

Universidad de Costa Rica  
Facultad de Microbiología  
Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM)  
Área de Microbiología Ambiental

**Caracterización de la fitopatogenicidad de bacterias gram negativas aisladas de infecciones en plantas, mediante análisis fenotípico de la reacción de hipersensibilidad en *Nicotiana tabacum* y la detección molecular del gen efector *hrpZ***

**Krisia Herrera Cordero**

Proyecto de Graduación presentado como requisito para optar por el título de  
Licenciatura en Microbiología y Química Clínica

Sede Rodrigo Facio  
San José, Costa Rica  
Julio, 2009

## ACTA DE PRESENTACIÓN



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA  
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el lunes 06 de julio del año 2009 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **KRISIA HERRERA CORDERO**, carné A02051, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de PRÁCTICA DE GRADUACIÓN, para optar por el grado académico de LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA y el título profesional de DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

- Dr. Pedro Carrillo Dover                      **PRESIDENTE**
- Dr. Esteban Chaves Olarte
- Msc. Lorena Uribe Lorío
- Dra. María de los Ángeles Mora López
- Msc. Amy Wang

### ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **KRISIA HERRERA CORDERO**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

### ARTICULO 2

La postulante **KRISIA HERRERA CORDERO**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título "**Caracterización de la fitopatogenicidad de bacterias Gram-negativas aisladas de infecciones en plantas, mediante análisis fenotípico de la Reacción de Hipersensibilidad en *Nicotiana tabacum* y la detección molecular del gen efector hrpZ**".

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

#### ARTICULO 4

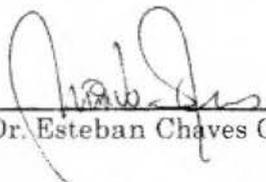
El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: Satisfactorio 90 (noventa).

#### ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de Licenciada en Microbiología y Química Clínica y al título profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.

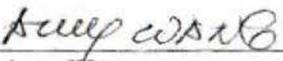
Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las 11:37 horas.

  
 Dr. Pedro Carrillo Dover  
 Presidente

  
 Dr. Esteban Chaves Olarte

  
 Msc. Lorena Uribe Lorio

  
 Dra. María de los Ángeles Mora López

  
 Msc. Amy Wang

  
 Krisia Herrera Cordero  
 Postulante

**DEDICATORIA**

*A Dios,*

*Doy infinitas gracias, por darme la vida y llenarla de bendiciones.*

*A mis padres,*

*Randall y Nohemy*

*Por su gran amor, comprensión y apoyo, por darme siempre palabras de aliento, fortaleza y guiarme, pero sobre todo por estar siempre a mi lado.*

*A mi hermano,*

*Diego*

*Gracias por preocuparte y cuidar de mí, por tener un gran corazón y apoyarme en todo.*

*A mi abuelita,*

*Tita*

*Por ser unos de los seres más especiales en mi vida, por toda la sabiduría, paciencia, confianza y comprensión, por darme las bases para ser mejor cada día y guiarme hacia el camino correcto.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mi tutora,*

*Lorena*

*Por su tiempo, dedicación, paciencia, comprensión y toda la guía  
brindada para lograr este proyecto.*

*A mi gran amigo,*

*Walter*

*Por ser mi maestro a nivel molecular, por invertir su tiempo y dedicación,  
gracias por apoyarme y darme siempre una esperanza para continuar.*

*Al personal y amigos del CIBCM*

*Por toda la ayuda brindada, por compartir conocimientos y  
disponibilidad para desarrollar mi proyecto.*

## RESUMEN

Las bacterias fitopatógenas son microorganismos que causan enfermedades en plantas y producen anualmente cuantiosas pérdidas económicas. Entre los géneros más importantes como agentes causales de infecciones bacterianas en cultivos están: *Erwinia* sp, *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. (Agrios, 2005).

En el presente trabajo, se analizaron 127 cepas de bacterias gram negativas aisladas de lesiones de diversos cultivos, pertenecientes a la colección del laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM). Se optimizó la técnica de Reacción de Hipersensibilidad (RH) en plantas de *Nicotiana tabacum*, y se tamizó dicha colección, con el fin de diferenciar a las bacterias potencialmente fitopatógenas de las bacterias saprófitas. Para esta prueba, se determinó que la concentración adecuada para la suspensión bacteriana corresponde aproximadamente a  $6 \times 10^8$  UFC/ml, utilizando un crecimiento bacteriano de 24 horas en el medio MP (Medio de Pectato liasa). Se probaron 3 protocolos de inoculación y se estableció que la técnica de impresión en hoja, permitió una adecuada inoculación en el mesófilo de la planta de tabaco. Un 15% de las bacterias (19 aislamientos), presentaron reacciones de hipersensibilidad típicas, un 65% (83 aislamientos) reacciones hipersensibilidad atípicas y 20% (25 aislamientos) presentaron resultados negativos.

Con el fin de corroborar la patogenicidad de las bacterias que presentaron los resultados atípicos de la prueba de RH, se inoculó una suspensión de cada bacteria, aisladas inicialmente de lechugas y se observó que efectivamente desarrollaron la enfermedad en el hospedero.

Por medio del método molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se intentó estandarizar la amplificación del gen *hrpZ*, que codifica por uno de los efectores que interviene en la reacción de hipersensibilidad. Se presentó amplificación inespecífica en 10 de los 15 ADN bacterianos amplificados y solo se detectó el gen en las bacterias utilizadas como controles (MA-37 y MA-70), identificadas como *Pseudomonas syringae*, por lo que se considera que el imprimador podría estar restringido a amplificar específicamente el gen de dicho género de bacteria.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ACTA DE PRESENTACIÓN .....	I
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN .....	V
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	VI
ÍNDICE DE CUADROS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
<b>1. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
1.1 HISTORIA .....	1
1.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS.....	1
1.3 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS GÉNEROS DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS GRAM NEGATIVAS .....	2
1.4 INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y BACTERIAS FITOPATÓGENAS .....	4
1.5 MECANISMO DE DEFENSA Y RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD .....	6
1.6 FACTORES DE VIRULENCIA GENERALES: GENES <i>HRP</i> .....	10
1.7 TÉCNICAS DE LA PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD EN PLANTAS DE TABACO.....	11
1.8 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE GENES MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES .....	12
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
4.1 UBICACIÓN .....	17
4.2 COLECCIÓN BACTERIANA.....	17
4.3 PLANTAS DE TABACO.....	18
4.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD EN PLANTAS DE TABACO .....	18
4.4.1 <i>Concentración del inóculo</i> .....	18
4.4.2 <i>Medio de cultivo</i> .....	19
4.4.3 <i>Protocolo inoculación</i> .....	19
4.5 TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE GENES <i>HRPZ</i> .....	21
4.6 CONFIRMACIÓN DE LA PATOGENICIDAD EN HOJAS Y TALLO DE LECHUGAS .....	22
4.7 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS .....	23
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
5.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE INOCULACIÓN EN PLANTAS DE TABACO.....	24
5.2 EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD EN TABACO.....	25
5.3 TAMIZAJE DE COLECCIÓN BACTERIANA EN HOJAS DE TABACO .....	26
5.4 PRUEBA DE PATOGENICIDAD EN PLANTAS DE LECHUGAS .....	30
5.5 PRUEBAS MOLECULARES: DETECCIÓN DEL GEN <i>HRPZ</i> .....	33
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
6.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE INOCULACIÓN EN PLANTAS DE TABACO.....	35
6.2 INTERACCIÓN PLANTA- BACTERIA. REACCIÓN HIPERSENSIBLE.....	36

6.3	DETECCIÓN DE GENES <i>HRPZ</i> .....	38
7.	CONCLUSIONES .....	40
8.	LITERATURA CITADA .....	41
9.	ANEXOS .....	45

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	EVALUACIÓN DE LA ESCALA VISUAL DE LOS SÍNTOMAS DESARROLLADOS EN LAS PLANTAS INOCULADAS Y SU RESPECTIVA INTERPRETACIÓN .....	25
CUADRO 2.	RESULTADOS DE LA REACCIÓN HIPERSENSIBLE EN TABACO DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS, AISLADAS DE DIVERSAS LESIONES DE CULTIVOS AGRÍCOLAS, PERTENECIENTES A LA COLECCIÓN DEL LABORATORIO DEL CIBCM. ....	27
CUADRO 3.	RESULTADOS DE LA INOCULACIÓN DE PLANTAS DE LECHUGAS, UTILIZANDO LA TÉCNICA DE IMPRESIÓN EN HOJA Y POR LESIÓN DEL TALLO, UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN APROXIMADA DE $6 \times 10^8$ UFC/ML .....	31
CUADRO 4.	CORRELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>HRPZ</i> E INTENSIDAD DE LA REACCIÓN HIPERSENSIBLE. ....	34
CUADRO 5.	IDENTIFICACIÓN DE LA COLECCIÓN BACTERIANA AISLADA DE DIVERSOS CULTIVOS AGRÍCOLAS DE COSTA RICA, PERTENECIENTES AL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR (CIBCM). ....	45
CUADRO 6.	COMPOSICIÓN Y VOLÚMENES DE LA REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>HRPZ</i> POR LA TÉCNICA DE PCR. ....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	ESQUEMA DE LAS ESTRUCTURAS PRESENTES EN UNA HOJA .....	5
FIGURA 2.	DIAGRAMA DE LA RESPUESTA HIPERSENSIBLE POR LA INTERACCIÓN DEL EFECTOR DE LA BACTERIA Y EL RECEPTOR DE LA MOLÉCULA DE RESISTENCIA DE LA PLANTA.....	8
FIGURA 3.	REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD TÍPICA EN HOJA DE TABACO. ....	9
FIGURA 4.	TÉCNICA DE IMPRESIÓN, DEMOSTRACIÓN DE LA INOCULACIÓN EN EL MESÓFILO EN HOJAS DE TABACO.....	20
FIGURA 5.	DIFERENTES INTENSIDADES DE REACCIÓN HIPERSENSIBLE, 13 DÍAS POSTERIOR A LA INOCULACIÓN, UTILIZANDO DOS TIPOS DE ESTÁNDARES DE TURBIDEZ.....	24
FIGURA 6.	DIFERENTES TIPO DE REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD OBSERVADAS EN HOJAS DE TABACO .....	26
FIGURA 7.	REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD EN HOJA DE TABACO, DESARROLLADA POR LA CEPA MA49. ....	28
FIGURA 8.	REACCIONES HIPERSENSIBLES TÍPICAS, EN HOJA DE TABACO SE PRESENTAN ALGUNAS DE LAS CEPAS QUE PRESENTARON VALORES DE 4 A 5 CRUCES. ....	29
FIGURA 9.	REACCIONES HIPERSENSIBLES ATÍPICAS, (CLOROSIS), SE PRESENTAN ALGUNAS BACTERIAS QUE PRESENTARON VALORES DE 1 A 2 CRUCES. ....	30
FIGURA 10.	RESULTADOS DE LA INOCULACIÓN DE HOJAS DE LECHUGA, LECTURA FINAL. ....	32
FIGURA 11.	SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA EN GELES DE AGAROSA AL 1% DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>HRPZ</i> DE CEPAS DE BACTERIAS. ....	33

## 1. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.1 Historia

Las bacterias fitopatógenas fueron descritas por primera vez por Thomas Burril (1878), científico que estudio la enfermedad conocida como el tizón del fuego en el peral y el manzano (Riviera, 1995; Pérez, 2007). En los años siguientes se describieron numerosas bacterias causantes de enfermedades en varios cultivos y se desarrolló la fitobacteriología. Erwin Smith (1854-1927) es conocido como el fundador de la fitobacteriología como ciencia, pues describió muchas enfermedades producidas por bacterias en plantas, incluyendo su patología, aislamiento en cultivos puros y desarrollo de métodos de inoculación (Pérez, 2007).

En la primera mitad del siglo pasado la fitobacteriología fue una ciencia prácticamente descriptiva, y a partir de la segunda mitad, con el progreso de otras disciplinas tales como bioquímica, fisiología y principalmente biología molecular, las investigaciones tendieron cada vez más a explicar la interacción entre las plantas y los patógenos, tal como las sustancias que produce el hospedero para defenderse de las bacterias o cuáles son las señales que intervienen en el reconocimiento de los hospederos por las bacterias. En los últimos años, los mayores avances en el conocimiento se han obtenido con el perfeccionamiento y desarrollo de las técnicas moleculares (González, 1985; Pérez, 2007).

### 1.2 Morfología y estructura de bacterias fitopatógenas

Las bacterias fitopatógenas son microorganismos unicelulares con una estructura de tipo procariota que causan enfermedades en plantas. Actualmente existen unas 60 especies reconocidas que incluyen alrededor de 300 subespecies y patovares (clasificación de una misma especie o subespecie con base a la patogenicidad dada por el tipo de hospedero vegetal) (Llacer *et al*, 2000).

La estructura celular de las bacterias fitopatógenas, al igual que la de otros procariotas, se caracteriza por la falta de compartimientos intracelulares. El citoplasma contiene un único cromosoma constituido por ADN bicatenario y circular que no está aislado del citoplasma por ninguna membrana y posee ribosomas de pequeño tamaño del tipo 70S que a la vez consiste de

dos subunidades (30S y 50S). La subunidad pequeña (30S) contiene las moléculas de ARNr 16S y la subunidad de mayor tamaño (50S) las moléculas ARNr 5S y ARNr 23S (Llacer *et al*, 2000; Pérez, 2007).

La mayoría de las bacterias fitopatógenas presentan un tamaño celular comprendido entre 1,0-5,0  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  de ancho. Las bacterias fitopatógenas tienen morfología esencialmente bacilar (Arauz, 1998). Existen bacilos cortos denominados cocobacilos o incluso muy largos que constituyen formas filamentosas, como *Streptomyces* sp. (Rivera, 1995; Agriós, 2005). Pueden presentar cápsulas, que son capas compactas de mucopolisacáridos o proteínas que actúan como protectoras de la acción de los sistemas defensivos del huésped (González, 1985).

Las bacterias fitopatógenas son mayoritariamente gram negativas por lo que presentan una capa fina de mureína, que a su vez está envuelta por una membrana externa en donde se sitúan algunos polisacáridos (Llacer *et al.*, 2000). A nivel de nutrición, las bacterias fitopatógenas se consideran como quimioorganoheterótrofas, es decir, que utilizan compuestos químicos como fuente energía y compuestos de tipo orgánico para la donación de electrones y fuente de carbono (Pérez, 2007). En cuanto a su relación con el oxígeno, existen aerobios estrictos como es el caso de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* y anaerobios facultativos como el género de *Erwinia* (Llacer *et al*, 2000).

### **1.3 Principales características de los géneros de bacterias fitopatógenas gram negativas**

#### ***Erwinia***

Las bacterias del género *Erwinia* son anaerobias facultativas con morfología bacilar, con rangos de tamaño de 0,15-1,0 por 1,0-3,0  $\mu\text{m}$  y con flagelación peritrica (González, 1985; Rivera, 1995).

Con excepción de un patovar de la especie *Erwinia herbicola* y de *Erwinia persicinus*, el género comprende mayoritariamente bacterias patógenas de plantas (Llacer *et al.*, 2000). Las especies de *Erwinia* han sido divididas en 3 grupos mediante estudios fenotípicos: el grupo *amylovora* está formado por *E. amylovora*, *E. tracheiphila*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens*, *E.*

*salicis* y *E. stewartii*. El grupo *herbicola* está formado por *E. herbicola*, *E. ananas* y *E. uredovora*. Finalmente el grupo *carotovora* está formado por *E. carotovora* (actualmente se le conoce como género *Pectobacterium*) y diversas subespecies y por *E. chrysanthemi* (actualmente se le conoce como *Dickeya dadanti*) (Trigiano, 2004).

Este género causa principalmente las pudriciones suaves en muchos cultivos, el tizón del fuego de las rosáceas y la marchites de Stewart en el maíz (Arauz, 1998).

### ***Pseudomonas***

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos rectos o curvos de 0,5-1,0 por 1,5-4,0 µm, móviles por uno o varios flagelos polares y que son habitantes comunes del suelo (González, 1985; Rivera, 1995).

Las especies de este género se agrupan de acuerdo a su capacidad para producir o no pigmentos fluorescentes cuando crecen en un medio de cultivo pobre en hierro, así como por la presencia de gránulos de poli-β-hidroxibutirato en su citoplasma. Se han identificado dos grupos de acuerdo a su homología de ADN que contiene *Pseudomonas* patógenas de plantas. El grupo *fluorescens* comprende las especies que en su mayoría producen pigmentos fluorescentes, entre las cuales se encuentran: *P. fluorescens*, *P. syringae* y una especie anómala pues no produce fluorescencia pero si produce poli-β-hidroxibutirato, *P. corrugata*. El grupo *solanacearum* está formado por especies patógenas no fluorescentes, tales como: *P. caryophylli*, *P. andropogonis*, *P. cepacia*, *P. gladioli*, *P. glumae*, *P. solanacearum*, *P. syzygii* y *P. rubrisubalbicans* (Llacer *et al.*, 2000).

Las *Pseudomonas* fitopatógenas están asociadas a una gran cantidad de enfermedades y síntomas, entre las cuales están los chancros en árboles, (heridas con zonas hundidas y agrietadas) la acronecrosis (tipo de necrosis, que puede matar rápidamente a la planta), la pudrición blanda y las manchas foliares en hojas. Por otra parte, se han asociado a las plantas como epífitas foliares o habitantes de la rizosfera. Debido a esto, es que este género es de gran importancia económica (Arauz, 1998; Agrios, 2005; Schaad *et al.*, 2001).

## *Xanthomonas*

Las bacterias del género *Xanthomonas* son bacilos rectos de 0,4-1,0 por 1,2-3,0  $\mu\text{m}$ , móviles por medio de un flagelo polar, puede producir un pigmento amarillo, la mayoría son de crecimiento lento (González, 1985; Rivera, 1995). Causan los tizones (manchas) foliares y lesiones necróticas en frutos de muchos cultivos, la pudrición negra de las crucíferas y el chancro de los cítricos (Arauz, 1998).

Este género incluye muchos patógenos de plantas y se ha demostrado que la mayoría de las especies que contiene no se pueden distinguir de *Xanthomonas campestris*, por consiguiente, se han agrupado 5 de las antiguas especies de *Xanthomonas* y más de 110 antiguos patógenos en la especie *Xanthomonas campestris*. Se consideran 143 patovares que tienen un amplio rango de hospederos que abarca más de 66 géneros de plantas monocotiledóneas y 160 dicotiledóneas (Llacer *et al.*, 2000).

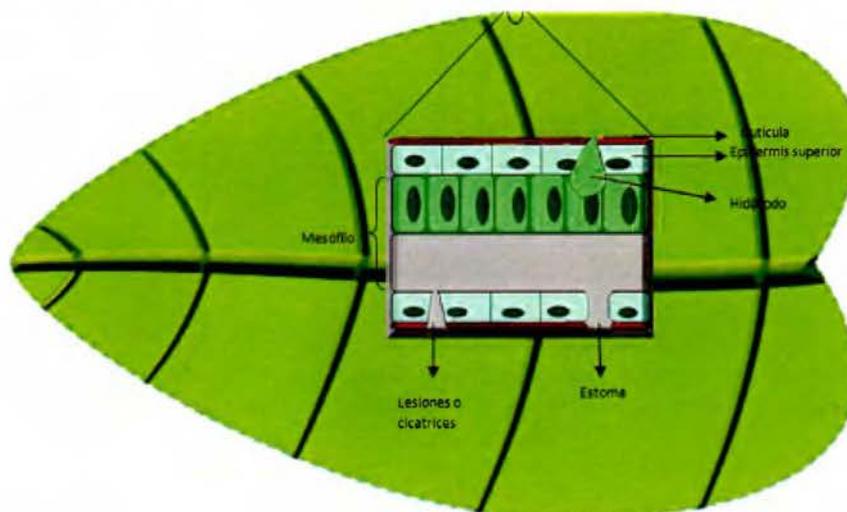
### **1.4 Interacciones entre plantas y bacterias fitopatógenas**

Las plantas y bacterias han coevolucionado juntas durante millones de años, es así como las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa, algunos de los cuales están siempre presentes, como son la cutícula, el periciclo (tejido que delimita el sistema vascular) y otras barreras preformadas que impiden la penetración bacteriana; la presión hidrostática y elementos vasculares (Trigiano, 2004). Otros mecanismos son inducidos por la presencia del patógeno, tal es el caso de la respuesta de hipersensibilidad (HR) (Llacer *et al.*, 2000).

La infección es un proceso en el cual los patógenos establecen contacto con células susceptibles y tejidos, consumiendo sus nutrientes. Luego de la infección el patógeno crece, se multiplica en los tejidos de la planta y puede llegar a colonizar e invadir más tejidos (Agrios, 2005).

La penetración de los microorganismos, bajo determinadas circunstancias es de tipo indirecta a través de heridas o penetración a través de la pared celular, por aberturas naturales de la planta como las lenticelas (poros a nivel de tallo y raíz), los estomas (poros en las hojas, que sirven para el intercambio gaseoso), por los hidátodos (poros en la hoja, que secretan agua), etc. (Figura 1). Las bacterias pueden penetrar e interactuar intracelularmente, a este nivel es que se da

el reconocimiento específico gen a gen que desemboca en la reacción compatible o incompatible (Agrios, 2005; Rivera, 1995).



**Figura 1.** Esquema de las estructuras presentes en una hoja. Se muestran algunas vías de penetración de microorganismos al mesófilo.

La penetración activa es otra forma en que las bacterias pueden ingresar a la zooglea (masa de bacterias fitopatógenas y exopolisacáridos, ubicada en los espacios apoplásticos), en la cual se produce la penetración por la generación de una fuerza hidrostática provocada por la expansión de la zooglea debido al crecimiento bacteriano y la formación de exopolisacárido, ésta es la fuerza que permite el ingreso bacteriano. A diferencia de los hongos, las bacterias no poseen enzimas cutinolíticas, importantes en los procesos de penetración, por lo que tienen que penetrar por medio de fisuras en las plantas hospederas (Lacy y Lukezic, 2003; Rivera, 1999). La penetración por heridas se produce cuando la cutícula o epidermis de la planta sufre daño mecánico, por insectos, nematodos u otros herbívoros, cortes de poda, cosecha (Arauz, 1998).

Las bacterias fitopatógenas no pueden penetrar directamente a la planta, por lo que su permanencia en la superficie vegetal no necesariamente significa infección (Arauz, 1998). La colonización de la planta y la producción de la enfermedad dependen de que la bacteria lleve a cabo diversos procesos bioquímicos específicos, como obtener nutrientes o contrarrestar la defensa del hospedero. En esto están implicados los factores de avirulencia (aquellos que contribuyen al proceso patogénico pero que no son absolutamente indispensables), son propios de cada especie de patógeno, los cuales deben de diferenciarse de los factores de patogenicidad

(aquellos indispensables para dicho proceso en cualquier circunstancia). Las plantas son capaces de detectar la presencia de bacterias patógenas y activar los sistemas de defensa. Tal es el caso de la presencia de proteínas bacterianas como las harpinas, que desencadenan una respuesta defensiva que permite frenar el crecimiento de la bacteria. Todo el proceso se encuentra regulado tanto en las plantas como en las bacterias y requiere la transducción de señales y la expresión diferencial de determinados genes (Agrios 2005; Llacer *et al.*, 2000).

Las interacciones entre bacterias fitopatógenas y plantas se clasifican en compatibles e incompatibles. Durante la interacción compatible, la bacteria se multiplica en el interior de la planta huésped hasta alcanzar niveles de población elevados que provocan el desarrollo de síntomas y la producción de enfermedad. La interacción incompatible, se da con aquellas plantas que no actúan como hospedero para un patógeno determinado y la bacteria no se multiplica significativamente (Agrios 2005; Arauz, 1998).

### **1.5 Mecanismo de defensa y Respuesta de Hipersensibilidad**

La Reacción de Hipersensibilidad (RH) es un mecanismo de apoptosis (muerte celular programada) importante en la defensa de la planta ante una interacción incompatible con un patógeno (Trigiano, 2004). La RH es la inducción rápida de necrosis observada en plantas resistentes cuando es introducido dentro del tejido de la planta, un inoculo capaz de activar el 50% o más de la respuesta de las células (Hutcheson, 1998).

Las moléculas reconocidas por la planta se denominan inductores (conocidos también como efectores) y los genes de la planta implicados en el reconocimiento de éstas moléculas se les denominan genes de resistencia. Para que se dé el reconocimiento es necesario que exista un gen de avirulencia (genes *avr*) activo en el patógeno y un gen de resistencia complementario en la planta, a esto se le conoce como interacción gen a gen, pues si alguno de los dos genes no está presente, no se presentará la RH y se producirá la enfermedad (Llacer *et al.*, 2000). Recientemente se ha encontrado que los receptores específicos son proteínas que tienen varias secuencias ricas en leucina y que están presentes en forma extra o intracitoplasmática (Arauz, 1998).

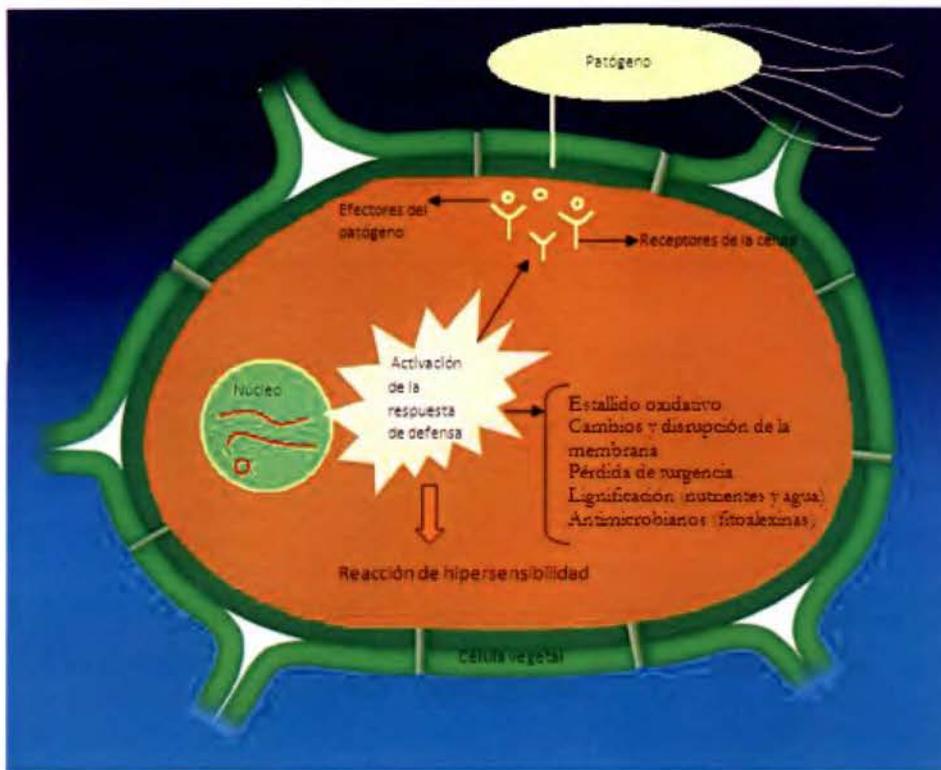
Algunos efectores son considerados tempranos, ya que son parte de la pared celular del patógeno, por ejemplo lipopolisacáridos (LPS). Otros son sintetizados por la bacteria cuando

penetra en la célula vegetal en respuesta a las señales del hospedador, éstos se conocen como efectores tardíos, producidos por genes como: *hrpZ*, *hrpN*, *hrpW*, y *hrpF*, éstos producen proteínas conocidas como harpinas (en inglés "harpin") que inducen el desarrollo de la reacción de hipersensibilidad (Agrios, 2005; Arauz, 1998).

De acuerdo con el modelo gen a gen, descrito por Crute (1997) para cada gen de resistencia en la planta existe un respectivo gen de avirulencia en la bacteria. La explicación bioquímica del modelo receptor-efector explica que cada gen de avirulencia del patógeno codifica para una proteína efectora que reconoce a una proteína receptora codificada en el gen de resistencia de la planta. El reconocimiento del efector por la planta, provoca la activación en cascada de la respuesta de defensa, la cual incluye reacciones bioquímicas, como incremento de reacciones oxidativas, incremento de la movilización iónica, disrupción de la membrana y pérdida de la compartimentalización celular, pérdida de turgencia y producción de sustancias antimicrobianas como fenoles y quitinasas (Agrios, 2005; Sharma, 2006).

El estallido oxidativo da la estimulación elevada de especies reactivas, como superóxido, peróxido de hidrógeno e hidróxido, los dos últimos pueden producir lipoperoxidación y consecuente destrucción de la membrana (Arauz, 1998; Apel, 2004) (Figura 2). La generación de las especies reactivas de oxígeno, ocurre en dos fases, una inicial, que sucede minutos después del ingreso del patógeno y una secundaria, que comienza unas tres horas después que la fase inicial ha terminado. Aunque ambas fases involucran sustratos y vías de inducción similares, las dos fases se regulan de manera independiente, ya que se observa que los patógenos incompatibles inician ambas fases de producción de las especies reactivas de oxígeno, mientras que los patógenos compatibles inducen solo la primera fase, por tanto, es inespecífica. La segunda fase depende de la expresión de los genes *avr* en la interacción patógeno-planta y la expresión del grupo de genes *hrp* (Camarena, 2006).

La reacción en los tejidos vegetales infectados va acompañada de un aumento de los niveles enzimáticos de peroxidasas, polifenoloxidasas (transforman fenoles en quinonas, que son sustancias muy tóxicas para patógenos), charcona sintetasas, catalasa y otras enzimas. Además, se produce liberación de compuestos fenólicos no tóxicos (enzimas pectinolíticas) de las vacuolas y la pérdida de electrolitos (Rivera, 1995).



**Figura 2.** Diagrama de la respuesta hipersensible por la interacción del efector de la bacteria y el receptor de la molécula de resistencia de la planta.

En los últimos años, se han identificado proteínas de defensa: tioninas y proteínas de transferencia de lípidos ("lipid transfer proteins", LTPs). Las primeras conforman una familia de proteínas de tamaño pequeño (alrededor de 5, 000 daltons), ricas en cisteína y al igual que las segundas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y se expresan constitutivamente en el tejido vegetal. En ambos casos se ha determinado que muestran actividad inhibitoria *in vitro* frente a patógenos bacterianos. El fin de este proceso de secreción de sustancias, es el aislamiento y muerte del patógeno, para impedir el avance del mismo y frenar la infección (Llacer *et al.*, 2000).

La manifestación macroscópica del proceso anterior, es la aparición de una zona necrótica rodeando el punto de entrada del patógeno, que se desarrolla en pocas horas y que se debe a la muerte y colapso de las células vegetales. La muerte celular va acompañada de una

serie de cambios físicos y bioquímicos, por una parte se refuerzan las paredes de las células vegetales mediante lignificación, lo cual produce la restricción de nutrientes y agua hacia el patógeno, y deposición de proteínas ricas en hidroxiprolina (denominadas HRGP), también se sintetizan diversos compuestos bioquímicos que pueden ser tóxicos para el patógeno (como fitoalexinas), que degradan estructuras celulares (como gluconasa o quitinasa, eficaz contra patógenos fúngicos), o que inactivan las enzimas producidas por el patógeno (como inhibidores de proteasas y poligalacturonas) (Hutcheson, 1998; Llacer *et al.*, 2000).

La RH es la magnificación de la cascada de reacciones descritas anteriormente, debido a la mayor concentración de microorganismos inoculados intencionalmente. Se utiliza mucho en el diagnóstico rápido, ya que permite seleccionar las posibles bacterias fitopatógenas entre las demás presentes en una muestra de una lesión (Arauz, 1998). No todas las bacterias fitopatógenas producen RH, pues no se presenta en *Agrobacterium tumefaciens* o cepas de *Erwinia* causantes de podredumbre blanda, pero sí ocurre en la mayoría de *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y especies de *Erwinia* causantes de marchitez (Hartman y Haywart, 1993).

Esta prueba suele realizarse en hojas de tabaco (Figura 3), pero también puede verse la RH en cualquier planta que no sea hospedero de la bacteria a inocular, pues si se usara un hospedero compatible se desarrollaría la enfermedad y no la reacción de hipersensibilidad (Llacer *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Reacción de hipersensibilidad típica en hoja de tabaco. La flecha señala el punto de inoculación.

## 1.6 Factores de Virulencia generales: Genes *hrp*

El acrónimo “*hrp*” (“hypersensitive response protein”), se utiliza para designar genes que codifican por proteínas necesarias para que la bacteria sea patógena en especies de plantas susceptibles y pueda producir RH en otras especies de plantas no hospederas (Agrios, 2005). Se ha visto que los genes *hrp* son estructural y funcionalmente conservados en las bacterias fitopatógenas (Lindgren, 1997).

Los genes *hrp* pueden actuar como genes de virulencia, ya que en las bacterias que presentan mutaciones en alguno de ellos pierden la capacidad de producir enfermedad en las plantas hospederas. Por otra parte, pueden actuar como genes de avirulencia ya que determinan que se produzca una reacción de hipersensibilidad en plantas que normalmente no son hospederas. Se ha determinado también, que las bacterias mutantes de estos genes tienen la capacidad de crecer en medios mínimos, por lo que se descarta que estos genes sean necesarios para el crecimiento o metabolismo bacteriano (Lindgren, 1997; Agrios, 2005). Se han visto relacionados con la codificación de los componentes del sistema de transporte tipo III, regulación de proteínas, inductores de la respuesta de hipersensibilidad y como enzimas involucradas en la síntesis de glucano periplásmico (Lindgren, 1997).

El sistema de transporte tipo III (“type-three secretion system” o TTSS) se encuentra en la mayoría de las bacterias gram negativas patógenas de animales y plantas, es importante para la translocación de proteínas y otras moléculas (Van Sluys, 2002). Se ha relacionado el TTSS con la patogenicidad de bacterias tales como *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* y *Pantoea*, debido a que transporta proteínas efectoras (harpinas) a través de la membrana bacteriana (generalmente a través del pili) al interior de la célula vegetal (Alfano, 2004).

Las proteínas conocidas como harpinas son parte del TTSS y tienen como características generales que son termoestables, ricas en glicina, carecen de residuos de cisteína y carecen de péptidos amino terminales, difieren en la secuencia primaria y son únicas para cada fitopatógeno (Hutcheson, 1998; Loretto y Sarrocco, 2001; Ramos, 2004).

La primera harpina se aisló de *E. amylovora*, y es producida por el gen *hrpN*, siendo secretada al exterior y donde es necesaria para el desarrollo de los síntomas de la planta y producción de la RH (Llacer *et al.*, 2000; Trigiano, 2004). También son conocidas las harpinas de tipo *hrpZ* y *hrpW* en *P. syringae* pvs. *glycinea*., en el caso de *Pantoea stewartii* se conoce la

harpina tipo *hrpN* y en *X. campestris* la harpina tipo *hrpF* (Loretti y Sarrocco, 2001; Alfano, 2004).

La secuencia de algunos genes *hrp* se ha comprobado que son muy similares a ciertos genes de patogenicidad encontrados en diversas bacterias patógenas de mamíferos como *Yersinia* y *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatógena y enterocolítica y *Pseudomonas aeruginosa* (Hartman y Haywart, 1993; Hutcheson, 1998; Alfano, 2004).

El gen *hrpZ* produce una harpina que es excretada por medio del sistema de transporte tipo III, se le ha relacionado con los LPS y permite al formar parte del pili de la bacteria, la translocación de proteínas efectoras hacia la planta (Ramos, 2004). También se ha determinado que parece ser suficiente el reconocimiento de la región C terminal para la inducción de la RH (Iacobellis, 2003). Este gen posee en su secuencia inserciones, deleciones y sustituciones de bases y por ende variaciones en los aminoácidos (Inoue, 2006). El gen se ha identificado en 28 diferentes patovares de *P. syringae*, en *Pseudomonas avellane* y en *Pseudomonas ficuserectae* (Chakowski, 1997; Inoue, 2006, Loreti *et al.*, 2001).

### **1.7 Técnicas de la prueba de hipersensibilidad en plantas de tabaco**

La prueba de hipersensibilidad en tabaco, se ha establecido como una prueba rápida de detección de bacterias fitopatógenas y separación de las bacterias saprófitas presentes en una lesión. Se han descrito en la literatura, técnicas de inoculación bacteriana para lograr la reacción de hipersensibilidad en la plantas de tabaco. La más empleada es la conocida como técnica de inyección que consiste en suspensiones de colonias de bacterias con un crecimiento de 48 horas en 5 ml en agua destilada estéril, se ajusta la concentración ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) y se inyecta en el mesófilo con aguja de calibre 25 utilizando el bisel hacia abajo. Con éste método se puede observar necrosis en un periodo de 24 horas. Las especies saprofitas no presentan síntomas de necrosis (Shaad *et al.*, 2001).

La técnica por aspersión, es la inoculación más natural, pues simula la infección en el ambiente, el patógeno puede penetrar mediante estructuras como estomas. Este método no permite resultados constantes pues depende del tiempo que duren abiertos los estomas (influye la intensidad de la luz y humedad) y de las bacterias capaces de penetrar por estos poros. La concentración de inoculo debe ser mayor a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, debido a la limitante mencionada

anteriormente. Las plantas deben mantenerse 20 horas en ambiente húmedo para que se abran los estomas y posteriormente se asperja la hoja con la suspensión bacteriana, se debe mantener a la planta en condiciones de alta humedad e iluminación. Los síntomas se desarrollan usualmente de 6 a 10 días posterior a la inoculación. La técnica de impresión se basa en la utilización de una suspensión bacteriana con una jeringa de un 1 ml sin la aguja y se ejerce una leve presión para lograr introducir el inóculo en el mesófilo de la hoja (Shaad *et al.*, 2001; Trigiano, 2004).

### **1.8 Detección e identificación de genes mediante técnicas moleculares**

El análisis de ADN es un método adecuado para una detección específica de diversos productos de interés, pues el ADN no sufre ningún cambio estructural en función del estado o crecimiento bacteriano, por lo que los resultados son más reproducibles y se pueden seleccionar genes que caractericen a cada especie fitopatógena (Llacer *et al.*, 2000).

Los protocolos de análisis genómicos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) funcionan para estudios de diversidad, detección y diagnóstico de microorganismos. La “diversidad” se refiere al grado de variaciones genéticas entre las poblaciones bacterianas y los sistemas bacterianos relacionados en múltiples niveles taxonómicos o filogenéticos, así como la estructura de las poblaciones patógenas. La “detección” se basa en establecer la presencia de un organismo específico en una muestra, mientras que “diagnóstico” es la identificación de la naturaleza y causa de la enfermedad en cuestión (Louws *et al.*, 1999).

El PCR es una amplificación enzimática *in vitro* de ADN. Se basa en la multiplicación de una secuencia de ácido nucleico y en pocas horas se puede amplificar desde cien mil hasta millones de veces la secuencia deseada. Esto lo hace una técnica sumamente sensible y además es muy específica si se diseñan correctamente los imprimadores. Si la molécula de ADN es complementaria con el imprimador, el fragmento amplificado resultante se detecta visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, por métodos colorimétricos o por hibridación (Arauz, 1998; Shaad *et al.*, 2001).

Para detectar por PCR a las bacterias fitopatógenas, es necesario disponer de imprimadores que se hayan diseñado con previo conocimiento de una secuencia de nucleótidos específica de dicha especie y son sintetizados *in vitro* de forma comercial. Las secuencias utilizadas deben ser seleccionadas por su especificidad para que estén presentes en todas las

cepas de dicha especie y no se encuentren secuencias homólogas en otros microorganismos. El diseño de los imprimadores se realiza según el grado de especificidad deseado y se suelen seleccionar dos secuencias de nucleótidos separadas por algunos centenares de bases (Llacer *et al.*, 2000).

Otro tipo de imprimadores para PCR que son utilizados son llamados “degenerados”, cuando algunas de las posiciones pueden tener diferentes posibilidades de bases nitrogenadas para así permitir el alineamiento y la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas. Por ejemplo, en el imprimador GG(CG)A(CGT)A, la tercera posición puede ser C ó G y la quinta posición puede ser C ó G ó T. Los imprimadores degenerados se pueden utilizar para amplificar secuencias conservadas de un gen o de genes del genoma de un organismo (Linhart, 2005).

Algunos de los problemas que se pueden presentar cuando se utilizan imprimadores degenerados son la inhibición competitiva, en la que los imprimadores se alinean al ADN correcto pero no son extendidos por la polimerasa, debido a que los extremos 3' son inestables, lo que provoca que los primeros ciclos de PCR sean altamente ineficaces. Otro problema es el apareamiento falso o no específico debido a que los imprimadores son altamente degenerados pues contiene muchos sitios de alineamiento, provocando disminución de la especificidad, para evitarlo se puede intentar la optimización de la temperatura del alineamiento o el reajuste de los imprimadores (Gilmartin, 2002).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La agricultura es un sector vital en la mayoría de las economías, al ser la fuente fundamental de alimentos para el ser humano. Este sector es uno de los más perjudicados, con pérdidas económicas por efectos ambientales y diversas enfermedades por microorganismos, que disminuyen significativamente su producción. Después de los hongos, las bacterias constituyen un grupo de patógenos, con el segundo nivel en importancia, tomando en cuenta el número y gravedad de las enfermedades que producen (Sandoval, 2004).

Según el boletín agropecuario N° 18 de Costa Rica (2008), el sector primario de Costa Rica (incluye agricultura, silvicultura, pesca y la extracción de minas y canteras) generó para el año 2007 el 10.1 % del Producto Interno Bruto (PIB). Además, el valor agregado del sector agropecuario fue de 1.020.589 millones de colones para el 2007, siendo el sector agrícola el principal sector primario, ya que generó 689.388 millones de colones. También se muestra que para el 2007 del total de la población económicamente activa en Costa Rica un 13.1% depende sus ingresos del sector agropecuario, indicando que es el segundo sector de importancia a nivel de generación laboral del país. Gran parte de nuestro país está dedicado a la agricultura, ya que poco más de 450 000 hectáreas, están dedicadas a cultivos agrícolas (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2002).

Los datos anteriores muestran la importancia del sector agrícola en Costa Rica, debido a que utiliza gran parte de la tierra, recursos y población para su desarrollo y por ende es relevante conocer la etiología, características patogénicas y realizar un diagnóstico eficaz de las bacterias patógenas causantes de daños en los principales cultivos.

El diagnóstico de enfermedades agrícolas por bacterias está basado primeramente en los síntomas. Posteriormente, se realiza la identificación bioquímica y morfológica de las bacterias aisladas, pero esto no permite de manera concluyente diferenciar entre las bacterias patógenas y las saprofitas que se encuentran normalmente en la planta. Es por esto que para el diagnóstico es importante realizar la prueba de hipersensibilidad en tabaco, ya que permite discriminar entre ambos tipos de bacterias presentes en la planta. Es útil cuando se analizan aislamientos de diferentes cultivos, o cuando por diferentes razones es difícil la realización de los postulados de Koch en el hospedero. Por tanto, es importante implementar en el diagnóstico de enfermedades

en plantas, una herramienta de tamizaje como la reacción de hipersensibilidad, que brinde una diferenciación rápida entre las bacterias saprófitas y las patógenas.

La presencia del gen *hrpZ*, es un indicador molecular de la presencia del sistema de transporte tipo III, se realiza la detección de dicho gen con el fin de diagnosticar a nivel molecular la fitopatogenicidad en bacterias.

En el futuro, para el control de enfermedades en plantas, además de la utilización de los bactericidas, se espera contar con nuevas tecnologías de control de enfermedades basadas en el conocimiento básico de las interacciones planta-patógeno y los genes involucrados, para así crear nuevas estrategias de combate efectivas para el control de bacterias fitopatógenas (Montecinos, 2000).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar la patogenicidad potencial de una colección de bacterias gram negativas aisladas de lesiones de diversos cultivos agrícolas, mediante la prueba de hipersensibilidad en plantas de *Nicotiana tabacum* y la detección molecular del gen efector *hrpZ*.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Optimizar la técnica adecuada para la realización de la prueba de reacción de hipersensibilidad en plantas de *Nicotiana tabacum*.
2. Tamizar con la prueba de reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco, una colección de bacterias gram negativas aisladas de lesiones de plantas con el fin de determinar su patogenicidad potencial.
3. Determinar mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) las cepas que posean el gen *hrpZ*, que codifica para efectores en bacterias fitopatógenas.
4. Relacionar la presencia y/o ausencia de los genes *hrpZ* con los tipos de reacción de hipersensibilidad observada en plantas tabaco.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Ubicación

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), ubicado en la Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

### 4.2 Colección bacteriana

Para este estudio se analizaron 127 aislamientos de bacterias gram negativas pertenecientes a la colección del CIBCM, correspondiente a bacterias aisladas de las lesiones de diversas hortalizas, vegetales y frutas. Se identificaron 9 cepas en el grupo *Psychrobacter*, 4 cepas como *Stenotrophomonas maltophilia*, 11 cepas en el grupo *Pseudomonas putida*, 18 cepas en el grupo *Pseudomonas chlororaphis*, 3 cepas en el grupo *Pseudomonas syringae*, 40 cepas en el grupo *Pseudomonas* sp, 19 cepas como bacterias entéricas (*Erwinia*, *Pantoea*, *Klebsiella* y *Enterobacter*), 13 cepas como bacilos gram negativos no entéricos, 5 cepas como *Acinetobacter* sp, 2 cepas como *Sphingobacterium thalpophilum*, una cepa *Ochrobactrum* sp, una cepa *Delftia acidovorans* y una cepa *Aeromonas caviae* (Robayo, 2008) (Anexo)

Se completó la identificación de 27 bacterias de dicha colección, por lo que se les realizaron pruebas bioquímicas y moleculares (análisis de restricción con la enzima RSA I) y con el fin de hacer los datos comparables, se utilizó el mismo protocolo planteado por Robayo (2008).

Se utilizaron como controles las bacterias *E. carotovora*, (Universidad de Costa Rica (UCR), 274; American Type Culture Collection (ATCC), 495), *Escherichia coli* (UCR, 57; ATCC, 21922), perteneciente a la bacterioteca de la facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Además, se utilizó *P. syringae* aislada e identificada por secuenciación en el CIBCM.

### 4.3 Plantas de tabaco

Se emplearon plantas de tabaco de la especie *Nicotiana tabacum*, de edad de 2 a 3 meses, donadas por el vivero Linda Vista de Cartago. Se mantuvieron en condiciones ambientales del invernadero del laboratorio de microbiología agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica. Las plantas fueron aclimatadas durante un período aproximado de un mes.

### 4.4 Estandarización de la Prueba de Reacción de Hipersensibilidad en plantas de Tabaco.

En la estandarización se usó como control positivo la cepa MA-37, identificada como *Pseudomonas syringae* por secuenciación del gen ribosomal 16S (ADNr 16S) y *E. carotovora* (UCR, 274; ATCC, 495). Todas las bacterias fueron inoculadas por duplicado en las hojas de tabaco. El control negativo utilizado fue agua destilada estéril.

#### 4.4.1 Concentración del inóculo

Se probaron concentraciones del inóculo en el rango teórico esperado correspondiente a  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  UFC/ml. Se siguió el protocolo de la técnica planteada por Trigliano (2004), en la cual se resuspendió en agua destilada estéril colonias aisladas de un cultivo de 24 horas en medio MP (Anexo), incubado a 28°C y luego se centrifugó a 14,000 r.p.m, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en agua destilada estéril y se midió en espectrofotómetro hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, que equivale a una densidad óptica de 0.2 a 600 nm.

Para determinar la concentración bacteriana óptima con la cual se obtuviera la RH más evidente, se evaluaron concentraciones estándar de turbidez de 0.5 de Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml), patrones estándar de turbidez de la casa comercial Biolog®, para bacterias gram negativas no entéricas (NENT), concentración aproximada de  $6 \times 10^8$  UFC/ml, semejante al estándar 2 de Mac Farland, (Rodríguez *et al* 2005), bacterias gram negativas entéricas (ENT), concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml y bacterias cocos gram positivos, concentración

aproximada de  $1.2 \times 10^9$  UFC/ml, semejante al estándar 4 de Mac Farland (Rodríguez *et al*, 2005).

Se probaron las concentraciones mencionadas anteriormente, con suspensiones bacterianas de *E. carotovora* y *P. syringae*, en una misma hoja y con la misma bacteria, con el fin de evaluar y comparar las intensidades de la reacción hipersensible.

#### **4.4.2 Medio de cultivo**

Con el fin de lograr una mayor expresión de la patogenicidad de los aislamientos, se utilizó para el crecimiento de la bacteria el medio de cultivo MP, que es un medio que imita el ambiente en la planta, y permite la expresión favorable de enzimas como la pectato liasa. (Shaad, *et al*, 2001) (Anexos).

#### **4.4.3 Protocolo inoculación**

Para la inoculación en las plantas de tabaco, se utilizaron tres protocolos basados en los mencionados por Klement *et al.*, 1990 y Trigiano *et al.*, 2004. El fin de estas técnicas es lograr una inoculación adecuada de una suspensión bacteriana en la zona del mesófilo de la hoja, esto para lograr la interacción bacteria-planta.

Se utilizó un cultivo puro de la bacteria a analizar con un crecimiento de 24 horas en agar MP incubado a 28°C. Utilizando torundas estériles se realizó una resuspensión de las colonias en 3 a 5 ml de agua destilada estéril, hasta alcanzar una concentración visual semejante al estándar de turbidez (concentración aproximada  $6 \times 10^8$  UFC/ml).

A partir de dicha suspensión bacteriana se ensayaron las técnicas de inoculación:

##### **1. Técnica con jeringa**

Se evaluaron diferentes calibres de aguja inicialmente con bisel número 27, luego con jeringa de 1 ml con aguja número 29. Se colocó la suspensión bacteriana en la jeringa estéril y se inoculó con el bisel hacia arriba (similar a la técnica de inyección intradérmica) de 0.5 a 1 ml en la lámina de hoja de tabaco.

## 2. Técnica de aspersión

Se transfirió la suspensión bacteriana a un dispositivo rociador desinfectado. Se impregnó por aspersión (aproximadamente 0.5 ml) una vez la superficie de la hoja de tabaco sin lesiones.

## 3. Técnica de impresión

Se transfirió la suspensión bacteriana a una jeringa de 1 ml estéril, sin la aguja. Se colocó la hoja de la planta de tabaco sobre una placa de Petri estéril (esta funciona como soporte para la hoja) y se ejerció una presión leve (impresión) y suaves giros sobre el mismo eje, esto para lograr una herida superficial sobre el área de la hoja (Figura 4). Posteriormente se procedió a inocular aproximadamente 0.5 ml de la suspensión bacteriana, verificando que penetrará en el mesófilo de la hoja. Se usó como control negativo agua destilada estéril, utilizando la misma metodología.



**Figura 4.** Técnica de Impresión, demostración de la inoculación en el mesófilo en hojas de tabaco. Se muestra la colocación de la hoja de tabaco sobre el soporte (placa de Petri) y la colocación de la jeringa para alcanzar un área amplia de inoculación de la suspensión bacteriana, la flecha señala un área recién inoculada, demostrando una buena penetración al mesófilo de la hoja.

En cada planta solo se utilizó un máximo de 3 hojas y en cada hoja se inoculó un máximo de 5 bacterias, además del control negativo. Además, cada cepa se inoculó por duplicado a partir de la misma suspensión bacteriana.

Todas las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero por un periodo de un mes para estandarizar la técnica. Inicialmente se observaron las plantas, todos los días durante la primera semana, y posteriormente se supervisó una vez por semana para determinar los cambios macroscópicos. Además, todas las reacciones se fotodocumentaron y se registraron en una base de datos con el fin de comparar entre especies y géneros.

#### **4.5 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de genes *hrpZ***

Se utilizó ADN de la colección de 127 bacterias aisladas de diversas lesiones de cultivos agrícolas. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen *hrpZ* según la metodología descrita por Loreti *et al.* (2001), que utiliza oligonucleótidos degenerados, diseñados a partir de secuencias de *hrpZ* de patovares de *P.syringae*.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en volúmenes de 50  $\mu$ L, utilizando los imprimadores DEG1R: 5'RTCRTCCATRAANTSNGCDATYTT3' y DEG 2F: 5'CYGCTACYTTKRGRWGGKYGTTK3', a una concentración de 10  $\mu$ M, dinucleótidos trifosfato a una concentración de 12,5  $\mu$ M,  $MgCl_2$  a 25 mM, BSA a 10 mg/ml, tampón *Taq* ADN polimerasa con KCl y sin  $MgCl_2$  a concentración final de 1X y *Taq* polimerasa 1 U (Ver protocolo en anexo, Cuadro 6). Las reacciones se incubaron en un termociclador PT-100 (MJ Research, Inc.). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización de 3 minutos a 94°C, seguido de 36 ciclos: desnaturalización de 1 minuto a 94°C, alineamiento de 2 minutos a 65°C, extensión de 2 minutos a 72°C y por último una extensión de 5 minutos a 72°C.

Todos los productos de la PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con amortiguador TBE 1X (ver composición en anexo) utilizando como marcador molecular Gene Ruler de 100 pb Plus DNA de la casa comercial Fermentas, en cada uno de los geles. Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (Fisher Scientific), con fuente de poder modelo200/2.0 (BioRad).

Para la visualización de los productos de amplificación los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (concentración 1 mg/ml), entre 6-15  $\mu$ l según el tamaño del gel, para teñir el producto molecular y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta con cámara oscura Kodak EDAS 290. Se tomaron fotografías de los geles por medio de una cámara digital Kodak KDC290, utilizando el software propio de la cámara (versión 1.2).

#### **4.6 Confirmación de la patogenicidad en hojas y tallo de lechugas**

Para comprobar los resultados de la prueba de RH, sobre todo en el caso de reacciones atípicas, se decidió analizar la fitopatogenicidad de las bacterias aisladas de lesiones en lechuga, y así comparar con las diferentes reacciones observadas en la prueba hipersensible y concluir si realmente éstas indicaban patogenicidad. Se realizó solamente en las bacterias aisladas de lechuga debido a la disponibilidad de las plántulas, ya que la colección de bacterias analizadas provienen de diferentes hospederos y se tuvo mayor facilidad de obtener de ésta planta. Se utilizaron plantas de lechugas criolla de la especie *Latuca sativa*, donadas por la Msc. Amy Wang, del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC), Universidad de Costa Rica. Se inocularon las siguientes cepas bacterianas: MA-112, MA-5, MA-49, MA-40, MA-106, MA-82, MA-121, MA-111 y MA-106, utilizando como control negativo agua destilada estéril y *E.coli*. Las plantas fueron inoculadas mediante dos técnicas, por impresión y por lesión del tallo de la planta de lechuga. Se empleó una planta de lechuga por cada bacteria y por cada prueba, se montó por duplicado cada cepa.

El experimento utilizó un cultivo de 24 horas en medio MP, se procedió a realizar una suspensión bacteriana en 3 ml de agua destilada estéril (concentración aproximada de  $3 \times 10^8$  UFC/ml) y se colocó en una jeringa de 1 ml, se aplicó mediante la técnica de impresión, explicada anteriormente y posteriormente se incubó a temperatura ambiente.

Además, con la misma suspensión bacteriana se procedió a la segunda técnica planteada por Shaad *et al* (2001), en la cual se realizó una leve lesión con bisturí estéril en el tallo de la hoja de lechuga y se inoculó por goteo. Se cubrió la planta con una bolsa plástica para brindar un ambiente apto para una la mejor penetración de la bacteria en el tallo y se mantuvo a temperatura ambiente. Luego de 4 días se le retiró la bolsa y se observó si se presentaban síntomas de infección de las hojas o tallo en las lechugas.

Las plantas de lechuga se observaron durante 15 días, para darle seguimiento al desarrollo de la infección.

#### **4.7 Metodología de análisis**

Es un estudio de tipo cualitativo, sin embargo se observó la frecuencia de cada intensidad de reacción hipersensible mediante porcentajes.

Las inoculaciones en la plantas de tabaco se realizaron por duplicado, para comprobar los resultados y reproducibilidad de la prueba.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estandarización de la técnica de inoculación en plantas de tabaco.

Con respecto a la concentración del inóculo al utilizar *P. syringae*, se observaron resultados típicos de una reacción hipersensible, presentándose una zona necrótica en menor tiempo y con mayor intensidad, utilizando el control de turbidez de concentración aproximada a  $6 \times 10^8$  UFC/ml (Figura 5D). Al utilizar la misma bacteria con el patrón de concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, se manifestaron reacciones de hipersensibilidad de menor intensidad, con una necrosis restringida al área inoculada. (Figura 5C). Al utilizar *E. carotovora* con respecto a la diferencia de concentraciones, se observan los mismos resultados en comparación con *P. syringae*, con la diferencia de presentar reacción hipersensible de menor intensidad (Figura 5A y 5B). Por el contrario, con la concentración de aproximada de  $1.2 \times 10^9$  UCF/ml (Figura 5E y 5F) no se observaron manifestaciones de reacción hipersensible



**Figura 5.** Diferentes intensidades de reacción hipersensible, 13 días posterior a la inoculación, utilizando dos tipos de estándares de turbidez. **A.** *E. carotovora* utilizando una concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml **B.** *E. carotovora* utilizando una concentración aproximada de  $6 \times 10^8$  UFC/ml **C.** *P. syringae* utilizando una concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml **D.** *P. syringae* utilizando una concentración aproximada de  $6 \times 10^8$  UFC/ml. **E.** *E. carotovora* utilizando una concentración aproximada de  $1.2 \times 10^9$  UFC/ml. **F.** *P. syringae* utilizando una concentración aproximada de  $1.2 \times 10^9$  UFC/ml. **G.** Controles de agua destilada estéril.

Se utiliza la concentración aproximada de  $6 \times 10^8$  UFC/ml, para tamizar la colección de 127 bacterias de la colección del CIBCM.

Al evaluar los instrumentos utilizados para inocular las bacterias, se observó que en la técnica de inoculación utilizando jeringa con aguja, a pesar de ser la técnica recomendada en la literatura, no se lograba una adecuada penetración de la bacteria, ya que se traspasaba la hoja. Con la técnica de aspersión no se obtuvo ningún tipo de alteración en la hoja.

Se determinó que la técnica de inoculación por impresión utilizando la jeringa sin aguja permitió que la suspensión bacteriana penetrara adecuadamente al sector del mesófilo de la hoja, obteniéndose varias intensidades en la reacción de hipersensibilidad. Por este motivo fue la técnica escogida para evaluar la colección de 127 aislamientos de cultivos agrícolas con síntomas de infección bacteriana.

## 5.2 Evaluación de la Prueba de Hipersensibilidad en tabaco

Las evaluaciones de severidad se analizaron tomando en cuenta el desarrollo de los síntomas, con los cuales se definió una escala visual de cruces (+) dentro de un rango de 0 a 5.

**Cuadro 1.** Evaluación de la escala visual de los síntomas desarrollados en las plantas inoculadas y su respectiva interpretación.

<b>Escala</b>	<b>Interpretación (Figura 6)</b>
0	No se presenta síntomas
1+	Leve clorosis
2+	Clorosis moderada
3+	Clorosis intensa, mas una leve necrosis
4+	Necrosis
5+	Necrosis, con desplazamiento de la lesión.



**Figura 6.** Diferentes tipo de reacción de hipersensibilidad observadas en hojas de tabaco **A.** Reacción de 1+, es una clorosis muy leve **B.** Reacción de 2+, es una clorosis de intensidad intermedia **C.** Reacción de 3+, presenta clorosis intensa, además puede presentarse una leve necrosis. **D.** Reacción de 4+, tipo necrótico, se desarrolla únicamente en la zona inoculada **E.** Reacción de 5+, presenta necrosis, se extiende fuera de los límites del área de inoculación. **F.** Reacción 0 (Negativa), no se observan cambios en la hoja.

### 5.3 Tamizaje de colección bacteriana en hojas de tabaco.

Se evaluó la capacidad de una colección de 127 bacterias gram negativas aisladas de lesiones de distintos cultivos agrícolas de producir RH, utilizando la técnica de impresión. Se obtuvo una gran variedad de intensidades de reacciones, desde la no aparición de síntomas (cero cruces), reacción hipersensible atípica, clorosis (1, 2 y 3 cruces), hasta la presencia de una reacción típica hipersensible (4 y 5 cruces) caracterizada por el desarrollo de necrosis localizada.

Se observó que los primeros síntomas se presentaron a partir de los 3 días posteriores a la inoculación, observándose solo leve clorosis, por lo que se determinó continuar la lectura hasta un mes, y observar si evolucionaba a una reacción hipersensible típica.

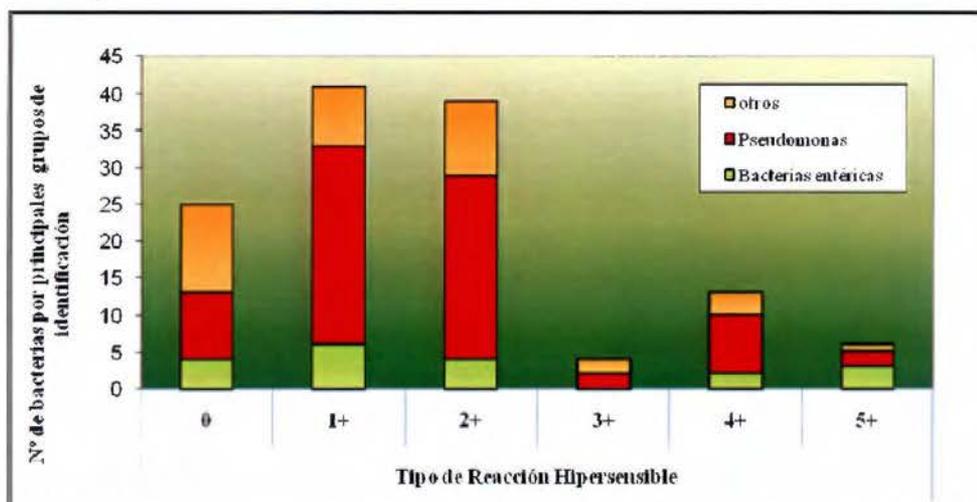
**Cuadro 2.** Resultados de la Reacción Hipersensible en tabaco de bacterias gram negativas, aisladas de diversas lesiones de cultivos agrícolas, pertenecientes a la colección del laboratorio del CIBCM.

IDENTIFICACION DE BACTERIAS	TIPO DE REACCIÓN HIPERSENSIBLE					
	0	1+	2+	3+	4+	5+
<b>Bacterias gram negativas entéricas</b>	MA-20, MA-30, MA-38, MA-65	MA-8, MA-24, MA-27, MA-35, MA-50 <sup>2</sup> , MA-133	MA-11, MA-55, MA-89, MA-115 <sup>2</sup>		MA-118, MA-123 <sup>1</sup>	MA-19 <sup>1</sup> , MA-36 <sup>1</sup> , MA-122 <sup>1</sup>
<b>Grupo <i>Pseudomonas putida</i></b>		MA-15, MA-31, MA-83 MA-75.	MA-7, MA-16, MA-41, MA-44, MA-56, MA-79		MA-33	
<b>Grupo <i>Pseudomonas chlororaphis</i></b>	MA-5, MA-6, MA-48, MA-73	MA-13, MA-40, MA-69, MA-72, MA-81	MA-67, MA-68, MA-101, MA-138, MA-141		MA-85 <sup>1</sup> , MA-90, MA-95 <sup>1</sup> , MA-104 <sup>1</sup>	
<b>Grupo <i>Pseudomonas syringae</i></b>					MA-37 <sup>1</sup> , MA-49	MA-70 <sup>1</sup>
<b><i>Pseudomonas</i> sp.</b>	MA-46, MA-88, MA-103, MA-111, MA-143	MA-3, MA-17, MA-26, MA-34, MA-45, MA-51, MA-57 <sup>2</sup> , MA-60, MA-76 <sup>2</sup> , MA-82, MA-93, MA-105, MA-116, MA-119, MA-127, MA-129, MA-139	MA-9, MA-23, MA-42, MA-43, MA-61, MA-80, MA-84, MA-86, MA-97, MA-110, MA-112 <sup>2</sup> , MA-124, MA-128, MA-135	MA-107, MA-113	MA-91	MA-140
<b><i>Psychrobacter</i> sp.</b>	MA-1, MA-12	MA-39	MA-4, MA-10, MA-22, MA-98 <sup>2</sup>	MA-132	MA-2	MA-130
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (<i>Xanthomonas</i>)</b>			MA-53, MA-54 <sup>2</sup> , MA-78		MA-52	
<b><i>Sphingobacterium thalpophilum</i></b>	MA-92,			MA-18		
<b><i>Ochrobactrum</i> sp.</b>	MA-59					
<b><i>Delftia acidovorans</i></b>			MA-74,			
<b><i>Aeromonas caviae</i></b>			MA-77			
<b><i>Acinetobacter</i> sp.</b>	MA-28, MA-29,	MA-14, MA-32				
<b>Otros gram negativos no entéricos</b>	MA-87, MA-99, MA-102, MA-125, MA-136, MA-142	MA-106, MA-117, MA-121, MA-131, MA-126	MA-96		MA-120 <sup>1</sup>	
<b>TOTAL DE CEPAS</b>	<b>25</b>	<b>40</b>	<b>39</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>6</b>

Datos de identificación tomados de Robayo (2008)

<sup>1</sup>Observar el tipo de reacción hipersensible típica en la Figura 8. <sup>2</sup>Observar el tipo de reacción hipersensible atípica en la Figura 9.

**Gráfico 1.** Tendencia de los principales grupos de identificación y su correlación con el tipo de reacción de hipersensibilidad.



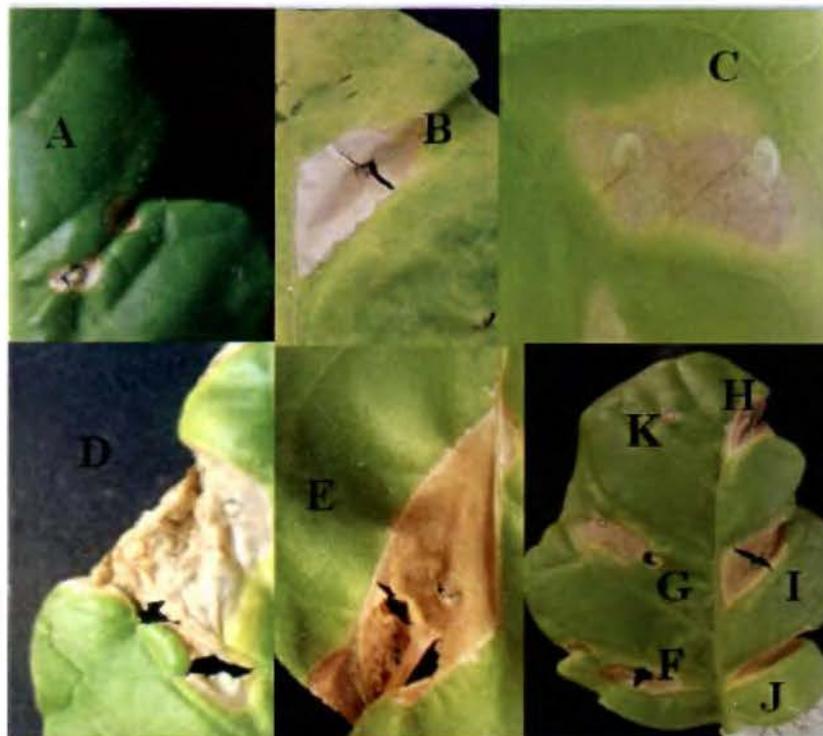
Se muestra en el gráfico 1, la tendencia de las cepas evaluadas. En el caso del género *Pseudomonas* tuvo la variedad de presentar todos los tipos de reacciones de hipersensibilidad, con mayor frecuencia en reacciones de hipersensibilidad atípicas (1 y 2 cruces), por otro lado el grupo de bacterias entéricas no presentó reacción de 3 cruces.

La cepa MA-49 fue la única que presentó una reacción de hipersensibilidad típica a las 24 horas, iniciando por una coloración oscura en la zona inoculada, hasta evolucionar a una reacción típica hipersensible en el transcurso de un mes, se caracterizó por una necrosis de tonalidad café-negro (Figura 7).

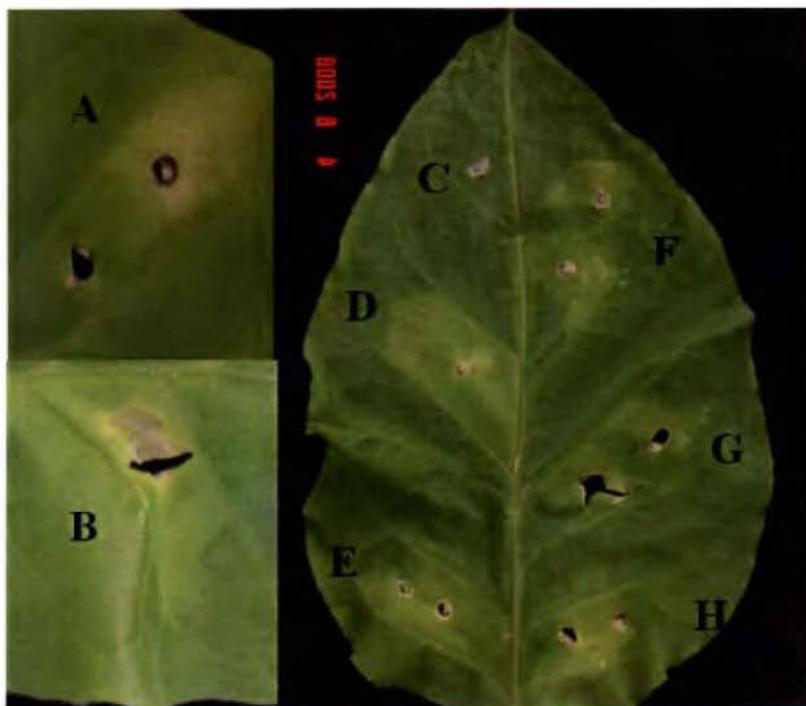


**Figura 7.** Reacción de hipersensibilidad en hoja de tabaco, desarrollada por la cepa MA49. **A.** A las 24 horas posteriores a la inoculación, se observa coloración oscura en el área inoculada. **B.** Evolución a reacción hipersensible (4+), lectura final de un mes.

Las bacterias que presentaron una reacción hipersensible en hojas de tabaco, se caracterizaron por presentar necrosis limitada a la zona de inoculación, con excepción de la bacteria MA-122, que presentó extensión de la necrosis (Figura 8 D). Ciertas lesiones necróticas se observaron rodeadas por un halo de clorosis, además, la mayoría presentó tonalidades oscuras (café-negro), con excepción de la bacteria MA-19, debido a que mostró coloración más clara (Figura 8 B).



**Figura 8.** Reacciones hipersensibles típicas, en hoja de tabaco se presentan algunas de las cepas que presentaron valores de 4 a 5 cruces. **A.** Aislamiento MA-123 se observa lesión delimitada al sector de inoculación. **B.** Aislamiento MA-19, presenta lesión necrótica color crema. **C.** Aislamiento MA-37, lesión hipersensible necrótica y halo clorótico. **D.** Aislamiento MA-122, la necrosis se extiende del área de inoculación. **E.** Aislamiento MA-70, este tipo de necrosis fue la más común. **F.** Cepa MA-120. **G.** Cepa MA-85. **H.** Cepa MA-36. **I.** Cepa MA-104. **J.** Cepa MA-95. **K.** Control negativo, agua destilada estéril.



**Figura 9.** Reacciones hipersensibles atípicas, (clorosis), se presentan algunas bacterias que presentaron valores de 1 a 2 cruces. **A.** Cepa MA-98, se muestra cómo la clorosis se delimita al área de inoculación. **B.** Cepa MA-57 **C.** Control negativo, agua destilada estéril. **D.** Cepa MA-50. **E.** Cepa MA-76. **F.** Cepa MA-54. **G.** Cepa MA-115. **H.** Cepa MA-112.

Un 67% de las bacterias presentaron reacciones de hipersensibilidades atípicas, caracterizadas por el desarrollo de una zona clorótica cercana al punto de inoculación de la suspensión bacteriana (Figura 9). Al ser esta una respuesta no esperada y ya que la mayoría de la colección la presentó, se decidió que era importante comprobar la patogenicidad en al menos un hospedero.

#### **5.4 Prueba de patogenicidad en plantas de lechugas**

Debido a la gran cantidad de respuestas atípicas se decidió inocular aislamientos de la colección obtenidos de lechuga en plantas de lechuga, para poder determinar si realmente eran patógenos de esta planta y comparar con los resultados de la RH.

Se obtuvieron síntomas de infección evidentes al inocular con la técnica de impresión las cepas MA-112, MA-5, MA-49, MA-10, MA-106, MA-82, MA-121 y MA-111, aisladas de lechugas. Con la técnica de lesión en el tallo, la mayoría de los resultados fueron negativos con la excepción de la bacteria MA-40 y MA-82, que 3 días después de la inoculación, presentaron síntomas de infección, por marchitamiento total de la hoja lesionada (Cuadro 3, Figura 10). La inoculación en la planta de lechuga, del control negativo de la cepa de *E. coli*, no presentó síntomas de infección.

**Cuadro 3.** Resultados de la inoculación de plantas de lechugas, utilizando la técnica de impresión en hoja y por lesión del tallo, utilizando una concentración aproximada de  $6 \times 10^8$  UFC/ml.

<b>Cepa</b>	<b>Reacción hipersensible en plantas de tabaco</b>	<b>Técnica de impresión en plantas de lechuga</b>	<b>Técnica de lesión en tallo en plantas de lechuga</b>
<b>MA-111</b>	0	Clorosis de la hoja	No presenta síntomas
<b>MA-5</b>	0	Presenta zona necrótica	No presenta síntomas
<b>MA-106</b>	1+	Clorosis de la hoja	No presenta síntomas
<b>MA-121</b>	1+	Marchitamiento de la hoja	No presenta síntomas
<b>MA-40</b>	1+	Marchitamiento de la hoja	Marchitamiento <sup>1</sup> de la hoja
<b>MA-82</b>	1+	Marchitamiento de la hoja	Marchitamiento <sup>1</sup> de la hoja
<b>MA-112</b>	2+	Presenta zona de parcial marchitamiento	No presenta síntomas
<b>MA-49</b>	4+	Presenta zona necrótica	No presenta síntomas

<sup>1</sup> Resultados obtenidos a las 72 horas de la inoculación.

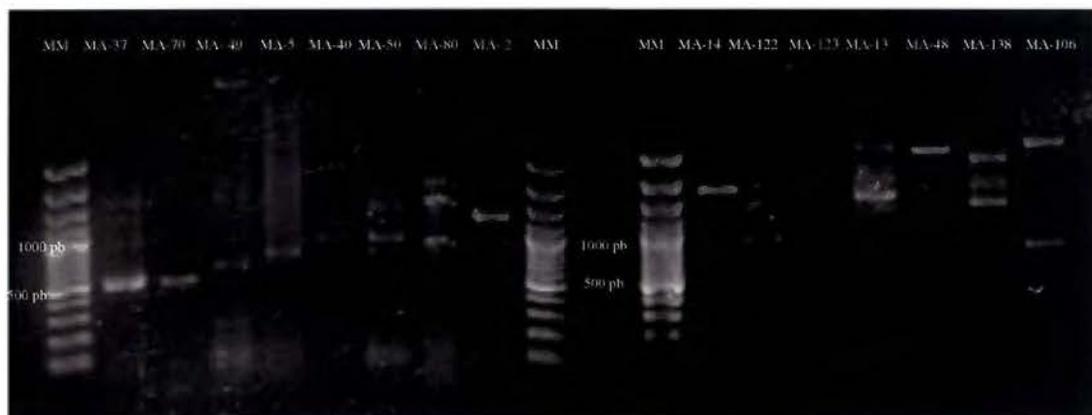


**Figura 10.** Resultados de la inoculación de hojas de lechuga, lectura final. **A.** Lesión por la bacteria MA-82, por técnica de impresión, se observa marchitamiento y necrosis en varias hojas. **B.** Lesión por bacteria MA-112, por técnica de impresión, se muestra cómo en esta infección no se da marchitamiento total de la hoja, sino solo alrededor de los sitios de inoculación, presentándose necrosis y halo de clorosis **C.** Lesión por bacteria MA-49, marchitamiento total de la hoja, por técnica de impresión. **D.** Acercamiento de la hoja totalmente infectada por la por bacteria MA-49 **E.** Control negativo de la técnica de impresión, se utilizó agua destilada estéril. Se señala por flechas el punto de inoculación.

### 5.5 Pruebas Moleculares: Detección del gen *hrpZ*.

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen *hrpZ*, pero no se obtuvo amplificación del gen, con las condiciones descritas por Loreti *et al.* (2001). Se intentó estandarizar, evaluando variaciones en las concentraciones del ADN y cambios en la temperatura de alineamiento. La reacción de PCR modificando la temperatura de alineamiento a 55 °C, logró la amplificación de una banda de 500-600 pares de bases (pb) en los controles positivos (cepa MA-37 y MA-70), correspondientes a *Pseudomonas syringae*. El fragmento esperado debía oscilar entre 468 pb y 519 pb, para el género de *Pseudomonas* como lo describe el protocolo. Se procedió a analizar la colección de los 127 ADN bacterianos.

Se logró la amplificación de productos de ADN solo 15 bacterias, de las cuales la MA-37 y MA-70 corresponden a los controles positivos. Se obtuvieron diferentes patrones de amplificación y tamaño de banda, en relación a los controles (Figura 11).



**Figura 11.** Separación electroforética en geles de agarosa al 1% de los productos de amplificación del gen *hrpZ* de cepas de bacterias. MM= marcador de peso molecular 100pb, casa comercial Fermentas

Al correlacionar la reacción hipersensible con la presencia de amplificación del gen *hrpZ*, se determinó que solo las cepas MA-37, MA-70 y MA-49 generaron productos de amplificación del tamaño esperado y reacción hipersensible típica. Las otras cepas que presentaron

amplificación de productos fueron de una o varias bandas de tamaños diferentes a los esperados (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Correlación entre los resultados de amplificación del gen *hrpZ* e intensidad de la reacción hipersensible.

Cepas que presentaron amplificaron de bandas	Número de bandas y tamaño aproximado (pb)	Reacción hipersensible en tabaco	Identificación
MA-70	500 pb	Típica (5+)	Grupo <i>Pseudomonas syringae</i>
MA-122	800 pb, 1000pb	Típica (5+)	Bacilo gram negativo entérico
MA-2	800 pb, 1200 pb	Típica (4+)	Grupo <i>Psychrobacter</i>
MA-37	500 pb	Típica (4+)	Grupo <i>Pseudomonas syringae</i>
MA-49	550 pb	Típica (4+)	Grupo <i>Pseudomonas syringae</i>
MA-123	800 pb, 1000 pb	Típica (4+)	Bacilo gram negativo entérico
MA-80	850 pb, 1200 pb, 1300 pb	Atípica (2+)	Grupo <i>Pseudomonas</i> sp.
MA-138	800 pb, 900 pb, 1200 pb, 2500 pb	Atípica (2+)	Grupo <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
MA-13	1000 pb, 1200 pb, 1300 pb, 2500 pb	Atípica (1+)	Grupo <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
MA-14	1250 pb	Atípica (1+)	Acinetobacter sp.
MA-40	850 pb	Atípica (1+)	<i>Pseudomonas</i> sp.
MA-106	400 pb, 900 pb, 3000 pb	Atípica (1+)	Bacilo gram negativo no entérico
MA-5	800 pb	Negativa	Bacilo gram negativo no entérico
MA-48	1250 pb, 2500 pb	Negativa	Grupo <i>Pseudomonas</i> sp.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Estandarización de la técnica de inoculación en plantas de tabaco.

La utilización de jeringas con aguja de calibre 27 y 29, a pesar de ser las más empleadas para este tipo de experimento (según la literatura), no se logró introducir la suspensión bacteriana en el mesófilo, debido a que se atravesaba la hoja. Al utilizarse las jeringas de 1 ml con aguja, se logró solo inocular una pequeña zona, por lo que no se obtuvieron los resultados esperados, debido a que lo ideal es un inóculo distribuido en una mayor área, para alcanzar la mejor interacción bacteria-planta, y así observar la reacción de hipersensibilidad (Agrios, 2005).

Al probar la técnica de impresión, planteada por Trigiano *et al* (2005), se determinó que ésta permitió la mayor penetración de la suspensión bacteriana, por lo que se observa mejor la reacción. Se obtuvieron los resultados esperados de una reacción hipersensible típica, con el desarrollo de una necrosis en la zona de inoculación. Esta metodología, es simple y reproducible, debido a que al ejercer una leve presión sobre la hoja de tabaco, se permitió la rápida y homogénea penetración de la suspensión bacteriana a través del mesófilo. Esto fue fácil de visualizar, debido a que en la mayoría de los casos, la reacción hipersensible se delimitó a la zona en que se introdujo el inóculo.

Con respecto a la técnica de aspersión planteada por Trigiano *et al.* (2005) en la cual se asperja una suspensión bacteriana sin provocar lesiones, no se observó respuesta hipersensible a pesar de que muchas bacterias tienen la capacidad de penetrar indirectamente por espacios intercelulares de la hoja y/o por estructuras como hidátodos, estomas como podría suceder en la naturaleza (Agrios, 2005). Se demuestra que las bacterias de la colección no presentan esta capacidad de invasión y que solo se alcanza la interacción planta-bacteria cuando el inóculo penetra ya sea por presión o mediante herida de la hoja.

Se determinó que con una suspensión bacteriana utilizando el patrón de turbidez de concentración aproximada de  $6 \times 10^8$  UFC/ml, se alcanzó más rápido el desarrollo de la necrosis. También se determinó que al utilizar una concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml, se alcanzó una necrosis de menor intensidad y en un tiempo mayor, en comparación con el patrón anteriormente mencionado (Figura 5).

Se utilizó el medio MP, ya que se ha demostrado que la transcripción de los genes *hrp* es activa en plantas y favorecida en medios de cultivo mínimos (posee los nutrientes básicos, es un medio no enriquecido) dado que la expresión de estos genes es afectada por la cantidad de carbono y nitrógeno, pH, osmolaridad, temperatura y posibles moléculas señal de la planta (Zhong-Min *et al.*, 1992, Crute *et al.*, 1997).

## **6.2 Interacción planta- bacteria. Reacción Hipersensible.**

La literatura menciona que por lo general, la reacción hipersensible típica se desarrolla dentro de las 24 a 48 horas posteriores a la inoculación (Shaad *et al.*, 2001; Trigiano, *et al.* 2004; Agrios, 2005). Sin embargo, en este estudio, se observó que el primer síntoma que se presentó fue clorosis en un tiempo mínimo de 3 días, con el desarrollo ó no de necrosis en un período de tiempo variable. La literatura menciona que las variaciones en estos tiempos, puede deberse a que el establecimiento de la reacción hipersensible puede variar dependiendo del tiempo que dure en darse la síntesis de las proteínas bacterianas y el tiempo en que la planta desarrolle la reacción visible (Crute *et al.*, 1997).

En las cepas analizadas, se observó diferentes intensidades en la respuesta, resultados negativos en un 20% (25 bacterias), clorosis, que corresponde a una reacción de hipersensibilidad atípica en un 65% (83 bacterias), hasta necrosis correspondiente a una reacción típica de hipersensibilidad en un 15% (19 bacterias).

La clorosis es un síntoma que generalmente se asocia a infección, caracterizado por un amarillamiento del tejido vegetal, dado en la mayoría de los casos por destrucción o fallo en la producción de clorofila (Sharma, 2006). La clorosis también puede presentarse en casos de desequilibrio hídrico y deficiencia nutricional. Un ejemplo de interacción que produce clorosis, es el que presenta *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, que secreta una toxina inespecífica, denominada faseolotoxina, la cual es un inhibidor reversible de la enzima ornitina carbamoiltransferasa (OCTasa), que causa acumulación de ornitina y deficiencias de arginina en las zonas intracelulares, provocando la clorosis en los tejidos (Aguilera *et al.*, 2006).

El hecho de que la planta inoculada presente clorosis, en este contexto podría indicar que hay una interacción o reconocimiento de la bacteria por parte de la planta y por tanto, se puede considerar una reacción de hipersensibilidad atípica. La interacción de los efectores en los

fluidos intercelulares causa clorosis, decoloración y eventualmente colapso necrótico en el tejido infiltrado (Crute *et al.*, 1997). La clorosis indicaría interacción, pero no evoluciona a necrosis por ser patógenos débiles. Además, las relaciones planta-patógeno incompatibles, generan rápidamente especies reactivas del oxígeno, tales como anión superóxido y peróxido (Apel, 2004). La acumulación de estas sustancias, podrían provocar daño a nivel de la producción de clorofila, y consecuentemente esto llevar a clorosis.

Para poder validar las reacciones atípicas de hipersensibilidad (1, 2 y 3 cruces) que solo presentaron clorosis, se realizó la prueba confirmatoria en lechugas utilizando solo las cepas que previamente habían sido aisladas de lesiones en hojas de lechuga, con el fin de observar si se producía infección, comparar con el resultado de la RH y confirmar si se trata de una bacteria fitopatógena (Cuadro 3). Con los resultados obtenidos, se observó que las bacterias que manifestaron zona de clorosis correspondiente a una respuesta de hipersensibilidad leve (atípica), tuvieron un resultado positivo para patogenicidad, ya que lograron producir infección en su hospedero, por medio de una lesión necrótica y marchitamiento de la hoja de lechuga inoculada (Figura 10). Salvo dos casos, todas las bacterias causaron marchitez en las hojas inoculadas, por lo que se puede asociar la reacción atípica con una prueba hipersensible positiva. Esto demostró que son bacterias que causaron lesión en la zona inoculada y no una RH. Por otra parte las cepas MA-111 y MA-5 presentaron reacción hipersensible negativa en plantas de tabaco pero al inocularlas en plantas de lechuga desarrollaron la infección, demostrando, que esta prueba presenta falsos negativos.

El 65% de las bacterias de la colección presentaron reacciones de hipersensibilidad atípicas, con representantes en cada grupo bacteriano analizado. En el caso de las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, se observa la tendencia de presentar gran variedad en las reacciones, desde 1 hasta 5 cruces (Gráfico 1). Dentro de este género existen muchas especies que sobreviven en la planta y que se comportan como oportunistas, o patógenos secundarios, que colonizan después que un patógeno primario se establece, por lo que se podría suponer que la mayoría de las cepas analizadas se clasifican en este grupo. Se observó que el 15% de las cepas dieron reacción hipersensible típica, es importante destacar las cepas MA-37, MA-70 y MA-49, que presentaron esta reacción (4 a 5 cruces) pertenecen al grupo *P. syringae*, lo cual confirma el hecho de tratarse de cepas patógenas. Con respecto a las bacterias entéricas se observó que las cepas MA-19 y MA-36, identificadas como *Pantoea agglomerans*, desarrollaron reacciones de 5

cruces, cuando lo esperado es que solo presentaran reacciones atípicas, más aún que esta especie, salvo excepciones, no es considerada fitopatógena.

Experimentalmente, se evidenció que la mayoría de las bacterias analizadas que fueron aisladas de lesiones de plantas, presentaron resultados positivos de reacción hipersensible típica o atípica, lo cual indicaría su potencial como patógenos de plantas.

### 6.3 Detección de genes *hrpZ*

Solamente 15 de los 127 extractos de ADN de las bacterias de la colección presentaron una posible amplificación de un producto de ADN. Los imprimadores utilizados fueron diseñados a partir de secuencias del gen *hrpZ* de diferentes patovares de *P. syringae*. Se han diseñado degenerados debido a que en estudios previos se han utilizado para poder detectar las secuencias de este gen en otras especies de éste género como en *P. avellanea* (Loreti *et al.*, 2001). Por ese motivo, se decidió comprobar la presencia del gen en la colección del CIBCM, debido a que está constituida en un 57% por diferentes especies de *Pseudomonas*. Se esperaba determinar si este tipo de imprimador podría detectar el gen de la proteína efectora *hrpZ*, ya que está presente en los patovares de las bacterias del *P. syringae* (Iacobellis, 2003) y así evaluar la colección bacteriana.

La banda esperada para este gen en *P. avellanea* tiene un peso aproximado entre 450-550 pb (Loreti *et al.*, 2001), que coincide idealmente con los controles positivos, correspondientes a *P. syringae*. Por otra parte, los ADN de la mayoría de las bacterias evaluadas que presentaron amplificación fue de bandas inespecíficas (diferentes tamaños a lo esperado teóricamente), esto puede deberse a que los imprimadores son degenerados, y están reconociendo secuencias similares a la esperada, por ende, es importante asegurarse de la naturaleza del producto amplificado, utilizando técnicas moleculares como secuenciación molecular.

Se ha visto que la técnica de PCR es una de las principales herramientas para el diagnóstico de enfermedades de plantas. Sin embargo, su aplicación en la rutina para la detección y confirmación de fitopatógenos es restringida a la utilización de imprimadores específicos para la detección de cada gen de avirulencia y algunos hasta son específicos de cada género bacteriano. En el presente trabajo se propuso utilizar imprimadores degenerados para poder detectar variaciones en la secuencia del gen *hrpZ*, pero a pesar de que gran parte de la colección

de bacterias pertenecen al género *Pseudomonas* (y que el protocolo utilizado se basó en ese género) no fue posible detectar el gen. Esto se debió posiblemente, a que no se logró una adecuada estandarización de la técnica de PCR para todas las bacterias de la colección y al hecho de que este imprimador solo funcione en la amplificación de patovares de *P. syringae* y *P. avellanae*. Es por eso que los resultados esperados se presentaron solamente en dos cepas, que corresponden a bacterias pertenecientes a la especie de *P. syringae*. Es necesario continuar con la investigación en este protocolo, con el fin de determinar si es posible realizar modificaciones para obtener una banda entre los rangos esperados en las bacterias que presentan múltiples bandas.

Debido a que no se logró la total estandarización del protocolo, no es posible concluir si las bacterias que presentaron reacción hipersensible típica o atípica y no presentaron amplificación del gen *hrpZ* poseen o no el gen, o si presentan variantes en su secuencia que no son compatibles con los imprimadores utilizados. Además, existen aproximadamente 30 genes de avirulencia caracterizados en bacterias que pueden contribuir en la interacción planta-bacteria por lo que en algunos casos puede ser que no esté presente este gen en particular (Crute *et al.*, 1997).

En el caso, de las bacterias que no presentaron reacción hipersensible pero sí amplificación de un producto de ADN (cepa MA-5 y MA-48), a pesar de que falta secuenciar esa banda, se podría considerar la posibilidad que se trate de un patógeno débil, y que a pesar de portar el gen, no inducen una sintomatología tan evidente. También puede deberse a que el gen no se expresara adecuadamente por circunstancias específicas de la planta o que al momento de inoculación, pudo no darse interacción bacteria-planta y por eso no fuera evidente la reacción hipersensible.

## 7. CONCLUSIONES

Se determinó que la técnica de impresión, en nuestro caso es la más adecuada para realizar el tamizaje de bacterias aisladas de cultivos, pues es una técnica sencilla, de bajo costo económico, reproducible y permite determinar eficazmente bacterias fitopatógenas.

Al tamizar la colección bacteriana del CIBCM, se obtuvieron reacciones hipersensibles típicas, con zonas necróticas y reacciones de hipersensibilidad atípicas, con presencia de clorosis. Basado en la confirmación de patogenicidad de las cepas aisladas de lechuga que presentaron reacciones atípicas, se concluye que ambos tipos de reacciones, a pesar de diferir en sus características macroscópicas, básicamente en la intensidad visual de la reacción (desde clorosis hasta necrosis), se concluye que se tratan de reacciones positivas de hipersensibilidad.

No se alcanzó la correcta estandarización de la técnica molecular de PCR para la detección del gen de *hrpZ*, debido posiblemente a que el imprimador está diseñado para la detección restringida de las bacterias pertenecientes a *P. syringae* y *P. avellanae*, entonces la recomendación es iniciar con la separación de las cepas aisladas de las lesiones por grupos taxonómicos y a partir de ahí realizar la detección de los genes efectores específicos de cada grupo.

La utilización de imprimadores degenerados, puede provocar la amplificación de bandas inespecíficas, lo cual hace importante que adicionalmente se empleen técnicas de secuenciación, para determinar los sitios de amplificación que está reconociendo el imprimador.

## 8. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Plant pathology, 5<sup>ta</sup> edición, Academic Press.
- Aguilera, S., López, K., Hernández, J., Álvarez A. 2006. Identificación y análisis de un fragmento cromosómico de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* involucrado en la síntesis de faseolotoxina. Revista Latinoamericana de Microbiología 48(2): 154-161.
- Alfano, R., Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense. Annu. Rev. Phytopathol. 42:385-41.
- Apel, K., Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55:373-99.
- Arauz, L. 1998. Fitopatología. Un enfoque agroecológico. 1<sup>ra</sup> Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Arias, O. 2005. Retos para la agricultura en Costa Rica. Agronomía Costarricense 29(2): 157-166.
- Boletín Estadístico Agropecuario N°18. 2008. Secretaria ejecutiva de planificación sectorial agropecuaria. Costa Rica.
- Camarena, G. 2006. Las especies reactivas del oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. 12(001): 25-30.
- Charkowski, A., Alfano, J., Preston G., Preston, G., Yuan, J., Yang S., Collmer, A. 1998. The *Pseudomonas syringae* pv. tomato *HrpW* Protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant Hypersensitive Response and bind to pectate. Journal of Bacteriology. 180(19): 5211-5217.

Charkowski, A., Hsiou, H., Collmer, A. 1997. Altered Localization of *HrpZ* in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 179(12): 3866–3874.

Coto, B., Wang, A. 1995. Evaluación de cinco tratamientos químicos para el combate de la bacteriosis (*Erwinia* sp.) en frutos de mango variedad Tommy Atkins en Turrubares, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 19(1): 15-20.

Crute, I., Holub, E., Burdon, J. 1997. The gene for gene relationship in plant-parasite interactions. Editorial CAB International.

DeParasis, J., Roth, D. 1990. Nucleic acid probes for identification of phyto bacteria: identification of genus-specific 16s rRNA sequences. *Phytopathology* 80: 618-621.

Gilmartin, P., Bowler, C. 2002. *Molecular Plant Biology: A Practical Approach*. Oxford University Press.

González, L. 1985. *Introducción a la Fitopatología*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

Hartman, G.L, Haywart, A.C. 1993. Bacterial Wilt. Proceeding of international conference held at Kaohsiung, Taiwan, 28-31 Octubre 1992 : 232-237.

Hutcheson, S. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 59–90,

Iacobellis, N., Collmer, A., Hutcheson, S. Manfield J., Morris, C., Murillo, J., Shaad, D., Surico, G., Ulrich, M. 2003. *Pseudomonas syringae* and related pathogens: biology and genetic. Editorial Springer.

- Inoue, Y., Takikawa, Y. 2006. The *hrpZ* and *hrpA* genes are variable, and useful for grouping *Pseudomonas syringae* bacteria. *Journal of General Plant Pathology*. 72(1):26-33.
- Klement, Z., Rudolph, K. Sands, D.C. 1990. *Methods in phytobacteriology*, Editorial Akademiai kiado, Budapest.
- Lacy, G y Lukezic, F. 2003. *Plant pathology: concepts and laboratory exercises*. (CRC press LLC): 41-44.
- Lindgren, P. 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:129–52.
- Linhart, C., Shamir, R. 2005. The degenerate primer desing problem: Theory and application. *Journal of Computational Biology*. 12(4): 431-456.
- Llacer, G., López, M., Trapero, A., Bello, A. 2000. *Patología vegetal 2<sup>da</sup> edición*. Tomo I. Sociedad Española de fitopatología.
- Loreti, S., Sarrocco, S., Gallelli, A. 2001. Identification of *hrp* genes, encoding harpin protein, in *Pseudomonas avellanae*. *Phytopathology* 149: 219-226.
- Louws, F., Rademaker, J., Bruijn, F. 1999. The three D's of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81–125.
- Montecillos, E. 2000. Pathogenic plant-microbe interactions. What we know and how we benefit. *Internatl Microbiol.* 3: 69-70.
- Pérez, E. 1997. *Aspectos generales de las bacterias fitopatógenas*. Universidad de la República, Uruguay.
- Ramos, J. 2004. *Pseudomonas*, Virulence and gene regulation Volumen 2. Editorial. Science.

Rivera, G. 1995. Introducción a la fitopatología. Universidad Nacional.

Robayo, A. 2008. Caracterización bioquímica y molecular de bacterias gram-negativas aisladas de lesiones causadas por fitopatógenos en cultivos de Costa Rica. Proyecto de graduación, Universidad de Costa Rica.

Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F. *et al.* 2005. Bacteriología General: principios y prácticas de laboratorio. 1<sup>ra</sup> edición. Editorial Universidad de Costa Rica.

Sandoval, C. 2004. Manejo integrado de Enfermedades en cultivos hidropónicos. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación.

Sharma, P. 2006. Plant Pathology. Alpha Science International. p 3.1- 3.28.

Schaad, N, Jones, J y Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3<sup>th</sup> ed. Edn (The American Phytopathological Society) p. 1-193.

Trigiano, R., Windham, M., Windham, A. 2004. Plant Pathology, Concepts and Laboratory Exercises. CRS PRESS, EEUU,

Van Sluys, M., Monteiro-Vitorello, L., Camargo, C., Menck, A., Silva, J., Ferro, M., Oliviera, J. Setuba, J., Kitajima, J., Simpson, A. 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 169–89.

Zhong-Min, W., Sneath, B., Beer, S. 1992. Expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in response to environmental stimuli. Journal of Bacteriology. 174 (6): 1875-1882.

## 9. ANEXOS

**Cuadro 5.** Identificación de la colección bacteriana aislada de diversos cultivos agrícolas de Costa Rica, pertenecientes al laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM).

Identificación	Código	Cultivo de aislamiento
<b>GRUPO <i>Psychrobacter</i></b>	MA-4, MA-2	Curcuma
	MA-10	Chile Dulce
	MA-12	Papa
	MA-130, MA-132	Melón
	MA-1	Bulbo ornamental
	MA-22, MA-39, MA-98	Repollo
<b>GRUPO de bacterias entéricas</b>	MA-11, MA-19	Chile Dulce
	MA-24, MA-27, MA-89	Dracaena
	MA-35, MA-36	Repollo
	MA-8, MA-38	Curcuma
	MA-30	Coliflor
	MA-20	Zucchini
	MA-115	Mango
	MA-118	Banano
	MA-133	Melón
MA-50, MA-55, MA-65, MA-122, MA-123	Palmito	
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	MA-52, MA-53, MA-54, MA-78	Palmito
<b><i>Acinetobacter</i> sp.</b>	MA-29, MA-28, MA-32	Repollo
	MA-14	Chile Dulce
<b>Otros bacilos gram negativos no entéricos</b>	MA-131	Melón
	MA-121	Lechuga americana
	MA-136	Dracaena
	MA-18, MA-99, MA-102, MA-106	Repollo
	MA-125, MA-126	Mango
	MA-142	Coliflor
	MA-120	Chile
	MA-87, MA-117	Banano
<b>GRUPO <i>Pseudomonas putida</i></b>	MA-44	Lechuga criolla
	MA-33	Chile Dulce
	MA-41	Repollo
	MA-7, MA-15, MA-16, MA-79	Apio
	MA-75	Zucchini
	MA-31, MA-56, MA-83	Tomate
<b>GRUPO <i>chlororaphis</i></b>	MA-6	Apio
	MA-40	Lechuga criolla
	MA-13	Bulbo ornamental
	MA-81	Frijol
	MA-90	Chile
	MA-95	Coliflor
	MA-5	Lechuga americana
	MA-48, MA-85, MA-104	Repollo
	MA-141	Tomate
	MA-67, MA-68, MA-69, MA-72, MA-73, MA-101, MA-138	Banano

Cuadro 5. Continuación

Identificación	Código	Cultivo de aislamiento
<b>GRUPO</b> <i>Pseudomonas syringae</i>	MA-37, MA-70	Frijol
	MA-49	Lechuga criolla
<i>Ochrabactrum sp</i>	MA-59	Higo
<i>Delftia acidovorans</i>	MA-74	Tomate
<i>Aeromonas caviae</i>	MA-77,	Banano
	MA-61	Curcuma
	MA-80	Zucchini
	MA-110, MA-143	Coliflor
	MA-124, MA-127	Mango
	MA-113, MA-140	Tomate
	MA-128, MA-129	Melón
<b>GRUPO</b> <i>Pseudomonas sp.</i>	MA-17, MA-82	Lechuga americana
	MA-23, MA-26, MA-34, MA-45, MA-46, MA-57, MA-91, MA-93, MA-96, MA-103, MA-105, MA-107	Repollo
	MA-3, MA-9	Zanahoria
	MA-60, MA-76, MA-84, MA-111, MA-112	Lechuga criolla
	MA-42, MA-43, MA-88, MA-135	Dracaena
	MA-86	Apio
	MA-51, MA-97, MA-116, MA-119, MA-139	Banano

Datos tomados de Robayo (2008).

**Composición del Medio de cultivo MP** (fomentar expresión de Pectato liasa) (Shaad *et al*, 2001)

<b>Componentes</b>	<b>por litro</b>
Pectina cítrica	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar	15.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 mg
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	1.0 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.0 ug
MnSO <sub>4</sub>	10.0 ug
ZnSO <sub>4</sub>	70.0 ug
CuSO <sub>4</sub>	50.0 ug
MoO <sub>3</sub>	10.0 ug

Se realizaron las siguientes sustituciones: el MoO<sub>3</sub> por NaMoO<sub>4</sub>, el MgSO<sub>4</sub> por MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, el MnSO<sub>4</sub> por MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, el ZnSO<sub>4</sub> por ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y el CuSO<sub>4</sub> por CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O.

Se pesa cada reactivo, y luego se lleva a un volumen final de 1L, posteriormente se autoclava.

---

**Composición de TBE 10X**


---

Componente	Por litro
Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0.5M	40 mL
pH = 8.0	
Aforar con agua destilada tipo 1 a 1L	

---

Para preparar los geles en cámara de electroforesis se utiliza TBE 1X, por lo que deberá hacerse una dilución 1:10 para su utilización directa.

**Cuadro 6.** Composición y volúmenes de la reacción para la amplificación de los genes *hrpZ* por la técnica de PCR.

<b>Componente</b>	<b>1X (μL)</b>
Agua para PCR (libre de endonucleasas)	34.5
Tampón Taq ADN pol. con KCl y sin MgCl <sub>2</sub> 10 X	5.0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5
Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) (12,5 mM)	0.8
BSA (10mg/mL)	0.2
Imprimador DEG 1 (10 μM)	2.5
Imprimador DEG 2 (10 μM)	2.5
Taq polimerasa	0.6
ADN	1.0