

AAQ4268

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA

Comparación de la variabilidad en el perfil plasmídico y la patogenicidad en Yuca de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* aisladas en los Estados Monagas y Portuguesa.
Trabajo Especial de Grado para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química.

Autor: Diego A. Marval Sahamkow

Tutora: Margarita Rodríguez

Caracas, Mayo de 2005

ACEPTACIÓN DEL TUTOR

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: **Comparación de la variabilidad en el perfil plasmídico y la patogenicidad en Yuca de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* aisladas en los Estados Monagas y Portuguesa** realizado por: el Bachiller Diego Alfonso Marval Sahamkow para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los 27 días del mes de mayo de 2005-05-2005



Dra. Margarita Rodríguez
C.I.: 6.102.052

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme lo más preciado y maravilloso de este mundo como es la vida y permitirme crecer como persona a nivel personal, espiritual y profesional.

A mis hermanos Sergio y Michelle por los momentos inolvidables que hemos vivido; su cariño, comprensión siempre estarán presente en mi.

A la Dra. Margarita Rodríguez por su paciencia y enseñanzas quien me dijo que en ciencia hay que trabajar con dedicación y constancia, y observar las partes de un todo.

A la Dra. María Angélica Santana, por su colaboración con este proyecto, por sus consejos y apoyo en la realización de este.

A Judith Sánchez, por sus atenciones y ayuda, por preocuparse por mi en la realización de esta tesis.

A las técnicas Yhendi García y Susana Ferreira por su colaboración con el proyecto, mil gracias y que Dios se los pague.

A mis compañeros y amigos especialmente a Maritza: las respuestas de la vida llegan directamente de tú propio corazón, gracias por estar allí y aguantar tanto despiste; Ame: Dios te recompensará por todo los combates que has tenido que dar en tan corta vida, gracias por escucharme cuando más lo necesitaba; Vicky: siempre te preocupabas por mi, mil bendiciones, nunca desfallezcas ante las adversidades y sobre todo gracias por tú espontánea sonrisa y a todas aquellas personas que me han ayudado de una u otra forma.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pp
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA:	
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Objetivos de la investigación:	
1.2.1. Objetivo general.....	5
1.2.2. Objetivos específicos.....	5
1.3. Justificación de la investigación.....	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO-REFERENCIAL:	
2.1. Antecedentes de la investigación.....	8
2.2. Bases Teóricas-referenciales:	
2.2.1. Cultivo de yuca.....	9
2.2.2. El género <i>Xanthomonas</i> y factores de virulencia.....	11
2.2.3. Plásmidos como elementos portadores de genes de virulencia y como entes que modifican el contenido genético bacteriano.....	15
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO:	
3.1. Aislamiento y crecimiento de cepas bacterianas:	
3.1.1. Obtención de cepas.....	18
3.1.2. Crecimiento de bacterias.....	19
3.2. Caracterización bioquímica de las bacterias.....	19
3.2.1. Caracterización Bacteriana mediante la reacción a una solución de KOH al 3%.....	20
3.2.2. Prueba de la catalasa.....	20
3.2.3. Hidrólisis de la gelatina.....	20
3.2.4. Hidrólisis del almidón.....	21

CONTENIDO	Pp
3.2.5. Producción de ácido sulfídrico.....	21
3.2.6. Metabolismo de la glucosa.....	21
3.2.7. Reducción de nitratos.....	22
3.2.8. Producción de indol.....	22
3.2.9. Tolerancia a sales.....	22
3.2.10. Fermentación láctica.....	23
3.2.11. Prueba de la oxidasa.....	23
3.3. Poder Patógeno: Pruebas de Hipersensibilidad en cultivos de referencia.....	23
3.3.1. Pruebas de hipersensibilidad en variedades de yuca.....	24
3.4. Aislamiento de ADN plasmídico:	
3.4.1. Método de Kado y Lui.....	25
3.4.2. Método de Chen y Kuo modificado por Boczanczy.....	26
3.4.3. Minipreparación de plásmidos por el procedimiento de Zhou y col.....	26
3.5. Corrida electroforética.....	27
3.6. Visualización de plásmidos y cálculo de sus pesos moleculares.....	27
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	
4.1. Obtención de las muestras.....	28
4.2. Cepas seleccionadas de las diferentes bacteriosis.....	30
4.3. Caracterización bioquímica de los aislados.....	30
4.4. Análisis del contenido plasmídico de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> :	
A. Aislamiento del material extracromosómico.....	33
B. Perfil plasmídico de cepas aisladas en los Estados Monagas y Portuguesa. Bacteriosis del año 2000.....	33
C. Perfil plasmídico de cepas aisladas en el Estado Monagas durante la bacteriosis de los años 2000, 2001 y 2003.....	38

CONTENIDO	Pp
4.5. Pruebas de Patogenicidad:	
A. Respuesta de Hipersensibilidad en cultivos de referencia.....	41
B. Patogenicidad de las cepas de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> en variedades de yuca <i>chaguamalera</i>	46
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CONTENIDO	Pp
Figura 1. Cultivo de yuca.....	10
Figura 2. Fotografía al microscopio de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	11
Figura 3. Manchas angulares producidas por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> sobre hojas de yuca.....	19
Figura 4. Zonas de producción de yuca en Venezuela.....	29
Tabla 1. Pruebas Bioquímicas de los aislados bacterianos de los Estados Monagas y Portuguesa.....	32
Figura 5. Aislamiento de ADN plasmídico.....	34
Figura 6. Comparación del perfil plasmídico de cepas colectadas de la bacteriosis del año 2000 en los Estados Monagas y Portuguesa.....	37
Figura 7. Comparación del perfil plasmídico de cepas colectadas de la bacteriosis detectada en los años 2001, 2001 y 2003 en el Estado Monagas.....	40
Figura 8. Análisis de la respuesta hipersensible (HR) de cepas de <i>Xam</i> en cultivos de referencia.....	42
Figura 9. Respuesta a la inoculación de cultivos de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> en hojas de tabaco.....	43
Figura 10. Patogenicidad de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> en plantas de Yuca variedad <i>chaguamalera</i>	47
Figura 11. Patogenicidad de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> en Yuca a los 7 días de la inoculación.....	48
Figura 12. Patogenicidad de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> en Yuca a los 14 Días de la inoculación.....	49

**UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA**

Comparación de la variabilidad en el perfil plasmídico y patogenicidad en Yuca de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* aisladas en los Estados Monagas y Portuguesa.

Autor: Diego A. Marval Sahamkow

Tutora: Dra. Margarita Rodríguez.

Año: 2005

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta de la familia Euphorbiaceae y es atacado por el agente causal del añublo bacterial o marchitez de la yuca, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. En la presente investigación se desea investigar el perfil plasmídico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) aisladas en dos Estados de alta incidencia de la enfermedad y distantes geográficamente como son los Estados Monagas y Portuguesa. Se aisló material infectado en zonas afectadas por el Añublo Bacterial y se identificó bioquímicamente los aislados de las lesiones para probar su patogenicidad en yuca y cultivos de referencia y determinar el perfil plasmídico. Los resultados obtenidos para esta investigación fueron: 1. Una cierta variabilidad plasmídica, es decir, existe una heterogeneidad plasmídica encontrada en ambas regiones a pesar de que se esperaba encontrar un plásmido en común que no se encontró. 2. Las pruebas de hipersensibilidad en plantas de referencia fueron negativas a las lecturas hechas a las 24 y 48 horas, sin embargo, después de 5 días de inoculados cada una de las cepas se observó una reacción similar a la respuesta de hipersensibilidad, permitiendo así, creer en la existencia de una vía o vías alternas que inducirían la respuesta de hipersensibilidad y 3. Se encontró que las muestras inoculadas en variedades de yuca eran patógenas, sin embargo, 3 de dichas muestras no tenían plásmido alguno. Se concluye por lo tanto, que los plásmidos no son responsables únicamente de la patogenicidad de una bacteria, sino que también estaría involucrado el cromosoma en la patogenicidad de *Xam*.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), es una de las fuentes de alimentos más importantes ya que sus raíces se utilizan para el consumo fresco y en la fabricación de casabe y almidón. Igualmente, el follaje de las plantas ha sido utilizado en otros países como forraje para los animales (Trujillo y col. 1982). Entre los patógenos bacterianos que inducen a grandes pérdidas en el cultivo de la yuca se encuentran *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) causante del añublo o marchitez bacteriana (AB), *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae* y *Erwinia caratovora* que produce la bacteriosis del tallo. El añublo bacterial (AB) fue reportado en Venezuela por Trujillo y col. en 1980 en las regiones centrales y orientales del país y el primer análisis de la diversidad genética de las cepas venezolanas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* fue realizado por Verdier y col. en 1998. Los resultados de Verdier indicaron una alta diversidad genética entre las poblaciones analizadas, coincidiendo estos resultados con los reportados por Elango y Lozano (1981) para estas bacterias aisladas de otros sitios geográficos en Suramérica.

La variabilidad genética de cepas fitopatógenas se ha analizado mediante técnicas moleculares que incluyen: el análisis plasmídico, polimorfismos de ADN por cortes de fragmentos con enzimas de restricción, análisis moleculares del 16S y 23S ARN-ribosomal, entre otros. En la presente investigación se desea analizar el perfil plasmídico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* aisladas en dos Estados con alta incidencia de la enfermedad y distantes geográficamente como son los Estados Monagas y Portuguesa. La variabilidad plasmídica, podría ser una de las causas que proporcionaría la diversidad polimórfica observada en los trabajos de Verdier y col. (1998) razón por la cual se hace necesario aislar material infectado en zonas afectadas por el Añublo Bacterial, conocer e identificar bioquímicamente las bacterias aisladas de las lesiones, probar su patogenicidad en yuca y cultivos de referencia (tomate, tabaco y pimentón, si es que son resistentes) y determinar el perfil plasmídico. En Venezuela, se ha reportado *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en los Estados Anzoátegui, Monagas, Portuguesa y Zulia y nuestro interés en este trabajo se centra en caracterizar el perfil plasmídico de la colección de cepas aisladas en dos de esos Estados (Monagas y Portuguesa) y analizar cepas provenientes de un solo sitio (Edo.

Managas) pero aisladas de brotes repetitivos de la enfermedad aparecidos en los años 2000, 2001 y 2003.

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz), es una planta de la familia Euphorbiaceae y es uno de los cultivos más importantes de las regiones tropicales de Asia, África y América Latina para la producción de carbohidratos; crece en Venezuela en más de 37.000 hectáreas, para una producción anual total de 285.000 toneladas (Verdier y col., 1998). La yuca es un cultivo adaptable a diferentes climas y suelos, con una producción de bajos costos y de variada utilidad alimenticia, factores que han ayudado a que en los últimos años se haya incrementado su cultivo y que constituya unas de las agendas del Ministerio de Ciencia y Tecnología Venezolano.

Las enfermedades de origen bacterial de mayor importancia para el cultivo de la yuca es el añublo bacterial (AB) producido por una bacteria del género *Xanthomonas*; *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam), la cual causa una combinación de síntomas que van desde lesiones angulares, necrosamiento, producción de exudados, hasta producir la muerte de la planta. La enfermedad se manifiesta con tal severidad que puede acabar con el 80% de las plantaciones después de tres ciclos de propagación vegetativa (Lozano, 1986). La caracterización de las cepas patógenas es de vital importancia para definir la naturaleza de la enfermedad ya que la misma puede variar dependiendo de la variedad de cultivo y factores climáticos.

La mayoría de las bacterias fitopatógenas contienen genes de virulencia que pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o en elementos extracromosómicos, los plásmidos. El material extracromosómico que presenta la capacidad de transferencia (conjugación) puede transmitir genes a otros grupos bacterianos (que le permitirían adquirir nuevas propiedades) pudiendo ser una fuente constante de variabilidad. La diversidad genética de los patógenos de plantas se ha estudiado con diferentes técnicas de biología molecular como son: estudios de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) con sondas que permitan analizar la variabilidad; polimorfismos RAPS de ADN amplificado por

PCR con iniciadores (oligonucleótidos cortos, 10 pares de bases) con secuencias arbitrarias (RAPS); Secuencias REP, amplificaciones de fragmentos mediante iniciadores de la PCR homólogos a las secuencias repetitivas del cromosoma procariote (secuencias REP); Ribotipo, análisis de restricción de las secuencias de ARN ribosomal y por último también se ha usado el análisis del contenido plasmídico o el polimorfismo plasmídico.

La presente investigación tiene como fin determinar el material extracromosómico presente en *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* y conocer el flujo horizontal del mismo entre las cepas seleccionadas en regiones con brotes de la enfermedad. Muchos de los genes de virulencia en diversos grupos bacterianos fitopatógenos se encuentran localizados en plásmidos y la presencia de ellos en la población determina la patogenicidad de las cepas. El estudio de la variabilidad genética de cepas venezolanas realizada por Verdier y col. (1998) mediante el patrón polimórfico de fragmentos de restricción (RFLP) demostraron una gran variedad de haplotipos en las cepas analizadas, cuando se usó como sonda un fragmento de 5,4 kb clonado de uno de los plásmidos residentes en *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*; en contraposición a la poca variabilidad observada cuando el RFLP se realizaba con sondas de secuencias repetitivas cromosomales.

Para conocer más sobre el patrón de plásmidos de las cepas aisladas en los Estados Monagas y Portuguesa y relacionar la patogenicidad de las cepas a la presencia de un determinado plásmido que pudiera contener el gen de patogenicidad con homología a *pthB*, se propone analizar por técnicas moleculares el material extracromosómico y determinar su posible variabilidad en las regiones muestreadas. La investigación se llevó a cabo en los espacios del laboratorio de Genética Molecular de la Universidad Simón Bolívar y tuvo una duración de tres trimestres.

1.2. Objetivos de la Investigación

1.2.1. Objetivo General:

Comparar el grado de variabilidad en el perfil plasmídico y la patogenicidad en Yuca de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* de cepas aisladas en los Estados Monagas y Portuguesa.

1.2.2. Objetivos Específicos:

1. Aislar *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* de cultivos de yuca que presentan los síntomas característicos de la enfermedad.
2. Caracterizar bioquímicamente los aislados, mediante la marcha descrita para *Xanthomonas axonopodis*.
3. Aislar el ADN plasmídico y determinar los pesos moleculares de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* con la finalidad de evaluar la posible variabilidad presente en las zonas geográficas muestreadas.
4. Determinar el poder patógeno de los aislados caracterizados en yuca y cultivos de referencia mediante pruebas de hipersensibilidad (HR).

1.3. Justificación de la Investigación

El añublo bacterial de la yuca (AB) ocasionado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* es quizás la enfermedad que ha causado mayor daño al cultivo durante las últimas dos décadas. Las pérdidas causadas por el AB son variables ya que cuando en un terreno limpio se siembran estacas procedentes de una plantación afectada, las pérdidas pueden llegar a ser del 30%; y si las condiciones ambientales favorecen la enfermedad y no se adoptan medidas de control, las pérdidas puede llegar a ser del 80% durante sólo tres ciclos consecutivos (Lozano, 1991).

El uso de estacas afectadas es generalmente responsable de la diseminación de la enfermedad entre plantaciones, debido a la probable supervivencia del patógeno entre una

establecer su posible variabilidad, también se pretende identificar como fluye el contenido

extracromosómico entre los diferentes aislados y correlacionar si en patógenos aislados de diferentes áreas geográficas o de una misma área se mantiene el mismo patrón plasmídico durante los años en que se reportaron focos de infección. Se quiere conocer si hay o no variabilidad en el material extracromosómico ya que muchas bacterias fitopatógenas deben esta propiedad a genes presentes en plásmidos como es el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia amylovora* (Xu y González, 1991). Por otro lado, existen genes de avirulencia (*avr*) que se encuentran localizados en plásmidos que constituyen los elementos de patogenicidad de muchos fitopatógenos bacterianos, esos genes son denominados *avr* ya que desencadenan una reacción de resistencia (reacción de hipersensibilidad, HR) en el hospedero resistente, pero provocan la enfermedad en el hospedero sensible. Uno de esos genes con homología molecular al gen *pthB* fue aislado de un plásmido presente en *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Restrepo y Verdier, 1997) y fue la sonda para revelar los RFLP que le permitió concluir la variabilidad genética de las cepas en el trabajo de Verdier y col. (1998).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO-REFERENCIAL

2.1. Antecedentes de la investigación

Verdier y col., en 1993 estudiaron cepas de 22 países con la finalidad de detectar y evaluar la relación evolutiva y genética dentro de los patovares de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*; en el cual usaron para este estudio la metodología de fragmentos de enzimas de restricción (RFLP); utilizaron sondas de genes de ARNr de *Escherichia coli* y tres fragmentos de restricción para el ADN cromosomal y plasmídico de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. La variabilidad en las cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* en América del Sur fue pronunciado. Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron que este patógeno fue introducido recientemente en África y además las cepas africanas todavía no tienen una diversidad significativa al de los niveles cromosomales (Verdier y col., 1993).

En 1997 estos investigadores estudiaron la diferenciación geográfica de la población de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) en Colombia, se analizaron los polimorfismos de ADN mediante la metodología de fragmentos de enzimas de restricción (RFLP), usando para ello una secuencia de ADN plasmídico que llamaron *pthB* de Xam con la finalidad de estimar las relaciones genéticas entre 189 cepas colombianas. Las diferentes muestras les permitió apreciar la diferenciación genética dentro y entre las zonas climatológicas. Los análisis realizados indicó que la población de Xam en Colombia mostraban un alto grado de diversidad con respecto a estudios anteriores (Verdier y col., 1997).

Posteriormente en 1998, Verdier y colaboradores realizaron en Venezuela los estudios sobre la variación patogénica y genética de Xam y se llegó a encontrar un alto grado de polimorfismo existente entre los aislados. Se recolectó al igual que el estudio anterior 91 muestras de zonas diferentes con incidencias de la enfermedad; para ello utilizaron la metodología de RFLP para evaluar los polimorfismos de ADN a través de una sonda de origen

En nuestro país se han reportado como patógenos de yuca: *Botrydiploidia* sp., que causa pudrición radicular, *Botrytis* sp., causa podredumbre gris en los tallos y hojas; *Cercospora caribea*, causa manchas blancas en las hojas inferiores de la planta; *Cercospora henningsii*, mancha foliar; *Helminthosporium manihotis*, manchas negras en los bordes de la hoja; *Erysiphe* sp. (oidium), mancha polvorienta en hojas y tallos; *Rhizoctonia solani*, pudrición de tallos y raíces; *Uromyces janiphae*, mancha foliar roja, todos ellos son hongos. También en los últimos años ha encontrado el hongo *Sphaceloma* atacando los cultivos de yuca. En cuanto a los patógenos virales se ha reportado el mosaico de la yuca (Trujillo y col, 1982) y entre el grupo bacteriano el *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, que produce el añublo bacteriano en la yuca (AB) que afecta a hojas, ramas, tallos; en las hojas producen un aspecto acuoso y posterior necrosamiento de la misma, en ramas causa una muerte regresiva y en el tallo se observan canchros y la brotación es muy pobre y las escasas ramas que se originan presentan síntomas de marchitamiento (Montaldo, 1996).

Otro fitopatógeno bacteriano que produce daños en las plantaciones de yuca es *Erwinia caratovora*, que fue descubierta por primera vez en Uganda en 1938 ya es la causante de la bacteriosis del tallo, las manchas foliares y las defoliaciones en plantas de yuca. Posteriormente se describió en Colombia en los años 1976 y 1977, causando marchitez en los cogollos de las plantas y necrosis en la zona medular del tallo seguida por muerte regresiva y formación de canchros en las partes lignificadas del tallo. En Venezuela, la pudrición bacteriana del tallo de la yuca fue señalada inicialmente en 1979, luego en los años 1982 y 1984, determinándose que el agente causal es una bacteria perteneciente al género *Erwinia*, pero no se dieron pormenores de sus características (Guevara y col., 1992)



Figura 1. Cultivo de yuca. Tomado de Lozano, 1991.
En <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/index.html>.

2.2.2. El Género *Xanthomonas* y factores de virulencia

Las bacterias del género *Xanthomonas* son bacterias Gram-negativas del tipo bastoncillo cuyos extremos están ligeramente redondeados y presentan un flagelo polar. *Xanthomonas* son bacterias aeróbicas estrictas, con reacción positiva a la catalasa y usan una gran variedad de hidratos de carbono (Holt, 1994). Este género se subdivide en siete taxas básicas: *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. maltophilia*, *X. oryzae* y *X. populi* (Swings y col., 1993). Las colonias del género *Xanthomonas* son normalmente amarillentas por la presencia del pigmento Xanthomonadina, siendo la excepción *Xanthomonas axonopodis* que se presenta con un color cremoso blanquecino.

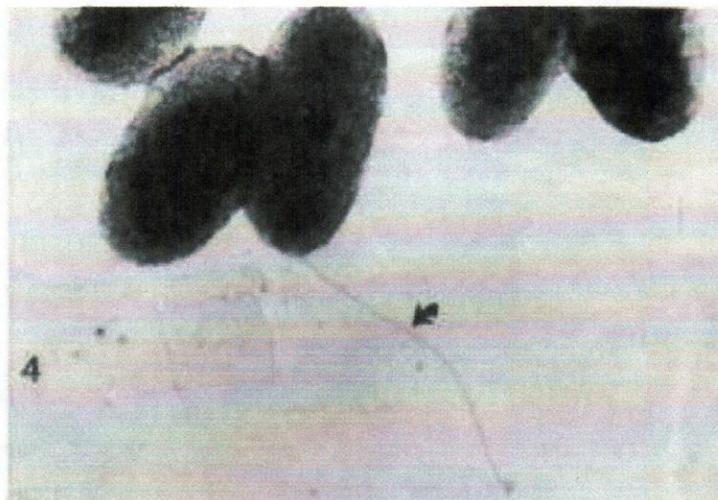


Figura 2. Fotografía al microscopio electrónico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Tomado de Trujillo y col. 1982. En <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/index.html>.

Factores de Virulencia en *Xanthomonas*

Los factores de virulencia son metabolitos secundarios, producidas por las bacterias Gram-negativas que inducen síntomas característicos en el huésped (Alfano y Collmer, 1996). Entre los factores de virulencia descritos para *Xanthomonas* se encuentran: polisacáridos

extracelulares, enzimas extracelulares o exoenzimas, genes *hrp* que conforman el sistema de transporte tipo III y los genes *avr* (Swings y col., 1993).

Polisacáridos extracelulares

Los polisacáridos extracelulares (EPS) son sustancias gomosas llamada xantanos y están compuestos esencialmente por levanos, alginatos, lipopolisacáridos y proteínas, unidades de celulosa y la alternancia de residuos de trisacáridos formados por cadenas laterales de manosa, ácido glucurónico y manosa, fueron estudiada por primera vez en variedades mutantes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. (Swings y col., 1993). Los EPS parecen estar implicados en el mantenimiento del "water-soaking" y previniendo el reconocimiento bacteria/planta al enmascarar algunos receptores bacterianos, cambios en la utilización de carbohidratos y restricción del movimiento del agua bloqueando los vasos del xilema (Carzola, s/f).

Enzimas extracelulares o exoenzimas

Las *Xanthomonas* poseen ciertas enzimas extracelulares o exoenzimas que cumplen con determinadas funciones, cada una de ellas tienen la capacidad de degradar los diversos componentes del tejido vegetal. Entre ellas tenemos: (a) proteasas: enzimas responsables de digerir la β -caseína; (b) pectinasas: son las encargadas de degradar la pectina; (c) gluconasas: Enzimas cuya actividad es intracelular y extracelular, sin embargo, no se ha demostrado la función que tiene dicha enzima, pero se ha demostrado que tiene un papel importante en la patogenicidad; (d) amilasas: tienen la habilidad de producir una actividad amilasa (Swings y col., 1993).

Sistema de Transporte tipo III

Genes *hrp*

Los genes llamados *hrp* comprenden aproximadamente 20 genes y se ubican en grupos cromosomales de 25 Kb; dichos genes han sido encontrados y caracterizados en cuatro

fitopatógenos Gram-negativos como son: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Se ha dividido en dos grupos basados en la posesión de genes similares, estructuras de operones y sistemas regulatorios, muchos de los genes *hrp* parecen ser completamente diferente entre los dos grupos. El primer grupo contiene proteínas de membrana externa, en la cual una de ellas con homología a la familia secretin (transportadores) y algunas lipoproteínas conservadas y el segundo grupo incluye proteínas de membrana similares al componente del flagelo (Alfano y Collmer, 1997).

Genes *hrc*

Son nueve genes conservados en ambos grupos que codifican para componentes del sistema de transporte tipo III que se encuentran en patógenos animales y plantas. Estos conforman las proteínas del sistema que se anclan en la membrana externa e interna y comparte similitud en sus secuencias con los componentes del flagelo (Alfano y Collmer, 1997)

Genes *avr*

Los genes de avirulencia (*avr*) han sido descrito para todas las especies del género *Xanthomonas* por su característica interacción raza-específica en la complementaridad "gen a gen". En muchas interacciones, la respuesta a la resistencia es controlado por un gen *avr* de el patógeno y un gen correspondiente de resistencia en el huésped, es decir, dichos genes cumplen la función de inducir dicha resistencia (Alfano y Collmer, 1996).

Harpinas

Son proteínas de bajo peso molecular, estables al calor, ricas en glicina, no presentan cisteínas y producen necrosamiento del tejido cuando se inyectan en plantas resistentes (non host plants) (Alfano y Collmer, 1997).

Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad presentan las siguientes características: contienen en su mayoría genes de virulencia; están presentes en cepas patogénicas; el contenido de guanina-citosina es diferente al del hospedero; ocupan grandes regiones del cromosoma bacteriano (>30 Kb) y representan unidades compactas (Alfano y Collmer, 1996).

Las bacterias fitopatógenas de los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Ralstonia* causan diversos, y a veces devastadoras enfermedades en muchas plantas y todas ellas tienen en común dos características:

1. El patógeno coloniza el espacio intercelular de las plantas, ya que son capaces de introducirse al interior de las células, puesto que poseen genes del sistema de transporte tipo III que constituyen el sistema Hrp (reacción hipersensitiva y patogenicidad) y determinan la reacción de hipersensibilidad o muerte celular programada en el sitio de la infección.
2. En las plantas, las bacterias producen diversos síntomas después de varios días de multiplicación activando en la planta de manera rápida la defensa o reacción de hipersensibilidad (HR). Los niveles del inóculo típicamente encontrados en ambientes naturales, producen la muerte de las células en la planta que se esparcen dentro del tejido saludable con éxito; sin embargo, si se introduce experimentalmente inóculos en altos niveles ($>10^6$ células/ml) los resultados obtenidos muestran la muerte notable del tejido infiltrado, usualmente a las 24 h o 48 horas produciendo una necrosis que se denomina respuesta de hipersensibilidad (HR) (Alfano y Colmer, 1997).

La reacción de hipersensibilidad (HR) es un mecanismo de defensa por parte de la planta y esto suele ocurrir solamente cuando existen combinaciones incompatibles entre plantas hospedantes y patógenos como hongos, bacterias, virus y nemátodos. Una parte importante de la respuesta de hipersensibilidad (HR) es la limitación resultante que puede ocurrir si el patógeno posee uno de los muchos genes posibles del tipo *avr* (avirulencia), y el producto de ellos son neutralizados por los genes del tipo R (resistencia) que actúan

recíprocamente en la planta. Tal reacción entre los productos de los genes *avr* del patógeno y los productos de los genes de resistencia de la planta ("interacción gen a gen") interacciona produciendo reconocimiento de la bacteria y la activación de las defensas de la planta (Alfano y Colmer, 1997).

Para que los genes *avr* puedan ser transportados a la planta se requiere de la presencia del pilus que conforma el sistema de transporte tipo III. Los genes (*avr*) junto con los genes *hrp* se definieron originalmente en base a los fenotipos que la bacteria confiere y que actúa recíprocamente con las plantas. Los estudios moleculares han revelado una relación funcional entre los productos de estas dos clases de genes y una subyacente similitud con un importante sistema de virulencia de varios patógenos animales como son: *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* que transfieren proteínas efectoras de virulencia dentro de las células animales directamente vía sistema de transporte tipo III. Igualmente, los patógenos de plantas usan el sistema de transporte tipo III para transferir proteínas efectoras de virulencia al interior de las células de la planta (Alfano y Colmer, 1997).

2.2.3. Plásmidos como elementos portadores de genes de virulencia y como entes que modifican el contenido genético bacteriano.

Los plásmidos son moléculas circulares de que se replican autónomamente y la mayoría de ellos presentan genes que le confieren la capacidad de producir el pili que permite la transferencia del plásmido a otras bacterias mediante el contacto célula-célula, a través de un proceso conocido como conjugación bacteriana. La conjugación bacteriana permite así la modificación del contenido genético bacteriano y la posibilidad de que exista variabilidad genética en la población bacteriana (Griffith y col., 1993).

La evolución bacteriana es influenciada por las características y interacciones de tres tipos distintos de secuencias en el ADN: el cromosoma, los plásmidos y los elementos móviles. La información genética de una bacteria está contenida generalmente en una molécula larga y circular que constituye el cromosoma o nucleoide, y el resto de la información se encuentra en

un número variable de elementos genéticos como son los plásmidos y los elementos móviles como: integrones, retrones, transposones e islas de patogenicidad. El cromosoma es el almacén para muchos genes esenciales y evoluciona de manera lenta a través de efectos de mutación, recombinación y selección. Los plásmidos pueden ser considerados como un "ADN egoísta" porque tienen la habilidad de autoreplicarse y perpetuarse independientemente del cromosoma y capacitan a la bacterias con genes que suelen darle una ventaja adaptativa (Coplin, 1989).

En las bacterias los plásmidos generalmente hacen movimientos horizontales de genes, permitiendo aumentar el número de copias en una población, ofreciendo así un mecanismo de variabilidad a través de la introducción de genes diferentes o rasgos totalmente nuevos (Coplin, 1989). Los plásmidos pueden tener un gen o varios genes que determinan la virulencia en un patógeno y generalmente son específicos para uno o varios tipos relacionados de plantas hospedantes. Asimismo, los genes que hacen que una planta hospedante sea susceptible a un determinado patógeno sólo existen en esa planta y quizá también en algunos tipos relacionados de plantas hospederas. Por lo tanto, lo que determina el inicio y desarrollo de las enfermedades en las plantas es la presencia e interacción de genes específicos que determinan la virulencia en el patógeno y la susceptibilidad en la planta hospera (Agrios, 1999).

En muchas bacterias fitopatógenas se han descrito plásmidos con diferente pesos moleculares, siendo muchos de ellos crípticos, es decir, sin función conocida. Sin embargo, en el caso de *Agrobacterium* es el plásmido Ti el responsable de las tumoraciones encontradas en raíces y tallos. En *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* y pv. *tomato*, ciertos genes de avirulencia (*avr*) se encuentran en algunos de los plásmidos presentes en las cepas patogénicas y en *Raltonia solanacearum* los genes del sistema de transporte tipo III se encuentran en el megaplásmido que presentan todas las cepas patogénicas. El estudio de la virulencia y patogenicidad de los fitopatógenos bacterianos no se puede, en la mayoría de los casos, desligar del estudio de su material extracromosómico por las razones antes descritas (Llácer y col. 2000).

Se han realizado trabajos de caracterización de perfil plasmídico de varios grupos bacterianos como son: *Erwinias*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, etc., que han permitido clarificar posibles relaciones filogenéticas o taxonómicas entre patovares de un grupo de especies. Por ejemplo, Xu y González (1991), aislaron plásmidos con la finalidad de estudiar la diversidad de ADN plasmídico, genómico y las bacteriocinas en cepas de *X. campestris* pv. *oryzae* (*X. c. oryzae*) en Estados Unidos pudiendo encontrar la existencia de diversidad entre las cepas *X. campestris* pv. *oryzae*. Sin embargo, el rol de muchos plásmidos en bacterias fitopatógenas es todavía desconocido.

Posiblemente los plásmidos evolucionaron con el huésped al punto de que son estables y característicos de una unidad taxonómica particular. Esto ha permitido que bacterias como *Erwinia stewartii*, *Erwinia amylovora*, hallan encontrado un plásmido en común en todas las cepas encontradas.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Aislamiento y crecimiento de cepas bacterianas

3.1.1. Obtención de cepas.

El material en estudio fueron hojas con lesiones que se recogieron en campo y se trasladaron en bolsas plásticas guardándose posteriormente en nevera (4°C) hasta su procesamiento. Para aislar las bacterias se tomó una pequeña porción de la lesión (porción con aspecto acuoso o aceitoso), se cortó con un bisturí y con una pinza estéril se colocó en una cápsula de Petri conteniendo 2 ml de buffer ATF 1X estéril (conteniendo por litro: 8 g de NaCl, 0.4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2.4 g de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, a pH 7.0) y se procedió a dilacerar el tejido; la suspensión resultante del extracto se diluyó 1/100 en AFT (1X) y se sembró con el asa de inoculación en placas de Petri conteniendo medio semi-selectivo (estéril) para la selección de las cepas Xam según el protocolo de Shaad y col. 2000. El medio semi selectivo conocido como agar cefalin trealosa (CTA) contiene por litro 3 g de K_2HPO_4 , 1 g de NaH_2PO_4 , 0.3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 g de NH_4Cl , 9 g de D(+) trealosa, 1 g de glucosa, 1 g de extracto de levadura y 14 g de agar (Fessehaie y col., 1999).

Los tipos bacterianos claramente separados (colonias individualizadas) se inocularon de nuevo en medio LB líquido (Luria-Bertami, conteniendo por litro: 10 g de bacto triptona, 5 g de NaCl y 5 g de extracto levadura, a pH 7,2) hasta alcanzar el estadio estacionario, parte de la muestra se tomó para preparar los stocks de criopreservación (30% concentración final de glicerol estéril) para mantenerlos a -80 °C y el resto del cultivo fué usado en la marcha bioquímica para la caracterización de las colonias que pertenecen al grupo *Xanthomonas axonopodis* según el manual Bergey's.

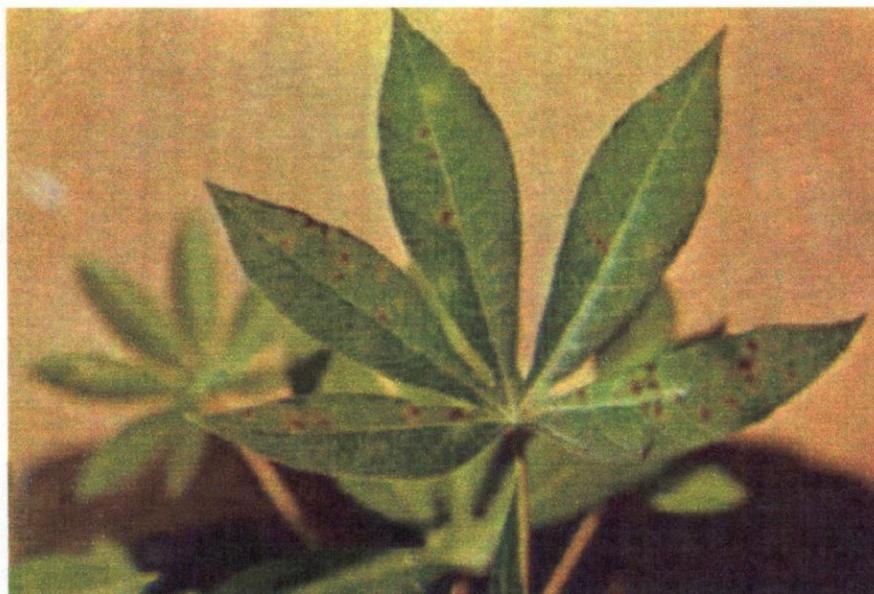


Figura 3. Manchas angulares producidas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* sobre hojas de yuca. Tomado de Marcano y col., 1982.

3.1.2. Crecimiento de bacterias

Las colonias de la colección, preservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se dejaron por un tiempo a temperatura ambiente y se tomó un inóculo para recrecerlas en placas de medio LB-agar (medio Luria-Bertami conteniendo 1,5% de agar para su solidificación) o en LB líquido cuando se usaban los cultivos en etapa exponencial tardía (Maniatis y col. 1982). Los cultivos se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas, con o sin agitación, dependiendo de la condición física del medio.

3.2. Caracterización bioquímica (marcha bioquímica) de las bacterias aisladas

Con el objeto de caracterizar las cepas Xam se utilizó la marcha bioquímica referida en la literatura que comprende la reacción del KOH (3%) para la caracterización Gram y las pruebas bioquímicas de catalasa, hidrólisis de la gelatina y del almidón, producción de H_2S ,

metabolismo de la glucosa, reducción de nitratos, tolerancia máxima a NaCl, producción de indol, prueba de la oxidasa, fermentación láctica (litmus milk) (Mac Faddin, 1976).

3.2.1. Caracterización Bacteriana mediante la reacción a una solución de KOH al 3%:

El ensayo se realizó con el fin de diferenciar bacterias Gram-negativas, para lo cual se tomó una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 3% (v/v) y una asada de cada una de las cepas se disolvió sobre una gota del reactivo. La reacción positiva se observó cuando la mezcla viscosa permitió la formación de un hilo entre la solución y el asa de Henle indicando que la cepa es Gram-negativa. Este método se basa en la disolución de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas por la acción del KOH y la liberación de su ADN el cual forma el compuesto viscoso (Manual de laboratorio de bacterias, virus y nematodos, 1991).

3.2.2. Prueba de la catalasa:

Para la prueba de la catalasa se crecieron las colonias en LB-agar (en estrias) y un inóculo se colocó sobre una gota de peróxido de hidrógeno al 30% que previamente se dispensó sobre un porta objeto. La mezcla de la muestra bacteriana con el peróxido produce burbujas de oxígeno, lo que indicó la presencia y reacción de la enzima catalasa.

3.2.3. Hidrólisis de la gelatina:

Se prepararon tubos conteniendo 10 ml de medio gelatina (3 g de extracto de carne, 5 g de peptona y 120 g de gelatina para un litro de medio a pH 6,5). Este medio se calentó, se mezclaron bien los ingredientes y se dispensó en tubos para su esterilización en autoclave a 121°C y 15 lb durante un tiempo máximo de 16 minutos. El cultivo de cada cepa se inoculó por picadura se dejó en incubación a 30 °C de 7 a 14 días y la reacción positiva se obtuvo al mantenerse la licuación de la gelatina aun cuando se colocaran los tubos a 4 –o 5° C durante 30 minutos.

3.2.4. Hidrólisis del almidón:

Las bacterias se inocularon por estrías en agar nutritivo conteniendo almidón soluble al 0,2%. Luego de tener un crecimiento confluyente de 7-15 días se cubrió una parte del crecimiento bacteriano con una solución de lugol y se consideró una reacción positiva la formación de zonas claras debajo o alrededor del crecimiento bacteriano, en contraste con las zonas oscuras del resto del medio. Esa reacción indicó la hidrólisis del almidón por la acción de la enzima β -amilasa. De observarse sólo una zona rojiza el ensayo se consideró negativo ya que el almidón habría sido hidrolizado parcialmente (reacción de enzima α -amilasa).

3.2.5. Producción de ácido sulfhídrico (H_2S)

La producción de ácido sulfhídrico a partir de compuestos orgánicos-azufrados constituye un carácter diferencial para algunos géneros de *Xanthomonas* y *Erwinias*. Se prepararon cuñas (medio solidificado con una cierta inclinación en tubos) conteniendo 10 ml de medio Kligler (un preparado comercial que contiene nutrientes, sulfato ferroso y un indicador (rojo fenol) que produjo cambio de color al medio. Las cuñas se inocularon por punción y en superficie con un cultivo recrecido en LB-líquido por 24-48 horas a 30°C. Se tomó como reacción positiva la aparición de un precipitado de coloración marrón a negra, lo que indicó la producción de ácido sulfídrico en presencia de hierro ($FeSO_4$).

3.2.6. Metabolismo de la glucosa:

Se prepararon tubos con 10 ml de medio de fermentación de glucosa conteniendo peptona, NaCl, fosfatodibásico de sodio, fosfato de potasio, glucosa, azul de bromotimol y agar comercial. Se le colocó a cada tubo un tubo Durham invertido de forma tal que al colocarlo no le queden burbujas y se procedió a la esterilización. Se inocularon los tubos con cultivos frescos y se recrecieron por 24-28 horas a 30 °C. Se leyó la reacción y se observó la producción de gas en el tubo Durham y el cambio de color del medio. Se consideró una

reacción positiva cuando el cambio de color se daba de rojo a amarillo y había burbujas en el tubo Durham. La reacción con un color naranja se consideró negativa.

3.2.7. Reducción de nitratos:

Se preparon tubos con 5 ml de caldo nitrato (conteniendo por litro: 3 g de extracto de carne, 5 g de peptona y 1 g de nitrato de potasio todo ajustado a pH 7,0) y cada tubo se inoculó con un cultivo recrecido en LB y se incubó por 48 horas a 30°C. Luego de la incubación se le colocó a cada tubo unas gotas de un reactivo compuesto por ácido sulfanílico al 0,8% p/v y dimetil-alfanaftilamina. La reacción se consideró positiva cuando el reactivo viró a rojo aproximadamente a los 30 segundos de lo contrario la reacción era negativa.

3.2.8. Producción de indol:

La prueba permite identificar aquellas bacterias que tienen la capacidad de degradar el triptófano ya que al descomponerse este compuesto se origina indol cuya presencia se pondrá de manifiesto por medio de reactivo de Erlich. Se preparon tubos conteniendo 10 ml de caldo triptico (conteniendo por litro: 20 g de triptosa, 1 g de dextrosa, 2 g de fosfato dibásico de potasio, 1 g de nitrato de potasio y 1 g de agar, ajustado a pH 7,2). Cada tubo se inoculó con cultivos recrecidos en medio LB líquido y se incubó por 48 horas a 30°C. Luego se le agregó a cada tubo 1 ml de éter y se dejó deslizar por las paredes del tubo unas gotas del reactivo de Erlich. La formación de un anillo marrón se consideró una reacción positiva, siendo negativa si el color del anillo es amarillo o no se detectó cambio de color .

3.2.9. Tolerancia a sales:

La capacidad que tienen las bacterias de crecer en medios conteniendo diferentes concentraciones salinas se utiliza en procesos de identificación. Para comprobar esta tolerancia, se preparó medio LB añadiendo la concentración deseada de NaCl (1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%); una vez diluida la sal en el medio, se distribuyó en tubos, se esterilizaron en

autoclave a 121°C durante 15 min y se inocularon. Los cultivos se dejaron incubar en agitación por 48 horas y el crecimiento bacteriano en la más alta concentración se tomó como el % de tolerancia.

3.2.10. Fermentación láctica (litmus milk):

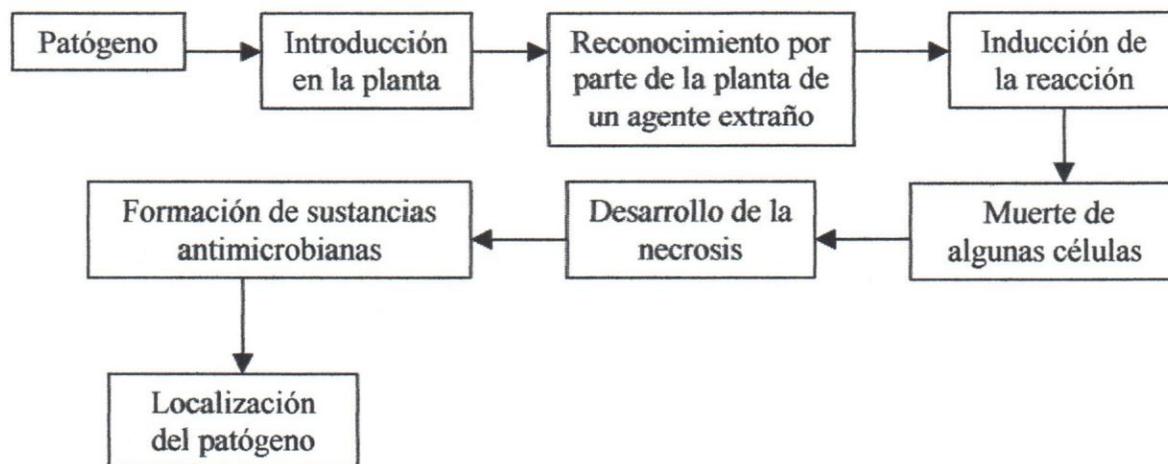
La prueba de la fermentación láctica sirvió para determinar la acción de la bacteria sobre la leche. Se prepararon tubos conteniendo por litro 100 g de Bacto Skim milk y 0,75 g de Bacto litmus. Cada tubo se inoculó con cultivos recrecidos en medio LB líquido y se incubó por 48 horas a 30°C.

3.2.11. Prueba de la oxidasa

Para la prueba de la oxidasa se crecieron las colonias en LB-agar (colonias individuales), se tomó una asada y se se esparció en el papel de filtro Whiterman para añadirle posteriormente el reactivo de Kovac. La reacción se tomó como positiva por el cambio de color de cremoso a púrpura lo cual permite diferenciar metabolismos fermentativos del oxidativo de hidratos de carbono en bacterias Gram negativas.

3.3. Poder Patógeno: Pruebas de Hipersensibilidad

Todas las plantas se protegen de la invasión de cualquier microorganismo extraño por la reacción de hipersensibilidad (HR). Esta es una forma que tienen las plantas para defenderse del ataque de ciertos patógenos, existiendo un sistema incompatible huésped/patógeno (Manual de laboratorio de bacterias, virus y nemátodos, 1991) que puede resumirse en pasos presentados en el siguiente esquema:



Para determinar la prueba de hipersensibilidad se preparó una suspensión bacteriana en medio LB líquido que se dejó crecer en agitación por 16 h. Se tomaron 4 ml de la muestra y se introdujo, sin burbujas ni aire, en una jeringa de inoculación provista de aguja hipodérmica estéril y se inyectó en la nervadura de la planta, procurando no romper la hoja y que no saliera la suspensión. El procedimiento se repitió para cada cepa inoculando en los tres cultivos de referencia: tabaco, tomate y pimentón. La reacción se observó a las 24 y 48 horas, luego de ese tiempo si no se observaba la reacción de necrosamiento la reacción se consideraba negativa.

3.3.1. Pruebas de Hipersensibilidad en variedades de yuca

Se tomaron plantas de yuca de la variedad *Chaguamalera* y se inoculó 1 ml de cultivo bacteriano que se crecieron en LB líquido por 24 horas. Con agujas hipodérmicas se les hicieron punciones y halos a las hojas de las plantas de yuca. Una vez hechas las lesiones se procedió a la inoculación de las bacterias en las lesiones agregando 20 μ l de cultivo en cada lesión y se tomaron lecturas a las 24 horas, 7 días, 14 días y 30 días. Por último se colocó las plantas en una incubadora Lab-Line Ambi-Hi-Lo marca Chamreb que sirvió como incubadora con condiciones de fotoperíodo de 34/25 °C (temperaturas día/noche) y con suficiente agua en bandejas que permitieron una relativa humedad.

3.4. Aislamiento de DNA plasmídico.

Se probaron diferentes protocolos descritos en la literatura que contemplan diferentes detergentes y condiciones de lisis bacteriana y se utilizó el que permitió una mejor resolución.

3.4.1. Método de Kado & Lui (1981)

Se recrecieron las cepas en medio LB por 16 horas a 30°C con agitación y se centrifugaron 3 ml del cultivo por 3 min a 14.000 revoluciones por minuto (rpm), se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió vigorosamente en 500 µl de una solución 1 M de NaCl estéril para eliminar los exopolisacáridos de las células. Las células se dejaron por 10 minutos en esa solución y se le aplicó vortex dejando intervalos de tiempo entre cada aplicación, luego se centrifugó (se eliminó el sobrenadante) y se lavó el pellet de nuevo con igual volumen de 1X AFT (conteniendo por litro: 8 g de NaCl, 0.4 g NaH₂PO₄ (2 H₂O), 2.7 g de Na₂ HPO₄ 12 H₂O, ajustado todo a pH 7.0). Luego de los lavados se centrifugó de nuevo, se descartó el sobrenadante y el remanente de AFT (1X) que queda con el pellet se usó para resuspenderlo por vortex. Las células resuspendidas se mezclaron suavemente al irle agregando 200 µl de la solución de lisis (3% SDS, 50 mM Tris base a pH 12,4). Se incubó la mezcla a 60°C por 30 minutos (chequeando la lisis) y se colocó rápidamente sobre hielo. A la mezcla (de aspecto viscosa) se le añadió 200 µl de cloroformo y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo por lo menos 50 veces, hasta que tomó una apariencia blanquecina; luego se centrifugó y se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf.

Para la precipitación del ADN se le agregó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol frío al 100 %, luego se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70 % para eliminar restos de sales; posteriormente se secó el pellet a temperatura ambiente y se disolvió el ADN en el menor volumen (30-50 µl) de agua destilada estéril o en buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA a pH 8,0).

3.4.2. Método de Chen & Kuo (1993) modificado por Boncsanczy 2000

Se recriaron las cepas en 5 ml de cultivo LB y se incubaron en agitación por 16 horas a 30°C. Del cultivo recriado se tomó 3 ml y se centrifugó por 2-3 min a 14.000 (rpm) y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió vigorosamente en 500 µl 1M NaCl para eliminar los exopolisacáridos y se labaron en AFT 1X como se describió en el protocolo anterior. Posteriormente se resuspendió el pellet con el remanente de AFT 1X y se le agregó 300 µl de solución STET (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 5% Triton X-100) más 20 µl de lisozima (10 mg/ml) y 1 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó en un baño a 37°C, chequeando constantemente la lisis celular. Cuando se tenía problemas con la lisis celular se le agregaba a cada tubo 1 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubaba a 55°C por 1 hora. Al detectarse la lisis celular se le añadía 1/3 (100 µl) del volumen de 5 M NaCl y se centrifugaba para separar los restos celulares y el sobrenadante se transfería a un nuevo tubo y se añadía 400 µl de cloroformo, mezclando suavemente hasta que se formara una suspensión de aspecto lechoso; después se centrifugaba para separar las dos fases y se transfería la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. El ADN se precipitó agregándole 2 volúmenes de etanol frío al 100% como se indicó anteriormente.

3.4.3. Minipreparación de plásmidos por el procedimiento de Zhou et al., 1990.

Se recriaron las muestras en 5 ml de medio LB líquido y se incubaron en agitación a 30°C por 16 h. Del cultivo ya crecido se tomó 1,5 ml y posteriormente se colocaron en tubos eppendorf se centrifugaron por 2 ó 3 minutos a 14.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Luego el pellet se resuspendió con el poco sobrenadante que quedó y posteriormente a cada tubo se añadió 300 µl de buffer TENS (1M Tris.CL pH 8,0, 0,5 M EDTA, 10 N NaOH, 10% SDS) y se invirtió el tubo por unos 10 min favoreciendo que se mezclaran los componentes. Una vez que las muestras estuvieron lisadas se le agregó 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,2, se mezcló bien y se centrifugó por 3 min. Después el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se añadieron 300 µl de fenol-cloroformo (24:1 v/v) y se invirtió

nuevamente por unas 60 veces hasta que la mezcla tomó un aspecto lechoso, posteriormente se centrifugaba por 10 min y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Se le añadió 900 μ l etanol al 100% y se esperó unos 10 min para tener una mejor precipitación del ADN plasmídico y se centrifugó a 14.000 rpm. Se descartó el etanol y se lavó con etanol al 70% por 10 min y después se resuspendió en pellet en agua destilada estéril o buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA a pH 8,0).

3.5. Corrida electroforética

Las corridas electroforéticas se realizaron en cámaras horizontales utilizando una fuente de poder Bio-Rad. Los geles se prepararon con buffer TAE 1X (0.04 M Tris Base; 0.001 M EDTA pH 8.0) y agarosa al 0,5 %. La mezcla se calentó hasta ebullición hasta asegurarse que la agarosa estuvo fundida, luego se dejó enfriar hasta 50°C, se le añadió 4 μ l de la concentración stock de bromuro de etidio y por último se sirvió en la bandeja (a la que previamente se le colocó el peine para formar los bolsillos de carga) hasta lograr un grosor de gel de aproximadamente 0,5 cm y se dejó gelificar.

3.6. Visualización de plásmidos y cálculo de su pesos moleculares.

La corrida electroforética se fotografió a través de la cámara Bio Rad Quantity One, mediante el transiluminador de luz ultravioleta. Sobre la foto se obtuvieron las migraciones (distancias) de cada uno de los aislados y para determinar sus pesos moleculares se comparó las distancias migrada con el patrón de corrida de plásmidos (de peso molecular conocido: 166.6, 71.4, 40.6 y 7.8 Kb respectivamente de la cepa 39R861 de *Echerichia coli*) que se usó como control en cada una de las corridas y λ *Hind* III cuyos pesos moleculares eran 23.13, 9.42, 6.55, 4.36, 2.32, 2.07 y 0.56 Kb. Se calcularon los pesos moleculares con el programa DNA- frag.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de las muestras.

El laboratorio cuenta con una colección de muestras aisladas de las diferentes zonas del país con producción de yuca, donde se ha reportado la bacteriosis del añublo bacterial. Las zonas con mayor incidencia del añublo bacterial son los Estados: Anzoátegui, Cojedes, Monagas, Portuguesa y Trujillo (figura 4). La colección se formó de muestras aisladas en los años 2000, 2001 y 2003 y de ellas se tomaron para este trabajo 6 muestras del año 2000 aisladas del Estado Monagas y 6 muestras del Estado Portuguesa para estudiar la distribución plasmídica de brotes ocurridos en zonas separadas geográficamente. Por otro lado, para comparar el perfil plasmídico de cepas aisladas de una misma zona, se tomaron 6 cepas aisladas en la zona de Monagas de bacteriosis detectadas en los años 2000, 2001 y 2003 con el fin de analizar el grado de variabilidad que pudiera presentar una misma entidad geográfica.

Las muestras fueron aisladas de hojas que presentaban las lesiones acuosas características del añublo bacterial y se purificaron hasta considerar que se tenían cultivos puros. La selección final se realizó en el medio semi-selectivo (CTA) un medio mínimo que solo contiene sales y como fuente de carbono el azúcar L-trealosa (Fessehaie *et al*, 1999). Las *Xanthomonas* pueden utilizar varios azúcares como fuentes de carbono entre los que se encuentran arabinosa, manosa, galactosa, trealosa, cellobiosa y fructosa. Entre las especies que crecen en trealosa tenemos: *axonopodis*, *campestris* y *populi*; excluyendo o suprimiendo el crecimiento de otros grupos bacterianos, sin embargo, de estas tres especies *axonopodis* se diferencia de *campestris* y *populi* en que la primera tiene un color blanquecino en contraste al color amarillo que presentan *campestris* y *populi*.

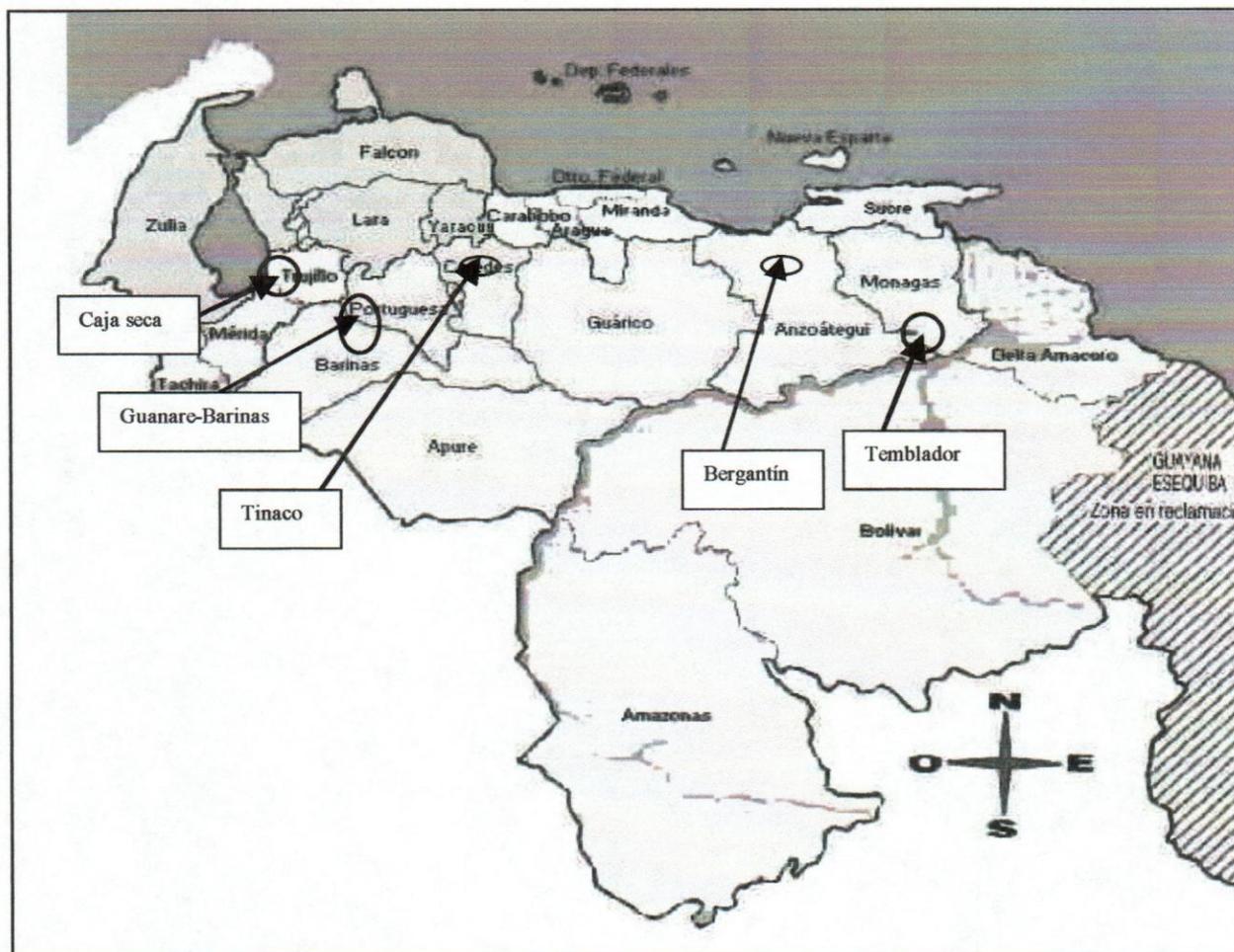


Figura 4. Zonas de producción de yuca en Venezuela. En la figura se indica las regiones donde se registraron brotes del añublo bacteriano por *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*. La colección usada en este estudio se obtuvo de la zona de Guanare en el Edo. Portuguesa y la zona de Temblador en el Edo. Monagas.

4.2. Cepas seleccionadas de las diferentes Bacteriosis.

Las cepas utilizadas en este trabajo se seleccionaron de los Estados Monagas y Portuguesa y se trabajaron en grupos de estudio

- Grupo 1.** Monagas, bacteriosis del año 2000: Mon 011, Mon 018, Mon 019, Mon 020, Mon 023 y Mon 028.
- Grupo 2.** Monagas, bacteriosis del año 2001: Mon 311, Mon 312, Mon 313, Mon 320, Mon 323 y Mon 340.
- Grupo 3.** Monagas, bacteriosis del año 2003: Mon 460, Mon 476, Mon 486, Mon 496, Mon 506 y Mon 536.
- Grupo 4.** Portuguesa, bacteriosis del año 2000: Gua 50, Gua 51, Gua53, Gua 54, Gua 56 y Gua 58.

4.3. Caracterización bioquímica de los aislados

Las características fisiológicas y bioquímicas de las bacterias son utilizadas para su clasificación en géneros y especies ya que cada grupo bacteriano realiza ciertas reacciones bioquímicas acorde con su fisiología y características moleculares propias, permitiendo así el diagnóstico y la diferenciación de cada grupo bacteriano. Para la diferenciación de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* se tomaron en cuenta características morfológicas como el color cremoso de las colonias (en contraposición al color amarillo propio de las *Xanthomonas*) y el aspecto mucoso de estas, debido a la producción del exopolisacárido xantano. Para la marcha bioquímica se realizaron las siguientes pruebas: Test de solubilidad en KOH al 3%, producción de catalasa, hidrólisis del almidón, producción de H₂S, metabolismo de la glucosa, prueba o/f, reducción de nitratos, producción de indol, reacción de la oxidasa, utilización de leche Litmus y tolerancia al cloruro de sodio.

Los valores esperados para estas pruebas fueron: catalasa positiva, hidrólisis de la gelatina positiva, hidrólisis del almidón positiva, producción de H₂S negativa, metabolismo de la glucosa positiva, prueba o/f positiva, oxidasa negativa, reducción de nitratos negativa,

producción de indol negativa, litmus milk negativa. El resultado esperado para cada prueba se indica en la primera fila de la tabla 1, donde se resumen los resultados obtenidos con cada una de las cepas seleccionadas.

Previo a la realización de la marcha bioquímica se crecieron las cepas en medio LB líquido y luego se inocularon en cada uno de los medios específicos para las diferentes pruebas o en medios sólidos para la caracterización de *Xanthomonas axonopodis* como se sugería en el Manual de Bergey's (1994). Se tomaron también los valores reportados en el trabajo especial de grado de la Lic. Ana María Bocsanczy (2000), quién aisló la colección del 2000.

Los resultados obtenidos para las diferentes cepas seleccionadas se describen en la tabla 1 y se observaron variaciones en varias de las pruebas. En la prueba de la hidrólisis de la gelatina 3 muestras dieron negativo o parcialmente positivo a dicho ensayo, presumiendo que estas cepas tuvieron un crecimiento lento o débil al momento de la inoculación. En los resultados para la hidrólisis del almidón se encontraron varias cepas que tuvieron una reacción dudosa o débil. Verdier *et al.* (1993) también observó un resultado similar y sugiere que se puede deber a una diferencia en la producción de la enzima amilasa, permitiendo de esta manera aclarar la distinción entre grupos geográficos reportados en su estudio. Para la prueba del metabolismo de la glucosa todas debieron ser positivas a la reacción, sin embargo, se encontró que seis muestras dieron resultados dudosos. Estos resultados necesitan una revisión posterior ya que al ser seleccionadas las cepas en el medio semiselectivo con trealosa (CTA) deberían utilizar glucosa como fuente de energía. Es posible que dichos cultivos no fueron inoculados correctamente.

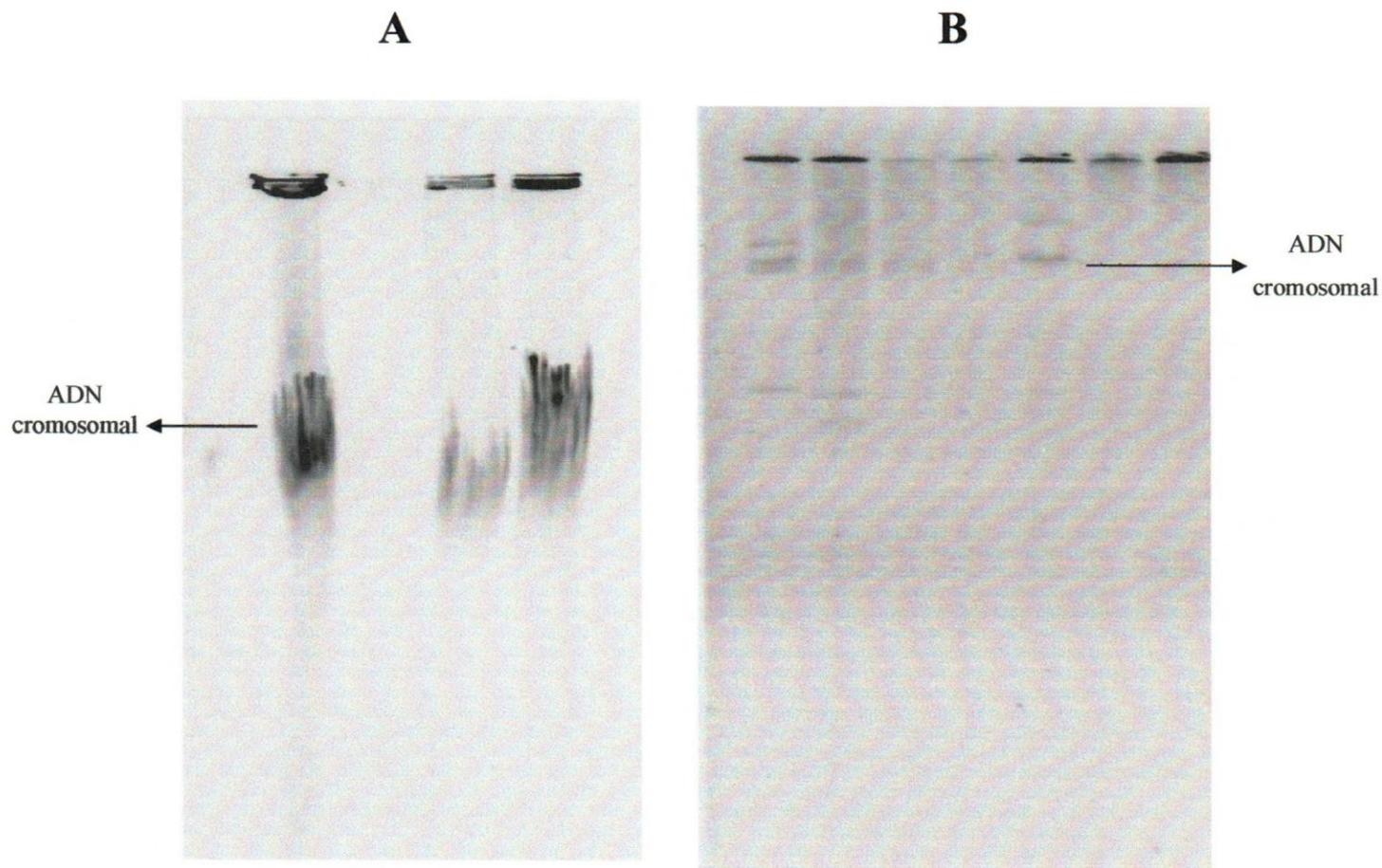
Para el resto de las pruebas la mayoría de las muestras coincidieron con los valores esperados, sin embargo, los resultados de la cepa Mon 018 no coincidió con los valores esperados en las pruebas hidrólisis del almidón, metabolismo de la glucosa y oxidasa indicando que podría no ser *Xam* y debería ser analizada nuevamente o repetir los resultados dudosos.

TABLA 1. Pruebas Bioquímicas de los aislados bacterianos de los Estados Monagas y Portuguesa.

Muestras	Catalasa	Hidrólisis de la gelatina	Hidrólisis del almidón	Producción de H ₂ S		Metabolismo de la glucosa	OF	Oxidasa	Reducción de nitratos	Producción de Indol	Litmu Milk	Tolerancia al NaCl	Tolerancia al NaCl
Valores esperados	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	1%	2%
	48 h	48 h	48 h	24	48	48 h	48	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h
Mon 011	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Mon 018*	+	+	d	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Mon 019	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Mon 020	+	d	d	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Mon 023	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Mon 028	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Mon 311	+	+	d	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Mon 312	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Mon 313	+	d	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Mon 320	+	+	d	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Mon 323	+	d	d	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Mon 340	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Mon 460	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Mon 476	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Mon 486	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Mon 496	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Mon 506	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Mon 536	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Gua 50	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Gua 51	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Gua 53	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Gua 54	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Gua 56	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Gua 58	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+

La simbología representa: (+) reacción positiva; (-) reacción negativa; d: débil o dudoso. Las muestras que tienen un asterisco (*) son las que tuvieron 3 ó más valores que no se esperaban y por lo tanto, podría no ser *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

Figura 5. Aislamiento de ADN plasmídico. **A.-** Metodología de Chen y Kuo (1993) mostrando en los carriles el tratamiento de 3 aislados. **B.-** Metodología de Zhou *et al.*, (1990), mostrando en los diferentes carriles el aislamiento de 5 aislados.



La variabilidad genética se ha estudiado en casi todas las bacterias fitopatógenas. La variabilidad plasmídica, podría ser una de las causas que proporcionaría la diversidad genética ya que patrones de restricción podrían generar diferencias significativas en las cepas aisladas. La diversidad polimórfica reportada en los trabajos de Verdier y col. (1998) se determinó mediante patrones de restricción RFLP en la cual utilizaron ADN total bacteriano (cromosomal más plasmídico), sin tomar en cuenta el perfil plasmídico de las cepas analizadas. Por esa razón nuestros resultados no pueden ser comparados con los reportados por Verdier y col. (1998) pero podría indicarnos la homogeneidad o heterogeneidad de las cepas seleccionadas con relación al material genético extracromosómico. Este dato podría ser importante en el análisis de la diversidad ya que la sonda utilizada para detectar la variabilidad se aisló de una región plasmídica presente en cepas patogénicas y dicha región se encontraba ausente en las cepas no patogénicas. Las cepas no patogénicas presentaban un plásmido de menor tamaño (González *et al.*, 2002).

En la figura 6, se muestran los resultados de tres aislados del Estado Monagas que presentaron plásmidos, Mon 011 con 1 plásmido con un peso molecular aproximado de 40 Kb, Mon 018 presentando 3 plásmidos con pesos aproximados de 71, 40 y 4,3 Kb y Mon 019 con 2 plásmidos con pesos aproximados de 40 y 18,6. En el análisis de los aislados del Estado Portuguesa la cepa Gua 50 presentó un plásmido con el peso molecular aproximado de 12,5 Kb, Gua 53 con 3 plásmidos con 70, 3 y 2,2 Kb y Gua 54 con 2 plásmidos con pesos moleculares aproximados de 2,5 y 2,2 Kb. Un resumen de estos resultados se muestra continuación

Monagas		Portuguesa	
Muestra	Plásmido	Muestra	Plásmido
	Peso molecular aproximado Kb		Peso molecular aproximado Kb
Mon 011	> 40	Gua 50	12,5
Mon 018	>40 ; >71; <4,3	Gua 51	0
Mon 019	>40; 18,6	Gua 53	>70 ; 3,0 ; 2,2
Mon 020	0	Gua 54	2,5 ; 2,2
Mon 023	0	Gua 56	0

Mon 028

0

Gua 58

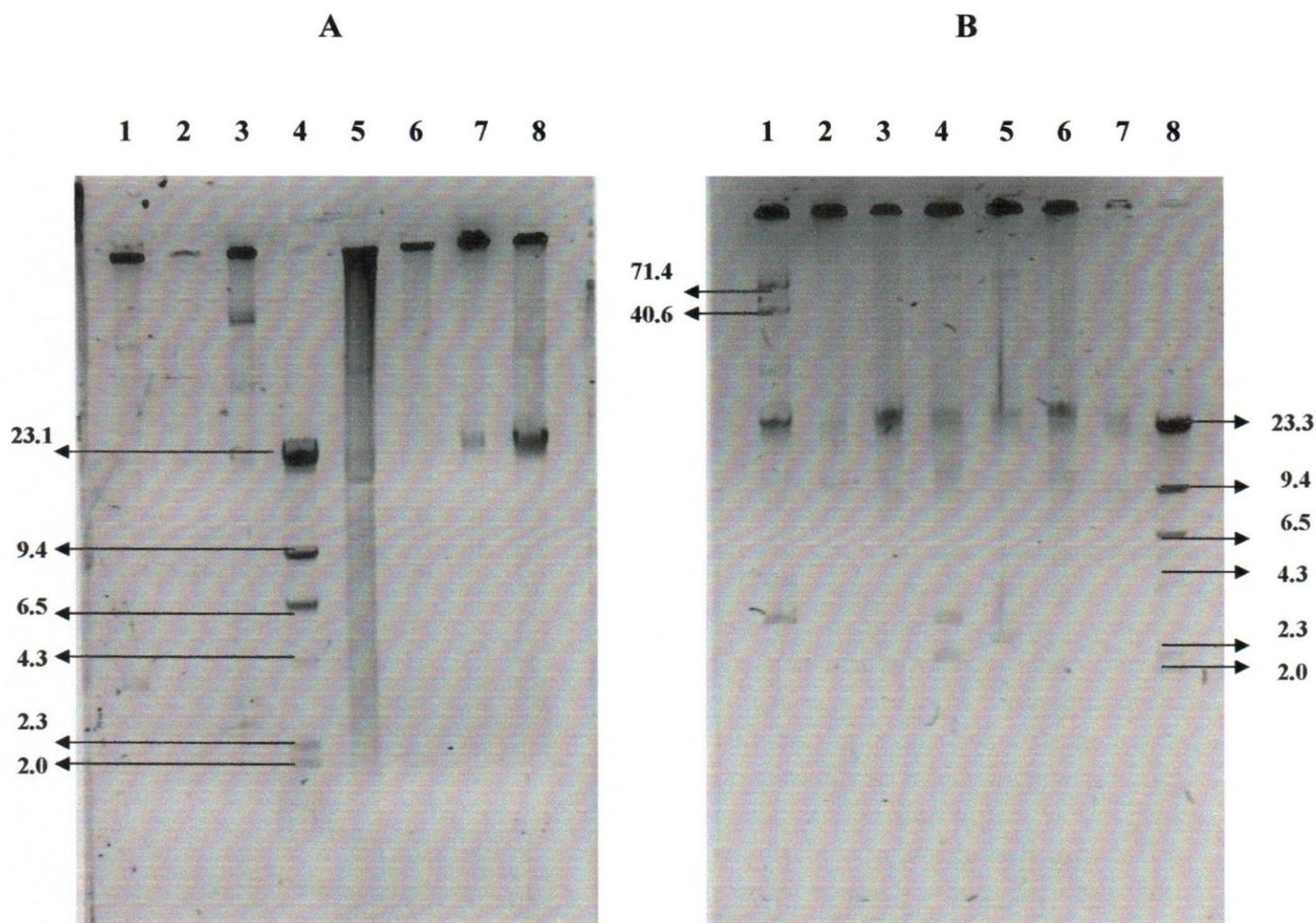
0

Los resultados obtenidos indican que existe una variabilidad heterogénea en cuanto al tamaño de los plásmidos.

Una de las hipótesis planteadas en este trabajo era la posibilidad de que existiera un plásmido común en las bacterias aisladas de las diferentes bacteriosis puesto que González y col. (2002) pudieron identificar cepas patógenas de las no patógenas amplificando por PCR la región que portaba el gen *pthB*. La región *pthB* fue aislada de un plásmido de aproximadamente 44 Kb presente en todas las cepas Xam patogénicas aisladas y que se presentaba como un plásmido de menor tamaño en las cepas no patogénicas, posiblemente debido a una delección. Por otro lado, la patogenicidad de muchas bacterias fitopatógenas se debe a la presencia de un plásmido que porta los determinantes de patogenicidad y virulencia como es el caso de *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora* y *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium* contiene el plásmido Ti que logra pasar de la bacteria al interior de la planta mediante conjugación bacteriana, se incorpora por recombinación con el ADN de la célula vegetal y posteriormente induce la proliferación del tejido vegetal formando masas tumorales llamadas crestas de gallo (Karp, 1998).

En las muestras del Estado Monagas las cepas Mon 011, Mon 018, y Mon 019 presentaron un plásmido que bien pudiera ser de peso molecular similar al reportado por González y col., (2002) pero ese resultado no se repite para las cepas aisladas en el Estado Portuguesa. La presencia de un plásmido de 40 Kb en las cepas patogénicas no se correlaciona con el resultado presentado por Bocsanczy (2000) quien reporta a la cepa Gua 56 como patogénica en cultivo de yuca y en nuestros experimentos no se le observó plásmidos con tamaños similares a los reportados por González y col. (2002).

Figura 6. Comparación del perfil plasmídico de cepas colectadas de la bacteriosis del año 2000 en los Estados Monagas y Portuguesa: **A**, perfil plasmídico de cepas colectadas de la bacteriosis del año 2000 del Edo. Monagas. **Carriles:** 1. 39R861 (estándar de peso molecular conteniendo plásmidos con PM de 168.8; 71.4; 40.6 y 7.8 Kb); 2. Mon 011; 3. Mon 018; 4. Lambda *Hind* III (estándar de PM con los fragmentos de: 23.13; 9.42; 7.8; 6.56; 4.36 Kb); 5. Mon 019; 6. Mon 020; 7. Mon 023; 8. Mon 028. **B**, perfil plasmídico de cepas colectadas de la bacteriosis del año 2000 del Edo. Portuguesa. **Carriles:** 1. 39R861 (estándar de peso molecular conteniendo plásmidos con PM de 168.8; 71.4; 40.6 y 7.8 Kb); 2. Gua 50; 3. Gua 51; 4. Gua 53; 5. Gua 54; 6. Gua 56; 7. Gua 58 y 8. Lambda *Hind* III (estándar de PM con fragmentos cortados de: 23.32; 9.41; 6.55; 4.36; 2.32; 2.02 y 0.5).



C.- Perfil plasmídico de cepas aisladas en el Estado Monagas durante la Bacteriosis de los años 2000, 2001 y 2003.

Se compararon cepas de la misma localidad geográfica (Monagas), con el fin de conocer el grado de variabilidad existente entre los aislados que en los tres años (2000, 2001 y 2003) atacaron los cultivos de yuca y provocaron brotes del añublo bacterial. Nuestro interés en este experimento se centró en la caracterización del perfil plasmídico a fin de establecer su posible variabilidad, además se pretendió identificar como fluye el contenido extracromosómico entre los diferentes aislados y poder correlacionar si lo aislados de una misma área geográfica mantuvieron el mismo patrón plasmídico durante los años en que se reportaron los focos de infección.

En la figura 7, se muestran los resultados de los aislados del Estado Monagas de la bacteriosis de los años 2000, 2001 y 2003 que presentaron plásmidos, Mon 011 con 1 plásmido con un peso molecular aproximado de 40 Kb, Mon 018 presentando 3 plásmidos con pesos aproximados de 71, 40 y 4,3 Kb y Mon 019 con 2 plásmidos con pesos aproximados de 40 y 18,6 para la bacteriosis del año 2000. En el análisis de los aislados de la bacteriosis del año 2001 los aislados que presentaron plásmidos fueron los siguientes: Mon 313 presentando 3 plásmidos con pesos aproximados de 9,4; 6,5 y 4,3 Kb; la cepa Mon 323 presentó 4 plásmidos con un peso molecular aproximado de >6,5; >2,3; 2 < 2,0 Kb. Para la bacteriosis del año 2003 solo la cepa Mon 536 obtuvo 1 plásmido de 2,1. Un resumen de estos resultados se muestra continuación

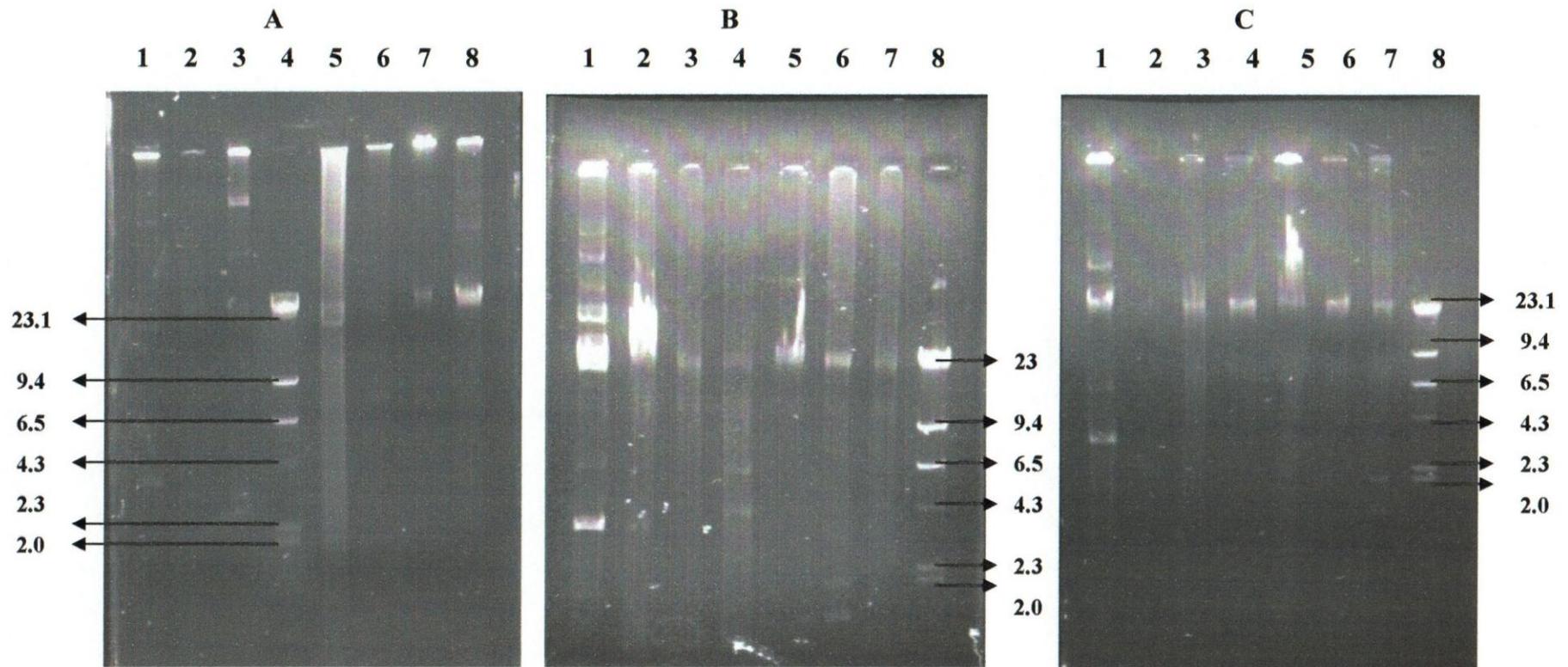
Bacteriosis del año 2000		Bacteriosis del año 2001		Bacteriosis del año 2003	
Muestra	Plásmido	Muestra	Plásmido	Muestra	Plásmido
	Peso molecular aproximado Kb		Peso molecular aproximado Kb		Peso molecular aproximado Kb
Mon 011	>40	Mon 311	0	Mon 460	0
Mon 018	>71;>40;4,3	Mon 312	0	Mon 476	0
Mon 019	>40; 18,6	Mon 313	9,4; 6,5; 4,3	Mon 486	0
Mon 020	0	Mon 320	0	Mon 496	0

Mon 023	0	Mon 323	>6,5; >2,3; 2 < 2,0	Mon 516	0
Mon 028	0	Mon 340	0	Mon 536	2,1

En la figura 7A se observó que 3 muestras en la bacteriosis del año 2000 presentaron plásmidos: Mon 011, Mon 018 y Mon 019; no se observó plásmidos en las otras muestras (Mon 020, Mon 023 y Mon 028), aun cuando se presume un buen aislamiento por la presencia de ADN cromosomal en las muestras que no mostraron plásmidos. En la otra muestra Mon 020 no se observó ni ADN cromosomal ni extracromosómico presumiendo que pudo degradarse todo el ADN en el proceso de aislamiento, con lo cual no podemos concluir sobre esta cepa. En la figura 7B se observan sólo 2 muestras con plásmidos Mon 313 y Mon 323; las otras muestras presentaron el ADN cromosomal mas o menos degradado. La figura 7C sólo una muestra presentó plásmido Mon 536; la mayoría de las que no presentaron plásmidos presentaron su ADN cromosomal sin embargo, hay dos cepas de diferentes bacteriosis que presentaron el mismo plásmido de 4,3 Kb aproximadamente y fueron Mon 018 de la bacteriosis del año 2000 y Mon 313 de la bacteriosis del año 2001, además, existe una cierta variabilidad plasmídica entre las cepas del Estado Monagas permitiendo así un mecanismo de variabilidad constante.

En conclusión al analizar el perfil plasmídico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* con la finalidad de evaluar la posible variabilidad plasmídica presente en las zonas geográficas donde se hizo el muestreo se llega a la conclusión de que existe una cierta diversidad de material extracromosómico en ambos estados que puede deberse al proceso de transferencia horizontal entre cepas.

Figura 7. Comparación del perfil plasmídico de cepas colectadas de la bacteriosis detectada en los años 2000, 2001 y 2003 en el Estado Monagas (Agropecuaria Mandioca). **A.** Perfil plasmídico de la bacteriosis del año 2000. Carriles: 1. 39R861(estándar de peso molecular); 2. Mon 011; 3. Mon 018; 4. Lambda *Hind* III; 5. Mon 019; 6. Mon 020; 7. Mon 023 y 8. Mon 028. **B.** Perfil plasmídico de la bacteriosis del año 2001. Carriles: 1. 39R861 (estándar de peso molecular); 2. Mon 311; 3. Mon 312; 4. Mon 313; 5. Mon 320; 6. Mon 323; 7. Mon 340 y 8. Lambda *Hind* III. **C.** Perfil plasmídico de la bacteriosis del año 2003. Carriles: 1. 39R861 (estándar de peso molecular); 2. Mon 460; 3. Mon 476; 4. Mon 486; 5. Mon 496; 6. Mon 506; 7. Mon 536 y 8. Lambda *Hind* III.



4.5. Pruebas de Patogenicidad

A. Respuesta de Hipersensibilidad en cultivos de referencia:

Se seleccionaron varias cepas de la colección que fueron reportadas en estudios anteriores por su patogenicidad en yuca: Mon 011, Mon 019, Mon 020, Gua 51, Gua 53 y Gua 56 y se cultivaron en medio LB por 16 horas a 30°C. Un alícuota del cultivo conteniendo aproximadamente 1.9×10^9 células/ml se inyectó en las venas de las hojas de plantas de tabaco, tomate y pimentón como se describe en el marco metodológico y se procedió a su lectura a las 24 y 48 horas después de la inyección. La figura 8 muestra los resultados que se obtuvieron luego de las 72 de la inoculación. Las pruebas de hipersensibilidad fueron negativas para los tres cultivos, sin embargo se detectó una respuesta tardía que no podría considerarse como respuesta de hipersensibilidad (HR) ya que la misma ocurre entre las 24 o 48 horas por definición. Los síntomas ejemplificados en la figura 9 aparecieron en algunos casos a partir del quinto día y se manifestaron como necrosamiento, otros como clorosis del tejido y en algunos casos se presentó una respuesta muy parecido a la muerte del tejido, una reacción similar a lo que se espera en un ensayo de hipersensibilidad, solo que en estos casos no toda la zona infiltrada dio la respuesta de la muerte celular.

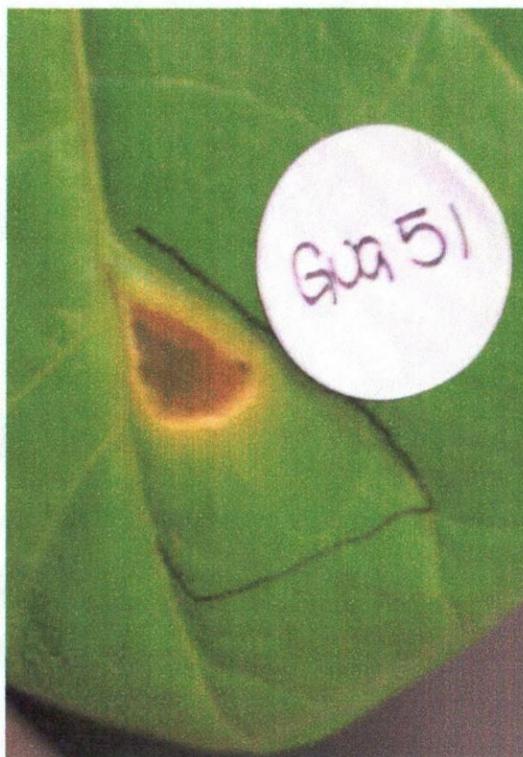
Las plantas reaccionan ante los patógenos activando mecanismos de defensa (respuesta de hipersensibilidad, HR) y desencadenan una serie de procesos bioquímicos que inducen a la muerte del tejido en el sitio de la infección; impidiendo de esta forma la nutrición del patógeno y la posibilidad de invasión de tejidos adyacentes. La reacción de hipersensibilidad se manifiesta como una respuesta inmediata de la planta a la presencia de una bacteria patógena y ha sido descrito por Alfano y Collmer (1997) en una figura donde se muestra que las bacterias fitopatógenas introducen unas proteínas denominadas Avr y harpinas al interior de la célula vegetal mediante el pili (sistema de transporte tipo III), desencadenando en el interior de la célula mecanismos moleculares tendientes a neutralizar al patógeno.

la respuesta hipersensible (HR) de cepas de
(*Nicotiana tabacum*); B, Pimentón (*Capsicum*)



Figura 9. Respuesta a la inoculación de cultivos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* en hojas de tabaco. La reacción apareció después de las 72 horas y se presentó con diferentes manifestaciones: **A.** Necrosis puntual; **B.** Muerte del tejido similar a lo que sería una reacción positiva de hipersensibilidad; **C.** reacción necrótica con clorosis.

A

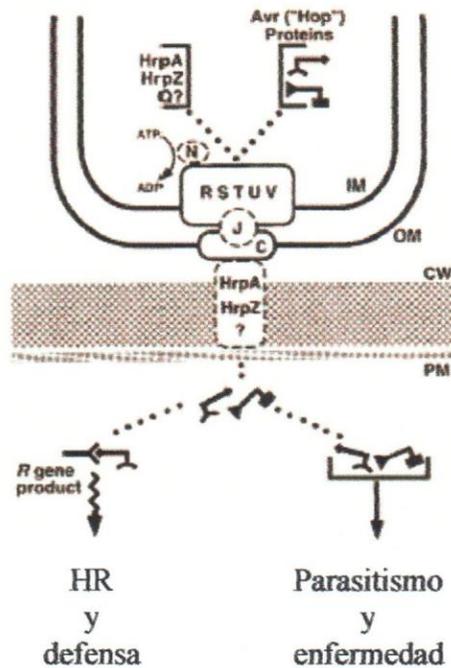


B



C





Si la planta contiene los genes de resistencia (R) se produce la interacción "gen a gen" lo cual hace que la planta produzca la respuesta de hipersensibilidad desencadenando la muerte del tejido, o si por el contrario la planta no tiene los genes de resistencia se produce el parasitismo y por tanto la enfermedad. La prueba de HR se realiza generalmente en hojas de tabaco y de no dar respuesta positiva se utiliza como cultivo de referencia plantas de tomate y pimentón. Son muy pocos los patógenos bacterianos que no responden a esta prueba. Conocíamos de antemano que la respuesta de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en hojas de tabaco era negativa y se procedió a medir el poder patógeno en cultivos de pimentón y tomate.

Un signo dramático que produce la respuesta de hipersensibilidad (HR) es la localización de la muerte celular en el sitio de infección que se evidencia rápidamente con la deshidratación del tejido apareciendo como una forma de muerte celular programada. La HR ocurre por dos procesos o mecanismos: primero, la aparición de la HR es genéticamente controlada por la planta, y segundo la inducción de factores de virulencia por parte de la

bacteria no inducirá la HR a menos que el tejido de la planta comience la síntesis de proteínas y por tanto, se active transcripcionalmente. De hecho, para inducir una señal por HR se requiere producir rápidamente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por las células vegetales, fenómeno conocido como “explosión oxidativa” y conduce a un incremento dramático en la cantidad de células muertas, además, deben actuar otros factores en la muerte celular o en la activación (en ciertos casos) de una ruta alternativa (Greenberg, 1996).

La HR debe ser similar a la apoptosis en animales, que se caracteriza por: degradar el ADN en los extremos 3'OH, la formación de invaginaciones en la membrana plasmática, la condensación nuclear y citoplasmática y la activación del intercambio de los iones K^+/H^+ a través de la membrana plasmática de la célula de la planta. El control genético de la HR se comenzó a dilucidar en mutantes de *Arabidopsis* que activaron la HR en ausencia de cualquier patógeno. Se aislaron y caracterizaron los genes responsables de regular genéticamente la expresión de la HR y fue de suma utilidad para el entendimiento de este mecanismo. La existencia de múltiples genes que influyen la regulación de HR plantea la siguiente interrogante ¿es controlada la HR por una sola vía o vías alternas en respuesta a diferentes patógenos?. Esto al parecer es de suma importancia ya que el mecanismo de muerte celular por HR puede variar dependiendo de la combinación que exista entre el huésped y patógeno, desde entonces, los diferentes tipos de células de una planta pueden experimentar una HR que al parecer no muestra rasgos característicos y morfológicos de apoptosis (Greenberg, 1996).

En conclusión, la respuesta de hipersensibilidad no se evidenció en las plantas de referencia y después del quinto día aparecieron signos similares a la HR, pero que no podemos llamarla como tal HR, planteándose la interrogante de si existen vías alternas por las cuales se produce la HR que experimentalmente no se conozca.

B. Patogenicidad de las cepas *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en variedades de yuca chaguamalera.

Las pruebas de patogenicidad en yuca se realizaron con el fin de poder demostrar el poder patógeno de las cepas seleccionadas: Mon 011, Mon 019, Mon 020, Gua 51, Gua 53 y Gua 56. Las plantas de yuca fueron inoculadas con cultivos de 24 horas crecidos en LB líquido. La inoculación se realizó ocasionándole lesiones (circulares por presión con una inyectora o punción del tejido con una aguja) en las hojas como se muestra en la figura 10. Las plantas se colocaron en una incubadora Lab-Line Ambi-Hi-Lo marca Chamred con condiciones de fotoperíodo (día/noche), a una temperatura de 34/25 °C y una aparente humedad que se logró colocando una bandeja con suficiente agua que se llenaba con regularidad.

Los resultados obtenidos fueron evidenciados a partir del día 7, en el cual se pudo observar una clorosis en las hojas inoculadas con cada una de las muestras. Esa respuesta no se observó en los controles (Figura 11). A partir del día 14 se pudo observar la muerte total de la planta como lo demuestra la figura 12, lo cual se evidenció la patogenicidad de las cepas. De las seis muestras que se inocularon en plantas de yuca tres presentaron plásmidos como son: Mon 011, Mon 019 y Gua 53, las otras tres restantes: Mon 020, Gua 51 y Gua 56 no presentaron plásmido, sin embargo, todas dieron positivas a la prueba de patogenicidad, estos resultados se contraponen a los de Boczanczy que diferencia las cepas Gua 51 y Gua 56 como patógenas.

La prueba de patogenicidad se contrastó con la presencia de plásmidos, sin embargo, se sabe que la mayoría de las bacterias fitopatógenas son patógenas porque tienen en sus elementos extracromosomales ciertos genes que inducen a la muerte del huésped al cual están invadiendo, pero en este caso, las muestras que no presentaron plásmidos fueron también patógenas, lo que dificulta concluir y correlacionar la patogenicidad con la presencia de un determinado elemento extracromosomal.

Figura 10. Patogenicidad de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* en plantas de Yuca variedad *chaguamalera*. Se utilizaron cultivos de las cepas Mon 011, Mon 019, Mon 020, Gua 51, Gua 53 y Gua 56 a una concentración aproximada de 10^9 ufc/ml y se dispensó 20 μ l de cultivo en los puntos de inoculación sobre cada hoja. Detalle de la lesión provocada en la hoja para inocular el cultivo.



Figura 11. Patogenicidad de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* en Yuca a los 7 días de la inoculación. Detalle de la lesión provocada en la hoja a los 7 días de inoculado el cultivo.

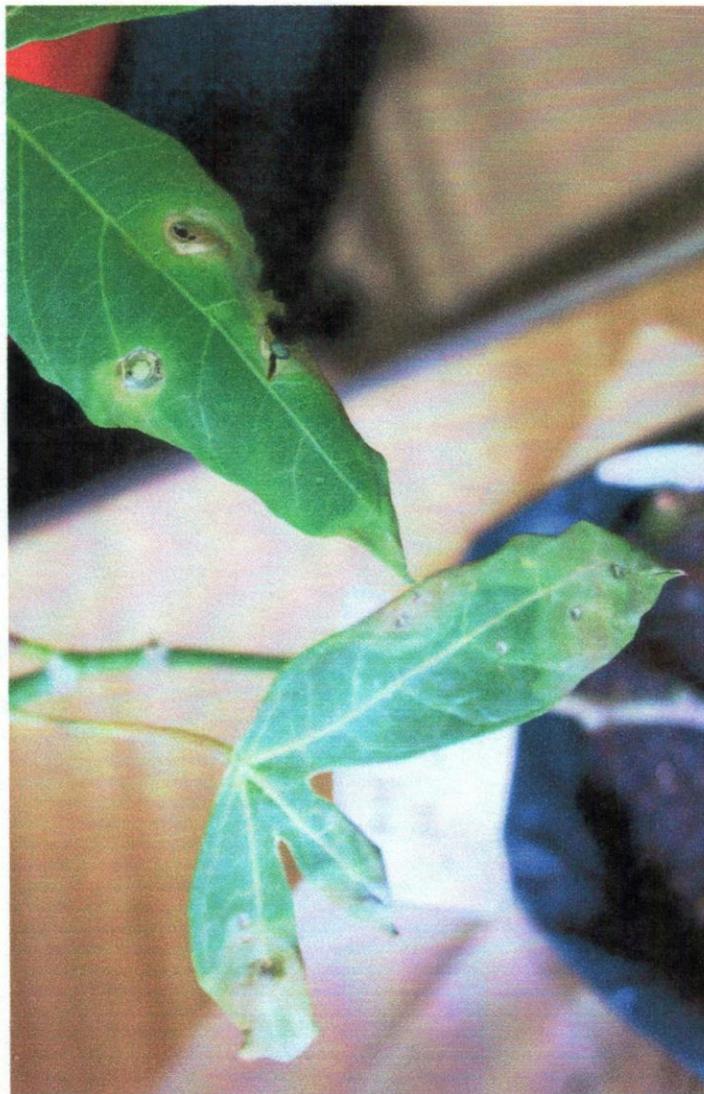
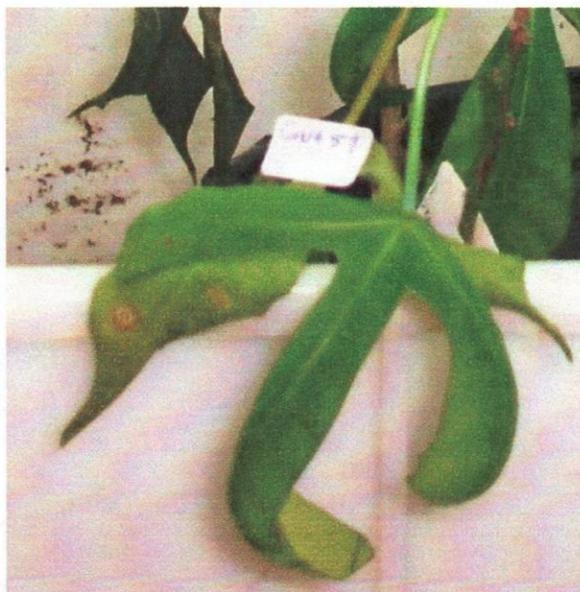


Figura 12. Patogenicidad de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (*Xam*) en Yuca a los 14 días de la inoculación. **A.** Muerte de la planta de yuca por *Xam*. **B.** Detalle de la hoja donde se inoculó la muestra Gua 51 a los 14 días.

A



B



Nuestra experiencia indica que se tendrían que mejorar los protocolos de infección, ya que es importante el control de la humedad y la temperatura para poder reproducir la enfermedad. En nuestras condiciones, al no poder contar con un invernadero, no se pudieron controlar ciertas variables como fueron la temperatura (ya que el patógeno es muy sensible a los cambios bruscos de temperatura y la humedad) y el mantener una humedad relativa indispensable para el desarrollo de los síntomas. La restricción de espacio en la incubadora y la falta de tiempo impidió que se utilizaran un número de muestras necesario para un análisis estadístico de la experiencia. Sería interesante probar las infecciones en plantas desarrolladas por cultivo *in vitro* y utilizar condiciones similares a las de una cámara de crecimiento que mantienen un control constante de fotoperíodo, temperatura y humedad.

CONCLUSIONES

- Al comparar el perfil plasmídico de las muestras de los Estados Monagas y Portuguesa se observó una cierta variabilidad plasmídica, es decir, existe heterogenidad entre los plásmidos encontrados en las dos regiones a pesar de que se esperaba encontrar un plásmido en común entre las cepas.
- *Xanthomonas axonopodis* no presenta respuesta de hipersensibilidad (HR) como la mayoría de las bacterias fitopatógenas. La respuesta tardía podría indicar una vía alterna para inducir la muerte celular programada.
- Los resultados de la prueba de patogenicidad en variedades de yuca fueron positivas, con las cepas seleccionadas (Mon 011, Mon 019, Mon 020, Gua 51, Gua 53 y Gua 56) se tomaron estas muestras porque tres de ellas tenían plásmidos que fueron: Mon 011, Mon 19 y Gua 53 y el resto de las cepas (Mon 020, Gua 51 y Gua 56) no se les observó plásmido alguno. Se puede inferir que los determinantes patogénicos no residen únicamente en los plásmidos sino que también se localizan en el cromosoma bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfano, J. R.; A., Collmer. 1996. Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. The Plant Cell. 179. 1683-1698.
- Alfano, J. R., A., Collmer. 1997. The type III (Hrp) Secretion Pathway of Plant Pathogenic Bacteria: Trafficking Harpins, Avr Proteins, and Death. Journal of Bacteriology. 179. (18): 5655-5662.
- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. Noriega Editores. México. 820 p.
- Bocsanczy, A. M. (2001). Estudio de la presencia y diversidad de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en diferentes regiones de Venezuela. Trabajo especial de grado para obtener el título de Licenciado en Biología. Universidad Simón Bolívar (USB).
- Carzola López, Francisco. (s/f). Factores de virulencia en cepas patógenas. Obtenido el: 22/05/2005 en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros34/virul/34.html>.
- Coplin, D. L. 1989. Plasmid and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. Annual Reviews Phytopathologic. 27: 187-212.
- Chen, W.; T., Kuo. 1993. A Simple and Rapid Method for the Preparation of Gram-negative Bacterial Genomic DNA. Nucleic Acid Research. 21. (9):2260-2264.
- Elango, F.; J. C Lozano. 1981. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight. Fitopatologia Brasileira 6: 57-63.
- Fessehaie, A.; K., Wydra; K., Rudolph. 1999. Development of a New Semiselective Medium for Isolating *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* from Plant Material and Soil. Phytopathology. 89 (7): 591-597.
- González, Carolina, Silvia, Restrepo; Joe, Thome; Valerie, Verdier. 2002. Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. FEMS Microbiology Letters. 215. 23-31.
- Greenberg, J. T. 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93. 12094-12097.
- Griffith, A; J. H., Miller; D. T., Suzuki, R. C., Lewontin; W. M. Gelbart. 1995. Genética. Quinta Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid. 850 p.

- Agent of Citrus Bacterial Canker Disease. Molecular Plant Pathology. **82**. (4): 485-490.
- Restrepo, S.; V. Verdier. 1997. Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Applied and Environmental Microbiology. **63**. (11):4427-4434.
- Rudolph, K., M. A., Roy, D. E., Stead, M. Davis, J. Swing, F. Gosselé. 1990. Isolation of bacteria. Capítulo 1.4. En: Methods in Phytobacteriology. Klement, Z., Rudolph, K., and Sands, C. D., Editores. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Swings, J. G., and E. L., Civerolo. 1993. Xanthomonas. Chapman & Hall. UK.
- Trujillo, G. E.; L. J. Subero; J. Luciani. 1980. Añublo bacteriano (*Xanthomonas manihotis*) en la zona central del país. II Jornadas Agronómicas de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay.
- Trujillo, G. E.; L. J. Subero; J. Luciani. 1982. Añublo Bacteriano de la Yuca en la Zona Central del País. Obtenido el: 11/12/2003 en: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/index.html>.
- Verdier, V.; P. Dongo; B. Boher. 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Journal of General of Microbiology. **139**. 2591-2601.
- Verdier, V.; S. Restrepo; G. Mosquera; M. C. Duque; A. Gerstl; R. Laberry 1998. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. Plant Pathology. **47**. 601-608.
- Xu, G. -W; C. F, González. 1991. Plasmid, Genomic, and Bacteriocin Diversity in U.S.A Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Phytopathology. **81**. (6): 628-631.
- Zhou C. 1990. Minipreparación de plásmidos. Biotechniques (8):172-173/