

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA MARCHITEZ BACTERIANA

Aleika Iglesia*, Elba Alvarez *, Yamila Martínez* y A. García**

*Grupo de Fitopatología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico. aiglesia@censa.edu.cu; **Laboratorio Central de Cuarentena. Ayestarán y Ayuntamiento, Centro Habana. Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN: La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, es una de las enfermedades más importante que afecta a una amplia gama de cultivos en las regiones tropicales y subtropicales. En Cuba esta enfermedad se encuentra bajo estrictas medidas de cuarentena, sin embargo el riesgo de entrada crece cada año debido a la importación de material vegetal procedente de zonas de altos niveles de infestación. En este trabajo se introduce y desarrolla el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y confirmación de *R. solanacearum* en materiales importados, así como en la vigilancia de la enfermedad en el sistema nacional de sanidad vegetal. La metodología utilizada facilitó la detección de *R. solanacearum* en cultivos de células hasta 10^4 UFC/mL y en ADN totales. Se emplea en estos momentos en la evaluación de la semilla de papa que se importa cada año, lo cual permite fortalecer el sistema de prevención y vigilancia de la marchitez bacteriana en Cuba.

(Palabras clave: cuarentena; diagnóstico molecular; *Ralstonia solanacearum*; PCR)

MOLECULAR DIAGNOSTIC OF THE BACTERIAL WILT

ABSTRACT: Bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, is one of the most important bacterial plant diseases affecting crops in the tropical and subtropical regions at a wide range. In Cuba, this disease is under strict quarantine measures; however entrance risk grows every year due to the import of vegetal material coming from areas of high infestation levels. In this work, the use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection and confirmation of *R. solanacearum* in imported materials, as well as the surveillance of the disease in the national system of plant health are introduced and developed. The methodology used made easy the detection of *R. solanacearum* in cell cultures up to 10^4 UFC/mL and in total DNAs. Nowadays, such methodology has been used in the evaluation of potato seeds imported every year which allows strengthening the prevention and surveillance systems of the bacterial wilt in Cuba.

(Key words: quarantine; molecular diagnostic; *Ralstonia solanacearum*; PCR)

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el aumento continuo y progresivo del movimiento internacional de personas y materiales, ha traído como consecuencia un gran incremento en la movilización de plagas emergentes en cultivos de importancia. Por otro lado, con la demanda de más y nuevos productos para la alimentación, también se ha incrementado la importación de germoplasma, intensificándose así los riesgos fitosanitarios (1).

En Cuba tiene lugar, desde hace algunos años, la importación de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) procedente de diferentes países, lo cual conlleva a un aumento del riesgo de introducción de enfermedades exóticas y cuarentenadas. Aunque se exige que se cumplan los requerimientos internacionales y que sean presentados los certificados fitosanitarios que garantizan la no presencia de una enfermedad exótica o cuarentenada, ha quedado demostrado que es posible que se produzcan escapes de organismos nocivos (2, 3).

La marchitez bacteriana provocada por *Ralstonia solanacearum* (Smith), es una de las enfermedades bacterianas que constituye una seria amenaza para Cuba por su gran distribución en todas las islas del Caribe y países del continente americano y su amplia gama de hospedantes (4, 5, 6). Esta bacteria es responsable de pérdidas considerables que se producen en muchos cultivos hortícolas y en algunas solanáceas como es el cultivo de la papa donde deja inutilizadas grandes extensiones de tierras contaminadas con el agente (7).

Cuando esta bacteria se establece, las posibilidades de diseminación son múltiples, ya que es un patógeno de suelo y persiste en él por muchos años, aún sin el hospedante específico (8). La frecuente existencia de infecciones latentes y su supervivencia en aguas superficiales, en estado viable pero no cultivable (VBNC), establecen la necesidad de contar con métodos sensibles y específicos, capaces de detectar la bacteria también en dicho estado.

La humedad y las altas temperaturas, en los países tropicales trae como consecuencia que los cultivos sean muy vulnerables a las infecciones bacterianas de patógenos exóticos. En este caso, Cuba cuenta con las condiciones climáticas propicias para el desarrollo y sobrevivencia de *R. solanacearum*. Por estos motivos es muy importante que los servicios de protección fitosanitarios dispongan de herramientas que permitan la detección rápida, sensible y específica de esta bacteria con el objetivo de impedir la entrada de material infectado al país (9).

En Cuba, hasta el momento, se han diseñado sistemas de detección basados en el aislamiento de la bacteria en medios de cultivos, la identificación bioquímica y patogénica y la aplicación de la Inmunofluorescencia Indirecta como método serológico de diagnóstico (6). El uso de estos métodos tiene ciertas desventajas cuando se quiere lograr altos niveles de especificidad y sensibilidad y un resultado rápido del diagnóstico (10).

El objetivo de este trabajo es poner a punto la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección rápida y específica de *R. solanacearum*, con vistas a fortalecer el sistema de prevención y vigilancia con herramientas moleculares de diagnóstico y contar con un método de confirmación para posibles reclamaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el trabajo se utilizaron suspensiones bacterianas no viables de *Ralstonia solanacearum* (10^8

UFC/mL) donadas por el Laboratorio Central de Cuarentena de Cuba (LCC).

Preparación de las muestras para PCR

A partir de estas suspensiones se obtuvieron los ADN por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol. La concentración y pureza del ADN se estimó por espectrofotometría, mediante lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. La pureza de la muestra se examinó mediante la relación de las absorbancias y por electroforesis en gel de agarosa (0,8 % en tampón TBE (Tris-borato 0,045 M; EDTA 0,001 M) que contenía bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y utilizando un transiluminador UV (Macrovue 2011, LKB) para su visualización. Los ADN purificados se conservaron a -20°C hasta la realización del ensayo.

A partir de las mismas suspensiones se prepararon diluciones desde 10^8 hasta 10 UFC/mL para determinar el límite de detección de la PCR a partir de los cultivos celulares. Las muestras que se conservaron de igual forma hasta su utilización.

Reacción en cadena de la polimerasa

Para la puesta a punto de la PCR se sintetizaron en el Laboratorio de Síntesis (Heber Biotech, Cuba), los cebadores PS96-H y PS96-I diseñados por Seal (11) con las secuencias (5' TCA CCG AAG CCG AAT CCG CGT CCA TCA C 3') y (5' AAG GTG TCG TCC AGC TCG AAC CCG CC 3').

La amplificación se realizó en un termociclador (Eppendorf) con una mezcla de reacción de $25\mu\text{L}$ de volumen final, compuesta por tampón de PCR 10X (Promega), 3mM de MgCl_2 , $1\mu\text{M}$ de cada cebador, 0.2mM de cada dNPTs, 1unidad de Taq Polimerasa (Amplicen, Cuba) y 20ng de ADN. El programa de amplificación consistió un ciclo de desnaturalización a 95°C , durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C , 30 segundos; 64°C , 1 minuto; 72°C , 2 minutos; y un ciclo de extensión final a 72°C , 7 minutos.

El fragmento amplificado se analizó en un gel de agarosa al 2%, preparado con TBE 0.5X (Tris-HCl 45mM, ácido bórico 45mM y EDTA 1mM) y se tiñó con bromuro de etidio $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en TBE. Se empleó un marcador de peso molecular de 100pb (Promega) y las bandas resultantes se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Parámetros de desempeño

Se determinó el límite de detección de la técnica a partir de las suspensiones bacterianas y se verificó la especificidad analítica frente a otras especies bacterianas tales como: *Ralstonia syzygii*, *Burkholderia cepacia*, *Erwinia carotovora* y

Xanthomonas axonopodis, ubicadas en la colección del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del CENSA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra los resultados de la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa de las preparaciones de ADN y de las suspensiones bacterianas. Se observa como el protocolo de amplificación funcionó adecuadamente, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Seal (11) al obtener un fragmento de 148pb, que identifica específicamente a *R. solanacearum*. Se evidencian señales tanto en las muestras de ADN como en las procedentes de las células bacterianas que se utilizaron directamente en la reacción de PCR.

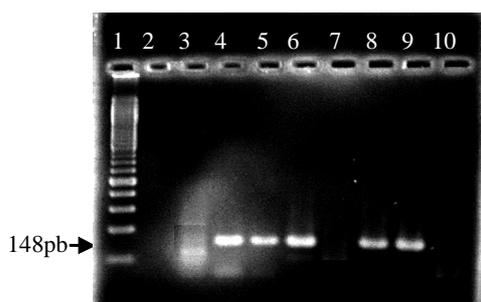


FIGURA 1. Productos de amplificación mediante PCR. Línea 1: patrón de peso molecular de 100pb; 2-3: controles negativos; 4-6: ADN de *R. solanacearum*; 7-9: células de *R. solanacearum*, 10: control agua./*Amplification products of R. solanacearum by PCR. Line 1: molecular weight pattern 100bp; 2-3: negative controls; 4-6: R. solanacearum DNA; 7-9: R. solanacearum cells; 10: water control.*

El límite de detección de la técnica a partir de las diluciones de las suspensiones bacterianas fue de 2.5×10^1 UFC/mL. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (12), quienes observaron señales de amplificación de la dilución 10^{-6} correspondiente a 2.0×10^1 UFC/mL (13, 14, 15). (Fig 2).

En el ensayo de especificidad (Fig. 3) no se observó ninguna señal en las muestras de referencia de otras especies bacterianas utilizadas, por lo que se confirma la especificidad del diagnóstico al utilizar esta pareja de cebadores.

Los niveles de detección de la técnica de PCR también han sido evidenciado por otros autores al emplear las células de forma directa en la reacción de las PCR para otros fitopatógenos como *Xanthomonas albilineans* y *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (8) y los fitoplasmas asociados al amarilleamiento foliar (16), entre otros.

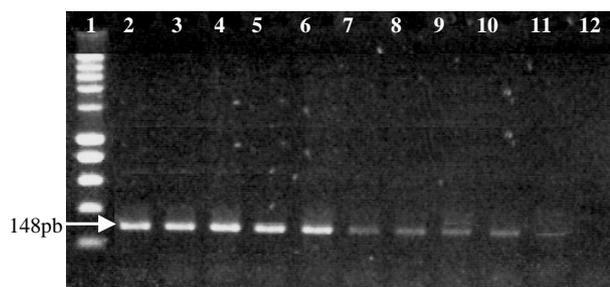


FIGURA 2. Límite de detección de la PCR a partir de diluciones de las suspensiones bacterianas. Línea 1: Marcador de peso molecular 100pb; 1-2: ADN; 3-11: diluciones de suspensiones desde 10^8 - 10^1 UFC/mL; 12: control de agua./*Detection limit of PCR from bacterial suspensions dilutions. Line 1: molecular weight pattern 100bp; 1-2: DNA; 3-11: Suspension dilution; 12: water control.*



FIGURA 3. Resultados de la PCR en el ensayo de especificidad. Línea 1: Marcador de peso molecular 100 pb; 2: ADN de *R. solanacearum*; 3-5: *R. syzygii*, *B. cepacea*, *E. carotovora*; 6-7: células de *R. solanacearum*; 8: *X. axonopodis*; 9 control de agua./*Results of specificity PCR assay. Line 1: molecular weight pattern 100bp; 2: R. solanacearum DNA; 3-5: R. syzygii, B. cepacea, E. carotovora; 6-7: R. solanacearum cells; 8: X. axonopodis; 9: water control.*

Diferentes autores han demostrado el incremento de la sensibilidad al utilizar la PCR anidada, con la que han detectado hasta 10 cel. mL^{-1} . (17, 18). Por otra parte se afirma que la combinación del método biológico (multiplicación de la bacteria) con los métodos de diagnóstico poseen importancia especial cuando se trata de infecciones latentes, donde los niveles poblacionales están por debajo de las posibilidades de detección de los diferentes ensayos (19, 20).

Resultados similares se han obtenido al utilizar el método de pre-enriquecimiento (siembra en medio SMSA), previo al desarrollo de la técnica de PCR, con un aumento de la sensibilidad del ensayo hasta un millón de veces. Precisamente porque la amplifica-

ción se realiza, a partir de suspensiones de células y no a partir de material vegetal donde algunos autores se refieren al efecto inhibitor que provocan los compuestos que se producen tras la activación de los mecanismos de defensa de la planta cuando esta es infectada por un patógeno (21).

Muchos estudios referidos al diagnóstico de bacterias u otros fitopatógenos indican que la técnica de PCR posee ciertas ventajas sobre los ensayos serológicos, fundamentalmente en los niveles de detectabilidad. En ocasiones la IFI, es catalogada como una técnica subjetiva y que depende de la experiencia del ejecutor del ensayo. A pesar de que evidencia la morfología de la célula bacteriana los resultados dudosos son más comunes que al realizar otros ensayos. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten recomendar la técnica de PCR para la confirmación de resultados cuestionables por otros métodos de detección (8).

La especificidad de las técnicas de diagnóstico que se utilizan para esta entidad bacteriana se ha visto afectada debido a la gran diversidad genética que se presenta, además de las estrechas relaciones que mantiene con otras especies bacterianas tales como: *R. syzygii* y *R. pickettii*. Diferentes estudios realizados sugieren el uso de iniciadores derivados de la región del ARNr 16S, ya que permiten el desarrollo de métodos de amplificación enzimática *in vitro* de gran utilidad para el diagnóstico específico, la identificación y la clasificación taxonómica de procariontes (11, 13, 20).

Estos resultados son de gran importancia para Cuba pues contribuyen al fortalecimiento de los sistemas de diagnóstico de plagas cuarentenadas y garantizan la adecuada vigilancia fitosanitaria en las estaciones post entrada, al contar con un método rápido y sensible que permite la detección de infecciones latentes y por supuesto evita la entrada al país de una enfermedad tan devastadora como lo es la marchitez bacteriana.

REFERENCIAS

1. Mac DI. Sistema de alerta de plagas de la NAPPO. Conferencia magistral en el II Simposio Internacional sobre vigilancia fitosanitaria y su relación con la protección al entorno. 2005 Mayo; Palacio de Convenciones de la Habana; Cuba. p.14.
2. García A, Albornoz A, Pérez I. Intercepciones de patógenos bacterianos cuarentenados o exóticos en el período 1990-2000 en el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal de Cuba. En: I Simposio Internacional sobre vigilancia fitosanitaria y su relación con la protección al entorno. 2002; Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba. p. 96.
3. Williamson L, Hudelson B, Allen C. *R. solanacearum* strains isolated from geranium belong to race 3 and are pathogenic on potato. Plant Dis. 2002;86:987-991.
4. Ming R. Molecular diversity of *R. solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. Phytopathol. 2003;93:1124-1130.
5. Robertson AE, Fortnum BA, Wood TC, Kluepfel DA. Diversity of *R. solanacearum* in the southeastern United States. Beitr. Tabakforsch. Int. 2001;19:323-331.
6. Yabuuchi E, Cosaco Y, Hotta H, Nichiuchi Y. Transfer of two *Burkholderia* and an alcaligenes species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Parlleroni and Doudoroff 1973) com. Nov.: *R. solanacearum* (Smith 1896) com. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. Microbiol Immunol. 1995;39:897-904.
7. Fortnum BA, Kluepfel D. Mechanization has contributed to the spread of bacterial wilt on flue-cured tobacco in the southeastern USA. In: Allen C, Prior P, Hayward A, editors. Bacterial Wilt: The Disease and the *R. solanacearum* Species Complex. American Phytopathological Society; 2005. p.51-59.
8. Iglesia AL. Aislamiento e identificación morfológica bioquímica y molecular de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en Cuba. Rev. Protección Veg. 2007;22(1):29-33.
9. Janse JD, Van den Beld HE, Elphinstone J, Simpkins S, Tjou NA, Vaerenbergh JV. et al. Introduction to Europe of *R. solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. J. Plant Pathol. 2004;86:147-155.
10. Poussier S, Cheron JJ, Couteau A, Luisetti J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *R. solanacearum* in common natural substrates. J. Microbiol Methods. 2002;12(2):16-27.
11. Seal S, Jackson L, Young J, Daniels M. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA

- sequencing: Construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. General Microbiol.* 1993;139:1587-1594.
12. Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium and peanut. *Phytopathol.* 1954;51:158-161.
 13. Fegan M, Prior P. How complex is the *R. solanacearum* species complex. In: Allen C, Prior P, Hayward A, editors. *Bacterial Wilt: The Disease and the R. solanacearum Species Complex*. American Phytopathological Society; 2005. p.449-461.
 14. Ji P, Allen C, Sanchez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB, Momol MT et al. New diversity of *R. solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. *Plant Dis.* 2005; 91:195-203.
 15. Swanson JK, Yao J, Tans-Kersten JK, Allen C. Behavior of *R. solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathol.* 2005;95:136-143.
 16. Arocha Y, Horta D, Roque A, Peralta EL. Molecular detection of phytoplasmas in papaya in Cuba. *Rev. Protección Veg.* 2005;20(1):20-26.
 17. Caruso P, Gorris MT, Cambra M, Palomo JL, Collar J, López MM et al. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay that Uses a Specific Monoclonal Antibody for Sensitive Detection of *R. solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Appl. Environ Microbiol.* 2003;68(7):3634-3638.
 18. Olmos A, Bertolini E, Cambra M. Simultaneous and cooperational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *J. Virol. Methods.* 2002;106:15-23.
 19. Van Elsas J, Kastelein P, Van Bekkum P, Van Wolf JM, Vries PM, Van Overbeek LS et al. Survival of *R. solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathol.* 2000;90:1358-1366.
 20. Weller S, Elphinstone J, Smith N, Boonham N, Stead D. Detection of *R. solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;66:2853-2858.
 21. Grey BE, Steck TR. The viable but nonculturable state of *R. solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67:3866-3872.
- (Recibido 2-10-2007; Aceptado 18-2-2008)**