del último sangrado, se realizó una reinoculación de las conejas inyectando 2 mL de antígeno y un último sangrado a los 8 d. Para determinar el título de los antisueros se usaron las técnicas de aglutinación en tubo y doble difusión en agar y se utilizaron células vivas y sometidas a calor del antígeno homólogo (Trujillo y Saettler, 1981).

Cuadro 1. Esquema para inmunización de las conejas

Días	Dosis (mL)
0	0,1
3	0,3
6	0,5
9	1,0
12	2,0

Optimización de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y microaglutinación en portaobjeto

Las técnicas fueron aplicadas utilizando como antígenos cultivos bacterianos puros de *R. solanacearum* de 48 h de crecimiento, extractos de plantas enfermas y sanas de tomate y bacterias patógenas de otros cultivos de géneros y especies diferentes, entre ellas *Xanthomonas phaseoli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas* sp. Los ensayos fueron montados dos veces y por cada prueba se realizaron cuatro repeticiones.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se basó en la metodología descrita por varios autores (Schaad *et al.*, 1990; Fisac, 1991; De Boer, 1993) y el procedimiento fue el siguiente: suspensiones de 20 μ L de cada una de las diluciones y de cada muestra fueron extendidas sobre portaobjetos en forma separada y se dejaron secar completamente al aire. Luego fueron fijadas flameándose suavemente en el mechero y seguidamente se depositaron sobre cada una de las muestras 20 μ L del antisuero obtenido y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 30 min. Se procedió a lavar los portaobjetos suavemente con agua destilada para eliminar el antisuero no reaccionante y luego fueron dejados secar al aire por 5 min.

Se colocó una gota (20 μ L) del antisuero conjugado al colorante fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína con anti-rabbit IgG, marca Sigma). A continuación se incubaron los portaobjetos en una cámara húmeda nuevamente a 37°C por 30 min. Los portaobjetos fueron lavados, se dejaron secar al aire y se observaron al microscopio con el objetivo de inmersión y luz UV.

Del antígeno puro se probaron las diluciones 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ UFC/mL y el extracto de planta en una relación 1:3 (1 mL de agua destilada estéril por 3 g de tejido vegetal) del antisuero 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y del conjugado 1:20, 1:200 y 1:2 000. El antígeno fue diluido en agua destilada estéril, el antisuero en PBS (0,01M pH 7,2) mas 10 μ L de solución bloqueadora (leche descremada al 10%, 0,2% de azida de sodio) y el conjugado en PBS.

Para la microaglutinación en portaobjeto, se utilizó la proteína A de *Staphylococcus aureus* con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la técnica, según procedimiento señalado por Lyons y Taylor (1990) y Walkey *et al.* (1992).

Para la obtención del antisuero conjugado se diluyó el antisuero con 24 volúmenes de buffer fosfato salino (2,9 g de Na₂HPO₄, 12 mL de agua, 0,2 g de KH₂PO₄, 8 g de NaCl y 0,2 g KCl en 1 000 mL de agua destilada, pH 7,2 y 0,2 g/L de azida de sodio). Se conjugó el antisuero diluido con *S. aureus* mezclando a razón 5:1 (Walkey *et al.*, 1992). Las cantidades de reactivo utilizado fueron 170 μ L de antisuero, 4 mL de PBSA y 830 μ L de solución de trabajo de *S. aureus*. La preparación se almacenó a 2-4°C. Las diluciones de antisuero conjugado probadas fueron 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64.

El procedimiento de la técnica consistió en mezclar el antisuero conjugado y el organismo en estudio, en cultivo puro o extracto de tejidos de plantas infectadas, varios segundos sobre un portaobjeto usando un ansa de platino (Lyons y Taylor, 1990). Se usó una gota del conjugado y una de la bacteria o extracto. Como control positivo se utilizó el antígeno homólogo y como control negativo el antisuero conjugado solo.

Para determinar la sensibilidad del método en términos de detección de la bacteria en UFC/mL, se prepararon suspensiones de la bacteria y se hizo una serie de diluciones (10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ UFC/mL). Cada dilución fue probada con su antisuero conjugado homólogo mezclando una gota del mismo y una gota de bacteria. Durante 60 seg las muestras se observaron al microscopio para ver si había una reacción de aglutinación, la cual se tomó como positiva si ocurría la formación de masa granular o aglutinación en la suspensión (Lyons y Taylor, 1990).

Prueba de especificidad del antisuero

Se evaluó la especificidad de los antisueros con las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y microaglutinación en portaobjeto. Se prepararon los portaobjetos como ya se describió para cada tipo de técnica, con la diferencia que se usaron las diluciones que presentaron mejores resultados en cada una de ellas. En este caso, se usó el antígeno homólogo (*Ralstonia solanacearum*) al antisuero como testigo positivo el cual era proveniente de plantas enfermas, antisuero solo como testigo negativo y como antígenos heterólogos, las bacterias *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Xanthomonas phaseoli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Pseudomonas* sp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Título del suero normal

Los títulos obtenidos para el suero normal fueron lo suficientemente bajos como para considerar que las conejas no poseían anticuerpos a los antígenos que se iban a utilizar para la inmunización. En el caso de la coneja 1 no hubo títulos en ninguno de los tubos, en cambio en los tubos de la coneja 2 hubo una pequeña reacción en el tubo 1:1. Esa reacción pudo deberse a que la coneja posiblemente estuvo expuesta a algún antígeno bacteriano relacionado.

Títulos en aglutinación en tubo

Los resultados de la prueba se presentan en el Cuadro 2, donde se observa que el antisuero obtenido en el tercer sangrado tuvo títulos más altos e igualmente fueron mayores cuando se utilizaron células vivas que cuando fueron sometidas a calor.

Títulos en doble difusión en agar

Tanto en células vivas como en células sometidas a calor húmedo, el título más alto que se obtuvo fue 1:32 (Cuadro 3). Tanto en aglutinación en tubo (Cuadro 2), como en doble difusión en agar (Cuadro 3), los mejores resultados se obtuvieron en el título del tercer sangrado de la coneja 1 (doble difusión en agar 1:32; aglutinación en tubo 1:262144) para células vivas y por consiguiente, fue el que se utilizó para realizar las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y microaglutinación en portaobjeto.

Por otra parte también se observó que los títulos de la prueba de doble difusión en agar fueron más bajos que la de aglutinación en tubo, lo que coincide con los valores obtenidos por Muñoz (1996) en la aplicación de estas técnicas, en las cuales el valor más alto de título en doble difusión en agar fue de 1:64 y en aglutinación en tubo de 1:271888. El mismo autor expresa que los valores de los títulos para células vivas y sometidas a calor húmedo en la prueba de doble difusión en agar fueron similares. En cambio en los resultados obtenidos en este estudio, esta condición se cumple sólo para los títulos del antisuero de la coneja 2, mientras en el caso de la coneja 1 si hubo diferencias entre los títulos de células vivas y sometidas a calor húmedo. Álvarez *et al.* (2008) señalan que con la técnica de doble difusión en agar obtuvieron un título de anticuerpos de 1:128, más altos que los resultados obtenidos en esta investigación.

Técnica de inmunofluorescencia indirecta

Los mejores resultados en esta técnica fueron con la dilución de antígeno de 10^6 UFC/mL, en la cual se obtuvieron reacciones positivas en la mayoría de las diluciones de antisuero y conjugado, exceptuando en la dilución de conjugado 1:2000, donde sólo hubo reacción positiva con la dilución de antisuero 1:2. Por otra parte, para la dilución de antígeno 10^7 también se obtuvieron iguales resultados, pero con reacciones más bajas que en la dilución anteriormente nombrada. Las poblaciones de 10^8 y 10^4 fueron las que arrojaron los peores resultados ya que sólo hubo reacciones positivas con la dilución de conjugado 1:20 y hasta la dilución de antisuero 1:2 (Cuadro 4). Estos resultados coinciden

Cuadro 2. Títulos de antisueros en aglutinación en tubo

	Coneja 1		Coneja 2	
	CV ¹	CM ²	CV ¹	CM ²
1 ^{er} sangrado	1:8	1:16	1:16	1:64
2 ^{do} sangrado	1:16384	1:512	1:32768	1:512
3 ^{er} sangrado	1:262144	1:16384	1:16384	1:8192

¹ CV = Células vivas; ² CM = Células muertas.

Cuadro 3. Títulos del antisuero en doble difusión en agar

	Coneja 1		Coneja 2	
	CV ¹	CM ²	CV ¹	CM ²
1 ^{er} sangrado	1:32	1:8	1:4	1:4
2 ^{do} sangrado	1:32	1:8	1:8	1:4
3 ^{er} sangrado	1:32	1:32	1:32	1:32

¹ CV = Células vivas; ² CM = Células muertas

Cuadro 4. Títulos obtenidos con la prueba de inmunofluorescencia indirecta para diferentes poblaciones de *R. solanacearum*, diluciones del antisuero y diluciones del conjugado¹

	Población bacteriana (UFC/mL)				
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
	Conjugado 1:20				
AS Puro	+	+	+	+	+
AS 1:2	+	+	+++	+	+
AS 1:4		+	+	+	-
AS 1:8	-	+	+	+	-
AS 1:16	-	-	+	+	-
AS 1:32	-	-	++	+	-
AS 1:64	-	-	++	+	-
	Conjugado 1:200				
AS Puro	-	-	++	-	-
AS 1:2	-	++	-	-	-
AS 1:4	-	+	++	-	-
AS 1:8	-	++	+	-	-
AS 1:16	-	++	+	-	-
AS 1:32	-	+	+	++	-
AS 1:64	-	+	-	+	-
	Conjugado 1:2000				
AS Puro	-	+	+	+	-
AS 1:2	-	+	+	-	-
AS 1:4	-	-	-	-	-
AS 1:8	-	-	-	-	-
AS 1:16	-	-	-	-	-
AS 1:32	-	-	-	-	-
AS 1:64	-	-	-	-	-

¹ Reacción: Negativa – Regular + Buena ++ Excelente +++

con los obtenidos por Hernández (2009) quien encontró que con todas las poblaciones bacterianas utilizadas en sus estudios (10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ UFC/mL) se observaron células bacterianas en el microscopio, con fluorescencia o no. Por otra parte, Hernández (2009) también explica que con poblaciones de 10⁸ UFC/mL independientemente de las otras condiciones en las cuales hubo fluorescencia, las células estaban muy aglomeradas, condición que también ocurrió en este experimento. Del mismo modo para todas las poblaciones y con diluciones del antisuero mayores de 1:8 y del conjugado de 1:2000, no se observó fluorescencia o la misma fue muy pobre; en cambio, en estos estudios con el conjugado 1:2000 no se observó fluorescencia con diluciones del antisuero desde 1:4 con ninguna de las poblaciones bacterianas. Álvarez *et al.* (2008) encontraron que la concentración adecuada del antígeno utilizado (*R. solanacearum*) fue de 10⁵ UFC/mL, mientras que en este experimento se encontró que la concentración más apropiada fue un poco mayor (10⁶ UFC/mL).

Como se puede observar, la técnica demostró la capacidad de detectar poblaciones bacterianas tan bajas como 10⁴ UFC/mL, tal como expresa Franco (2005) al concluir que es la técnica más utilizada a nivel mundial por su rapidez y sensibilidad en el diagnóstico de *R. solanacearum* y *Clavibacter michiganensis* pv. *sepedonicus*, con las cuales el límite de detección ha sido de 10³ a 10⁴ UFC/mL, al igual que para *Pseudomonas siringae* pv. *tomato*. Amat y Larrinaga (1992); Amat *et al.* (1994) y también obtuvieron buenos resultados a concentraciones de 10³ a 10⁴ UFC/mL con la técnica para detectar *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas campestris* pv. *alliiicola* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Stefanova y García (2007) comentan que la técnica se ha utilizado para el diagnóstico de *Clavibacter xyli* pv. *xyli*, *Xanthomonas campestris* pv. *alliiicola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas albicans*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum* y *Xanthomonas vesicatoria* en caña de azúcar, col, cebolla, frijol, pimienta y tomate obteniendo buenos resultados con 10³ a 10⁴ UFC/mL. Álvarez *et al.* (2008) también detectaron concentraciones de 10⁴ UFC/mL en sus estudios, pero cuando utilizaron medios de cultivos selectivos y medios pre-enriquecidos lograron detectar a *Ralstonia* con la técnica hasta con 10² UFC/mL. Por otro lado, Amat y García (1997) señalan que la técnica permitió detectar concentraciones de hasta 10³ UFC/mL de *Pseudomonas cichorii*.

En las pruebas de especificidad, no se observó reacción con ninguno de los antígenos heterólogos al antisuero, solo hubo fluorescencia con el antígeno homólogo; es decir, el antisuero es específico para la detección de *R. solanacearum* (Cuadro 5). Hernández (2009) encontró reacción del antisuero a *Pseudomonas cichorii* con *R. solanacearum*, aunque ésta fue una reacción fácilmente diferenciable a la del antígeno homólogo. En esta investigación no se encontraron reacciones del antisuero con antígenos heterólogos con esta técnica.

Microaglutinación en portaobjeto

En líneas generales se obtuvieron excelentes resultados en las diluciones de antisuero de 1:2 a 1:32 para las poblaciones bacterianas de 10⁶ a 10⁸, para las otras dos (10⁴ y 10⁵ UFC/mL), los mejores valores se dieron en las diluciones de antisuero conjugado de 1:16 y 1:32, por lo que se decidió utilizar para la prueba de especificidad, la dilución de antisuero conjugado 1:16 con la cual se puede utilizar cualquier población bacteriana (Cuadro 6).

En la confrontación con antígeno proveniente de una planta enferma (Cuadro 7 y 8) se obtuvieron resultados satisfactorios; es decir se observó una excelente reacción de aglutinación con todas las diluciones del

Cuadro 5. Prueba de especificidad del antisuero con la prueba de inmunofluorescencia indirecta para diferentes antígenos (10^6 UFC/mL), con una dilución del antisuero de 1:2 y una dilución del conjugado 1:20

Antígeno	Resultado ¹
<i>Ralstonia solanacearum</i>	+++
Antígeno homólogo proveniente de planta enferma con <i>Ralstonia solanacearum</i>	+++
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	-
<i>Xanthomonas phaseoli</i>	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	-
<i>Pseudomonas</i> sp	-

¹Reacción: Negativa – Regular + Buena ++ Excelente +++

Cuadro 6. Títulos obtenidos con la prueba de microaglutinación en portaobjeto para diferentes poblaciones de *R. solanacearum* y diluciones del antisuero conjugado

Población	Dilución antisuero conjugado ¹					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
10^8	+++	++	++	+++	+++	++
10^7	+++	+++	+++	+++	++	++
10^6	++	++	+++	+++	+++	++
10^5	+	++	+	++	+++	+
10^4	+	+	+	++	++	+

¹Reacción: Negativa – Regular + Buena ++ Excelente +++

Cuadro 7. Títulos obtenidos con la prueba de microaglutinación en portaobjeto para una población de *R. solanacearum* de 10^7 UFC/mL proveniente del laboratorio y de una planta enferma y diferentes diluciones del antisuero conjugado

Fuente	Dilución antisuero conjugado ¹					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
<i>R. solanacearum</i>	+++	++	++	++	++	++
Planta enferma	+++	+++	++	+++	+++	+++
Testigo	-	-	-	-	-	-

¹Reacción: Negativa – Regular + Buena ++ Excelente +++

Cuadro 8. Prueba de especificidad del antisuero conjugado con la prueba de microaglutinación en portaobjeto para diferentes antígenos heterólogo (10^8 UFC/mL), con una dilución del antisuero conjugado de 1:16

Antígeno heterólogo	Resultado ¹
<i>Ralstonia solanacearum</i>	+++
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	-
<i>Xanthomonas phaseoli</i>	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	+
<i>Pseudomonas</i> sp.	-

¹Reacción: Negativa – Regular + Buena ++ Excelente +++

conjugado probadas, lo que significa que la técnica puede ser utilizada a nivel de campo en donde se tome la muestra de la planta y sea observada inmediatamente al microscopio para la identificación de la bacteria, y si la concentración de antígeno es adecuada no sería necesario el uso del microscopio ya que la reacción de aglutinación se puede apreciar a nivel macroscópico, y además se puede apreciar esa excelente reacción con una alta dilución de conjugado (Figura 1). Igual a los resultados de Lyons y Taylor (1990), la mezcla del antisuero conjugado con la bacteria homóloga produjo una reacción positiva fuerte (Figura 2B). Para la mayoría de las combinaciones de antígenos/anticuerpos-conjugado que estudiaron estos autores con diferentes bacterias, obtuvieron una sensibilidad de aproximadamente 10^8 UFC/mL, concentración suficiente de organismo que podría ser extraído directamente de las lesiones en los tallos, hojas y vainas de las plantas infectadas. Adicionalmente, Lyons y Taylor (1990) expresan que la aglutinación con antisueros conjugados parece tener muchas ventajas sobre otros métodos serológicos, aunque suele ser menos sensible que la inmunofluorescencia (IF) y ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA), que tienen una sensibilidad de aproximadamente 10^3 y 10^4 UFC/mL,

respectivamente. Por otra parte, Walkey *et al.* (1992) señalan que la sensibilidad de la aglutinación de la prueba está relacionada con la dilución de antisuero, y se podría obtener aglutinación con un amplio rango de diluciones de antisueros, tal como se puede observar en los resultados obtenidos en esta investigación. También, con estos resultados ha quedado demostrado lo que Lyons y Taylor (1990) y Walkey *et al.* (1992) han expresado en sus estudios, que la sensibilidad del método se puede lograr con la conjugación del antisuero a la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Esto se puede observar en la Figura 1C, en la cual se muestra la confrontación de una dilución de antisuero sin conjugar (1:8) con la bacteria (10^7) y la reacción fue muy baja e imposible de determinar; en cambio, en la confrontación del antisuero conjugado en la misma dilución con la bacteria en una población menor fue excelente (Figura 1B). En las pruebas de especificidad, al igual que en la técnica de inmunofluorescencia, todos los antígenos heterólogos presentaron resultados negativos (Figura 3C) excepto uno, cuando el antisuero conjugado fue confrontado con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, pero con una reacción muy baja, porque la bacteria debe tener antígenos en común con *R. solanacearum* en su pared celular

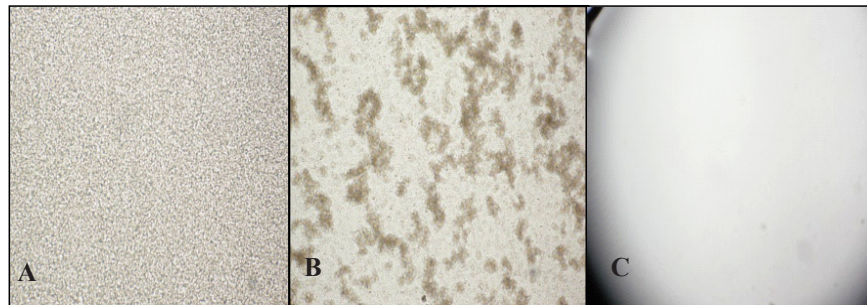


Figura 1. Técnica de microaglutinación en portaobjeto. A: Antisuero conjugado + suspensión de planta sana (testigo negativo). B: Antisuero conjugado + antígeno puro (10^7 UFC/mL). C: Antisuero conjugado + antígeno proveniente extracto de planta enferma (10^7 UFC/mL). Se observa en B y C la reacción de aglutinación de las células bacterianas de *Ralstonia solanacearum* y el antisuero sensibilizado con *Staphylococcus aureus*.

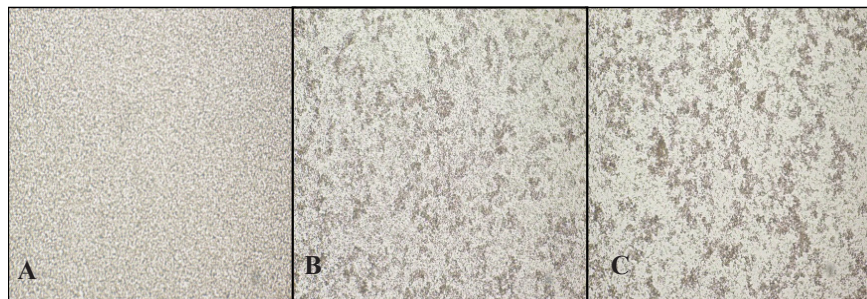


Figura 2. Técnica de microaglutinación en portaobjeto. A: Dilución de antisuero conjugado 1:8 (testigo negativo). B: Dilución de antisuero conjugado 1:8 + antígeno homólogo (10^6 UFC/mL). C: Dilución de antisuero no conjugado 1:8 + antígeno homólogo (10^7 UFC/mL). Se observa la reacción de aglutinación en B de las células bacterianas de *Ralstonia solanacearum* y el antisuero sensibilizado con *Staphylococcus aureus*.



Figura 3. Prueba de especificidad de los antisueros conjugados en microaglutinación en portaobjeto. A: Antisero conjugado (testigo negativo). B: Antisero conjugado + *R. solanacearum* (testigo positivo). C: Antisero conjugado + antígeno heterólogo (*Xanthomonas phaseoli*). Se observa solo reacción de aglutinación en B con células bacterianas de *Ralstonia solanacearum* y el antisero sensibilizado con *Staphylococcus aureus*.

lo cual hace que el antisero reaccione con ella aunque lo haga de forma leve. Cabe recordar que *Ralstonia* era antes considerada una *Pseudomonas* conocida como *Pseudomonas solanacearum* (López, 2004; Gómez, 2005).

Estos resultados indican que se puede utilizar la prueba de microaglutinación en portaobjeto conjugando el antisero a la proteína A de *S. aureus* para la detección de *R. solanacearum* en muestras de plantas de tomate enfermas provenientes de campo.

CONCLUSIONES

Los mejores resultados para la detección de *R. solanacearum*, se obtuvieron cuando en la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se utilizó una dilución del conjugado de 1:20, del antisero 1:2 y 10^6 UFC/ml y para microaglutinación en porta objeto, una dilución de antisero conjugado de 1:16 y poblaciones bacterianas desde 10^4 hasta 10^8 UFC/ml.

La sensibilidad de ambas técnicas permite su utilización para la detección o descarte de la presencia de *R. solanacearum* en muestras de plantas de tomate provenientes de campos.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV), por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto PI-01-7782-2011.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez, E.; A. Iglesia; A. García; E. Blanco. 2008. Optimización de métodos serológicos para la detección de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi. *Rev. Prot. Veg.* 23: 26-31.

Amat, Z.; M. Larrinaga. 1992. Utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en semillas de tomate y pimiento. Congreso Biotecnología La Habana. La Habana, Cuba.

Amat, Z.; G. González; A. Echemendía; C. Font. 1994. Diagnóstico de enfermedades bacterianas y virales en semillas de cultivos hortícolas. IX Fórum de Ciencia y Técnica de Base. INISAV. La Habana, Cuba.

Amat, Z.; A. García. 1997. Utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la detección de *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp en semillas de tomate y pimiento. *Fitosanidad* 1: 4-9.

Clark, C.A.; J.W. Moyer. 1988. Compendium of sweet potato diseases. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, EUA. pp. 6-11

De Boer, S. 1993. Inmunofluorescence for bacteria. In Hampton, R.; Ball, E.; D. De Boer. (Eds.) *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Laboratory Manual.* APS Press. St. Paul, EUA. pp. 295-298.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2004. Norms OEPP. Diagnostic protocols for regulated pests. Bol. 34. European and Mediterranean Plant Protection Organization. París. Francia. pp. 155-180.

Fisac, R. 1991. Serología. In *Manual de Laboratorio. Diagnóstico de Hongos, Bacterias y Nematodos Fitopatógenos.* Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Sanidad de Producción Agrícola. Madrid, España. pp. 313-353.

- Franco, Y. 2005. La microscopía de fluorescencia y su aplicación en el diagnóstico de bacterias fitopatógenas. *Fitosanidad* 9: 65-68.
- García, R.; A. García; L. Delgado. 1999a. Marchitez bacteriana del tomate causada por el biovar 2-A de *Ralstonia solanacearum* en algunas localidades del estado Mérida, Venezuela. *Rev. Forest. Ven.* 43: 183-189.
- García, R.; A. García; L. Delgado. 1999b. Distribución, incidencia y variabilidad de *Ralstonia solanacearum*, causante de la marchitez bacteriana de la papa en el estado Mérida. *Bioagro* 11: 12-23.
- Gómez, E. 2005. Aislamiento, identificación y caracterización del agente causal del moko del plátano, *Ralstonia solanacearum* Raza 2, proveniente de plantaciones afectadas en Colombia. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 93 p.
- Hernández, Y. 2009. Problemática de las enfermedades bacterianas en plantas ornamentales. Identificación y control. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 250 p.
- López, J. 2004. Evaluación del solarizado para el control de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en la aldea El Tempisque, Agua Blanca, Jutiapa. Trabajo de Grado. Universidad de San Carlos de Guatemala. Jutiapa, Guatemala. 56 p.
- Lyons, N.; J. Taylor. 1990. Serological detection and identification of bacteria from plant by the conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. *Plant Pathol.* 39: 584-590.
- Muñoz, C. 1996. Detección de bacterias fitopatógenas en muestras de plantas provenientes de campo y en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) usando la técnica serológica de doble difusión en agar. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 80 p.
- Schaad, N.; S. Sule; J. Van Vuurde; H. Vrugink; A. Alvarez; A. Benedict; L. De Wall; O. Van Laere. 1990. Serology. In Klement; Z.K. Rudolph; D. Sands. (Eds.) *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado. Budapest, Hungria. pp. 153-190.
- Siri, M.; P. Villanueva; L. Quirici; E. Silvera; L. Franco; G. Galván; F. Vilaró; F. Ferreira; M. Pianzola. 2004. Caracterización de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* en Uruguay e implementación de herramientas moleculares para su detección a partir de muestras de suelo y tubérculos. XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa, Valdivia, Chile.
- Stefanova, M.; A. García. 2007. El servicio de diagnóstico de las bacterias fitopatógenas en Cuba: Desarrollo y alcances. *Fitosanidad* 11: 5-10.
- Trujillo, G.; A. Seattler. 1981. Production and characterization of antisera to *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var *fuscans*. Agricultural Experiment Station. Michigan State University. Research Report N° 414. East Lansing, EUA. 7 p.
- Walkey, D.; N. Lyons; J. Taylor. 1992. An evaluation of a virobacterial agglutination test for the detection of plant viruses. *Plant Pathol.* 41: 462-471.