UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DEPARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE LAS BACTERIAS CUARENTENADAS *Xylella fastidiosa* Wills *et al.*, y *Ralstonia solanacearum* r3.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
M A E S T R O EN C I E N C I A S

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

MARÍA CLAUDIA RUEDA BARRIENTOS

CHAPINGO MÉXICO DICIEMBRE DEL 2002.

ENSEÑANZA E INVESTIGACION
PARASITOLOGIA

Bib. 98373

"ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE LAS BACTERIAS CUARENTENADAS *Xylella fastidiosa* Wills *et al.*, y *Ralstonia solanacearum* r3"

Tesis realizada por **María Claudia Rueda Barrientos**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:_____

Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR:_____

M. C. Dimas Mejía Sánchez

ASESOR:_____

M. C. Jorge Everardo López Nolasco

D.-10629

Chapingo, México Diciembre del 2002

AGRADECIEMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico que me permitió continuar con una formación profesional.

Al Departamento de Parasitología Agrícola por contribuir a mi formación a lo largo de estos dos años.

Al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria en la Dirección General de Sanidad Vegetal, por las instalaciones y apoyo financiero para la presente tesis.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por su interés, aportaciones y acertada dirección en la realización del presente trabajo.

Al M. C. Dimas Mejía Sánchez por su amistad, supervisión, apoyo y sugerencias día a día en la realización de la presente tesis.

Al M. C Jorge López Nolasco por su colaboración y gestión financiera para la realización del presente trabajo.

Al Biol. Jorge Aguilar por su apoyo, disponibilidad y sugerencias en la fase técnica de la presente tesis

A la M. C. Violeta Figueroa Mejía, por su valiosa amistad y apoyo durante la realización del presente estudio.

A La Biol. Bárbara Hernández y M. C. María del Rocío Hernández por su amistad, apoyo y sugerencias.

A mi madre ,Santiago, Pola, Jaime, Narda, Mary, Yoli, Rosy, Tomy, J. Angel, Vivi, Yesy y Sandy, por ser parte de mi familia.

A mis sobrinos Laura, Jorge, Mario, Luis, Bety, Rebeca, Edgar, Brenda, Yaritza, Vicky, Lidia, Chris, Dany, Vanesita, Alondra y Miriam.

A mis amigos: Judith, Elva, Bruno, Lilian, Violeta, Laura, Are, Agustín, Elier, Bety, Cony, Mairel, Juliana, Basaldua y a mis demás compañeros.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización del presente trabajo y que no se puede agradecer individualmente por falta de espacio.

DEDICATORIA

A mi hijo Alex, por ser la alegría de mi vida y un motivo para salir adelante siempre.

A Gilberto Fabian Domínguez como una muestra de mi admiración y respeto, por su perseverancia, por creer en mí y por todas las cosas que hemos compartido y espero sigamos compartiendo.

CONTENIDO

	Página
Índice de cuadros	i
Indice de figuras	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
1.INTRODUCCIÓN	**1**
1.1 Objetivos	**4**
2.REVISIÓN DE LITERATURA	**5**
2.1Bacterias cuarentenadas para México	5
2.2 Generalidades sobre el cultivo de la vid	5
2.2.1 Origen	6
2.2.2 Historia del cultivo en México	6
2.2.3 Superficie y producción nacional	7
2.2.4 Variedades	7
2.3 Principales patógenos que afectan a la vid	8
2.3.1 Características y ubicación taxonómica de *Xylella fastidiosa*	8
2.3.2 Distribución	9
2.3.3 Hospedantes	10
2.3.4 Síntomas de la enfermedad de Pierce en vid	10
2.3.5 Transmisión y vectores de *X. fastidiosa*	12
2.3.6 Manejo	13

2.4 Generalidades sobre la papa 14
2.4.1 Origen 14
2.4.2 Historia del cultivo 15
2.4.3 Superficie y producción nacional 15
2.4.4 Variedades 16
2.5 Principales patógenos que afectan al cultivo de papa 16
2.5.1 *Ralstonia solanacearum* características y ubicación taxonómica 17
2.5.2 Distribución 17
2.5.3 Razas y hospedantes 17
2.5.4 Síntomas 18
2.5.5 Transmisión 19
2.5.6 Manejo 19
2.6 Métodos tradicionales de detección de *X. fastidiosa* y *R. solanacearum* 20
2.6.1 Aislamiento en medios de cultivo 20
2.6.2 Morfología colonial 21
2.6.3 Tinción diferencial 21
2.6.4 Pruebas bioquímicas y fisiológicas 22
2.6.5 Pruebas de patogenicidad 22
2.7 Métodos serológicos 23
2.7.1 DAS-ELISA 24
2.7.2 Inmuno-PCR 24
2.8 Técnicas moleculares 25
2.8.1 PCR 26
2.8.1.1 Componentes de la PCR 26
2.8.1.2 Extracción de ADN 30
2.8.1.3 Inhibidores 31

3. MATERIALES Y METODOS **32**

3.1 Cepas bacterianas utilizadas 32

3.2 Medios de cultivo ensayados 32

3.3 Serología DAS ELISA 32

3.4 Métodos de extracción de ADN de bacteria a partir de tejido infectado 36

3.4.1. Métodos comerciales 36

3.4.1.1. Plant DNA-Zol 36

3.4.1.2. Nucleo Spin Plant 38

3.4.2. Métodos no comerciales 39

3.4.2.1 CTAB (Doyle y Doyle 1990) 39

3.4.2.2 Dellaporta et al. (1983) 40

3.4.2.3 Minisavage et al. (1994) 42

3.5 Métodos de extracción de ADN de colonias bacterianas 43

3.6 Estandarización de la reacción de PCR para *X. fastidiosa* 44

3.6.1 Concentración de ADN 44

3.6.2 Estandarización de la concentración optima de enzima 44

3.6.3Estandarización de la concentración de cloruro de magnesio 45

3.6.4 Estandarización de la cantidad de dNTPs 46

3.6.5 Estandarización de la concentración optima de iniciadores.. 46

3.6.6 Evaluación de temperaturas para la amplificación de *X. fastidiosa* 47

3.7 Estandarización de la reacción de PCR para *R.solanacearum* r3... 47

3.7.1 Concentraciones evaluadas 47

3.8 Electroforesis en geles de agarosa 50

3.8.1 Visualización de la calidad del ADN 50

3.8.2 Visualización de los productos de PCR 51

3.9 Métodos para eliminar inhibidores de la reacción de PCR para *X.. fastidiosa* 51
3.9.1 Inmunocaptura..... 52
3.9.2 Utilización de diferentes concentraciones de PVP agregada directamente a la reacción de PCR..... 52
3.9.3 Purificación del ADN en bloques de agarosa..... 53
3.9.4 Sistema de purificación de ADN Prep-A-Gene ®..... 54

4. RESULTADOS Y DISCUSION..... 55
4.1 Prueba de crecimiento en medios de cultivo..... 55
4.2 Morfología colonial de *X. fastidiosa* y *R. solanacearum* r3..... 55
4.3 DAS-ELISA..... 56
4.4 Métodos de extracción de ADN de tejido vegetal..... 56
4.5 Extracción de ADN de colonias bacterianas..... 57
4.6 Mezcla de reacción definitiva de PCR para *X. fastidiosa*..... 57
4.7 Calidad y concentración del ADN..... 60
4.8 Visualización de los productos de PCR..... 60
4.9 Métodos para eliminar inhibidores de la PCR para *X. fastidiosa*..... 61
4.10 Mezcla de reacción final de PCR para *R. solanacearum* r3..... 61

5. CONCLUSIONES..... 63
6. LITERATURA CITADA..... 65
7. ANEXO..... 74

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de *R. solanacearum* en biovares..... 18
Cuadro 2. Estandarización de la concentración de ADN para Xylella fastidiosa..... 44
Cuadro 3. Mezclas de reacción para la estandarización de Taq polimerasa para X. fastidiosa..... 45
Cuadro 4. Mezclas para la estandarización la concentración de Mg Cl_2 para X. fastidiosa..... 45
Cuadro 5. Estandarización de la concentración de dNTPs para X. fastidiosa..... 46
Cuadro 6. Mezclas de reacción para la estandarización de la cantidad de iniciadores para X. fastidiosa..... 47
Cuadro 7. Estandarización de la concentración de ADN para R. solanacearum 48
Cuadro 8. Estandarización de la Taq polimerasa en R. solanacearum..... 48
Cuadro 9. Mezclas para la estandarización la concentración de Mg Cl_2 en R. solanacearum..... 49
Cuadro 10. Estimación de la concentración de dNTPs para R. solanacearum... 49
Cuadro 11. Cantidad de iniciadores para R. solanacearum..... 50
Cuadro 12. Concentraciones de PVP probadas en la reacción de PCR..... 53
Cuadro 13. Mezcla de reacción definitiva para la PCR de X. fastidiosa..... 58
Cuadro 14. Mezcla de reacción definitiva para R. solanacearum 62

Índice de figuras

Fig. 1 Célula de *Xylella fastidiosa*..... 9

Fig. 2 Aglomeración de bacterias en vasos del xilema..... 9

Fig. 3. Síntomas iniciales en variedades blancas..... 11

Fig. 4. Síntomas avanzados en variedades rojas..... 11

Fig. 5 *Draeculacephala minerva*..... 12

Fig. 6 *Carneocephala fulgida*..... 12

Fig. 7 *Graphocepala atropunctata*..... 12

Fig. 8 *Homolodisca coagulata*..... 12

Fig. 9 Amplificación de ADN de *X. fastidiosa* obtenido con el método CTAB con los iniciadores RST31:RST33..... 59

Fig. 10 Amplificación de *X. fastidiosa* con el método Plant DNA-zol y los iniciadores RST31:RST33..... 59

Fig. 11 Amplificación de *X. fastidiosa* en gel de agarosa al 1.5%..... 60

Fig. 12 Productos de amplificación de ADN de *Ralstonia solanacearum* r3 obtenido con Plant DNA-Zol..... 62

RESUMEN

Xylella fastidiosa y *Ralstonia solanacearum r3* son bacterias cuarentenadas para México que causan la enfermedad de Pierce en vid y la marchitez bacteriana en papa, respectivamente. Estas bacterias requieren una detección rápida y confiable para evitar su introducción o diseminación en el país. Como una alternativa a los métodos tradicionales en la detección o confirmación de la presencia de estas bacterias en México, en este trabajo se estandarizaron los protocolos para su detección mediante PCR utilizando los iniciadores específicos previamente reportados por Minisavage *et al.,* (1994) para el caso de *X. fastidiosa* y Seal *et al* .,1992) para *R. solanacearum r3*. Se evaluaron los métodos de extracción de ADN Plant- DNA-zol , Núcleo Spin plant, CTAB, Dellaporta y Minisavage a partir de bacterias en cultivo y tejido vegetal infectado; además, de las condiciones de la PCR. Se logró la extracción de ADN y estandarización de los protocolos, amplificando para *Ralstonia solanacearum r3* un fragmento de 100 pb con los primers T3A:T5A y un fragmento de 733 pb para *Xylella fastidiosa* con los primers RST31:RST33; sin embargo, no fue posible eliminar los inhibidores del ADN de esta última bacteria purificada a partir de tejido infectado de vid, con los métodos utilizados para esto.

Palabras clave: PCR, bacteria, estandarización, vid, papa

ABSTRACT

Xylella fastidiosa and *Ralstonia solanacearum* r3 are restricted bacteria for Mèxico these respectively cause the Pierce disease in grapevine and the bacterial wilt in potato. These bacteria require a quick and reliable detection to avoid their introduction or dissemination in the country, as an alternative to the traditional methods to detect or to confirm the presence of these bacteria, adjustments of the protocols for polimerasa chain reaction (PCR) were done for the detection of these species, because antecedent of Minisavage *et al.*, (1994) and Seal *et al.*, (1992) they did not give results for the conditions of the present work. The methods of DNA extraction Plant - DNA-zol, Nucleo Spin plant, CTAB, Dellaporta and Minisavage (to grapevine) were evaluated, in addition to different concentrations for the components from the mixture of reaction from PCR, number of cycles and temperatures. It was obtained the DNA extraction and adjustment of the protocols amplifying for *R. solanacearum* r3 a fragment of 100 pb with the primers T3A: T5A and a fragment of 733 pb for *X. fastidiosa* with the primers RST31: RST33, however was not possible to eliminate the inhibitors from extracted DNA of infected grapevine tissue.

Key words : PCR, bacteria, adjust, grapevines, potato

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la demanda mundial de productos agrícolas es muy grande, exige un incremento en la producción que mínimamente corresponda al incremento de la población. Una de las limitantes productivas es el daño por fitopatógenos como hongos, bacterias, nematodos, virus y fitoplasmas (Pedroza, 1995).

En la actualidad, México, así como la mayoría de los países, cuenta con una economía muy activa, en la cual se incluye el intercambio comercial de gran variedad de productos agrícolas implicando con ello, el riesgo de traslado o movilización de patógenos, que al entrar estos en territorio nacional tienen posibilidades de establecerse y ocasionar pérdidas a la economía nacional. Entre estos patógenos cuarentenados se encuentran las bacterias, que son de particular importancia por la dificultad de controlar una infección en campo una vez dada, lo que conduce a grandes pérdidas en la producción agrícola.

Algunas bacterias cuarentenadas para México son *Agrobacterium tumefaciens* (varios hospedantes), *Clavibacter michiganensis* subsp. m*ichiganensis* (tomate y otras solanáceas), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicum* (papa y otras solanáceas), *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (maíz) *Acidovorax avenae* pv *citrulli* (cucurbitáceas), *Pantoea stewartii* (maíz) *Ralstonia solanacearum* r3 (papa) y *Xylella fastidiosa* (vid, durazno, ciruelo y citricos) (DGSV, 1995).

Xylella fastidiosa es un patógeno que bloquea el sistema vascular de las plantas, se dispersa por vectores de la familia Cicadellidae y Cercopidae, afectando a

diferentes especies frutícolas. En vid induce la enfermedad de Pierce, en cítricos produce la clorosis variegada o CVC, en durazno produce enanismo, en ciruela la escaldadura de las hojas y en almendra el tizón o quemadura de las hojas. En México, esta bacteria fue detectada en el Valle de Guadalupe en 1995 y en 1998 se detectó en Valle Santo Tomás y San Vicente en Baja California Norte, pero aunque las plantas infectadas fueron destruidas, este patógeno representa un peligro potencial para la viticultura nacional. Es importante mencionar que una vez que la bacteria ingresa a la planta no existe hasta el momento forma de controlarla (Guevara, 2000).

En México la producción de uva abarca alrededor de 16 estados, entre los cuales Sonora se ubica como el principal productor con 72 a 87% de la uva industrial, el 92% de uva pasa y el 75% de uva para mesa; pero además la importancia social que guarda este fruto es por sus más de cuatro millones de jornales que produce al año, esto sin contar los empleos indirectos (Yoldi, 1996). Baja California es el segundo estado productor siendo la Costa de Ensenada una de las zonas de mayor importancia por el volumen y calidad de la uva, que le permite ser una de las regiones con prestigio mundial para la producción de vinos finos de tal manera que si *X. fastidiosa* se diseminara en el país causaría grandes daños en la producción vitícola (Guevara, 2000).

Ralstonia solanacearum causa la enfermedad conocida como marchitez bacteriana, se han descrito 4 razas de esta bacteria de acuerdo a los hospedantes primarios o 5 biovares de acuerdo al catabolismo de ciertos azucares y alcoholes (Seal *et al.*, 1992). La raza 1 afecta a tabaco, tomate, otras Solanáceas, plántanos dipliodes y otras especies cultivadas y malezas (Gabor y Wiebe, 1997). La raza 2 afecta plátanos triploides y heliconias. La raza 4 afecta mora y la raza 3 ocasiona la marchitez bacteriana de la papa, pudrición parda o también conocida como "la vaquita de la papa" (French, 1985). Esta raza no se ha reportado su presencia en México, de acuerdo a los monitoreos realizados por los laboratorios distribuidos a nivel nacional y autorizados por la Dirección General de Sanidad Vegetal.

Si *R. solanacearum* r3 se estableciera en México afectaría a la segunda dicotiledónea más utilizada en nuestro país como fuente de energía por su alto valor alimenticio como lo es la papa (Valadez, 1997) . Esta se produce en 23 estados, distribuidos en las diferentes regiones del país. De ese total de entidades, cinco concentran el 52% de la superficie total cosechada y el 54% del total de la producción; estos son, por orden de importancia, Sinaloa, México, Puebla, Guanajuato y Nuevo León (Yoldi, 1998). Es una hortaliza de gran importancia económica, debido al ingreso que proporciona a sus productores, así como a la cantidad de empleos que genera en las diferentes regiones productoras, sobre todo durante el periodo de cosecha (Valadez,1997).

Para la detección de fitobacterias se toman en cuenta los síntomas y signos que pueden observarse visualmente en el hospedante, la morfología de las colonias en medios de cultivo y pruebas bioquímicas. La desventaja para bacterias de lento crecimiento, es que requieren de 1-3 semanas para su desarrollo y los contaminantes obscurecen los medios y con ello los resultados. Otra metodología utilizada para el diagnóstico de *X. fastidiosa* y *R. solanacearum* r3 es el empleo de anticuerpos específicos con la técnica de ELISA, sin embargo existen muchos factores que influyen en la certeza del diagnóstico (Mejía *et al.*, 2000). Es por eso que se hace necesario la búsqueda de alternativas complementarias de diagnóstico eficiente para estas bacterias.

Actualmente se ha venido utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) como un método de diagnóstico de fitopatógenos. Esta técnica consiste en incrementar el número de copias de un fragmento específico de ADN por la acción de una enzima (ADN Taq polimerasa). Es una reacción enzimática cíclica que permite una amplificación exponencial de una secuencia nucleotídica particular en el genoma, aún cuando esta se encuentre en concentraciones muy bajas (Martínez, 2000).

La especificidad y sencillez de esta técnica la hacen de gran utilidad en la detección de fitopatógenos o la confirmación de su presencia; es muy útil sobre todo para la detección de aquellos que son difíciles de cultivar artificialmente, además de ofrecer mayor rapidez y sensibilidad. Por lo antes mencionado se pretende estandarizar los protocolos de PCR para la detección oportuna de *X. fastidiosa* en vid y *Ralstonia solanacearum* r3 en papa, utilizando los iniciadores específicos previamente reportados por Minisavage *et al.*, (1994) y Pooler y Hartung (1995), para *X. fastidiosa* y Seal *et al.*, (1992) para *R. solanacearum* r3, dado que los procedimientos de estos autores no mostraron resultados al analizar muestras, en las condiciones en que fue realizado este estudio. Dado que el mejor método para evitar pérdidas por bacterias cuarentenadas es prevenir su introducción al país, o su dispersión a partir de las zonas restringidas, se requiere de una detección oportuna en material vegetal de importación y exportación. La estandarización de los procedimientos específicos de PCR para *X. fastidiosa* y *R. solanacearum* r3 puede agilizar el diagnóstico para la detección en plantas o semillas vegetativas de importación, infectadas por estas bacterias y de esta manera, reducir su dispersión y prevenir epidemias futuras en dichos cultivos (Mejía *et al.*, 2001).

1.1 OBJETIVOS

1). Estandarizar las condiciones óptimas de PCR para la detección de *Xylella fastidiosa* y *Ralstonia solanacearum* r3.

2). Determinar el mejor método para la extracción de ADN de las bacterias *Xylella fastidiosa* y *Ralstonia solanacearum* r3.

3). Determinar el mejor método para la purificación de ADN de *Xylella fastidiosa* extraído de tejido de vid infectado.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Bacterias cuarentenadas para México.

En la actualidad México, así como la mayoría de los países cuenta con una economía muy activa, en la cual se incluye el intercambio comercial de una gran variedad de productos agrícolas implicando con ello, el riesgo de traslado o movilización de patógenos que al entrar estos en territorio nacional tienen posibilidades de establecerse y ocasionar pérdidas a la economía nacional. Entre estos patógenos cuarentenados se encuentran las bacterias, que son de particular importancia por la dificultad de controlar una infección en campo una vez dada, lo que conduce a grandes perdidas en la producción agrícola.

Algunas bacterias cuarentenadas para México son *Agrobacterium tumefaciens* (en un gran numero de especies),*Clavibacter michiganensis* subsp. m*ichiganensis* (tomate y otras solanáceas), *C. michiganensis* subsp. *sepedonicum* (papa), *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (maíz) *Acidovorax avenae* pv *citrulli* (afecta cucurbitáceas), *Pantoea stewartii* (maíz) *Ralstonia solanacearum* r3 (papa) y *Xylella fastidiosa* (vid, ciruelo durazno y citricos) (DGSV, 1995).

2.2 Generalidades sobre el cultivo de la vid.

La producción de uva en nuestro país abarca cerca de 16 estados, de entre los cuales Sonora se ubica como el principal productor con 72 a 87% de la uva industrial, el 92% de uva pasa y el 75% de uva para mesa; pero además la importancia social que guarda este fruto es por sus más de cuatro millones de jornales que produce al año, esto sin contar los empleos indirectos.

2.2.1 Origen

La vid (*Vitis vinifera* L.) es originaria del Asia Menor, específicamente del Sur del Cáucaso, parte de Rusia, Irán y la India. La historia de la uva acompaña el desarrollo de las civilizaciones, de ahí que existan numerosos escritos antiguos que así lo atestiguan. La generación de vino es quizá el principal uso que se le ha dado a través del tiempo; sin embargo, su sabor delicioso, y su alto contenido de azúcar, han permitido que se consuma en fresco o pasa.

El origen de la vid en nuestro continente y específicamente en el país, se remonta a la época colonial, ya que la vid europea fue traída por Cristóbal Colón durante su segundo viaje en el año de 1493; aunque ya algunos tipos de vides silvestres eran aprovechadas rudimentariamente, principalmente las especies *vitis rupestris*, *vitis labrusca* y *vitis barlandieri* (Yoldi, 1996).

2.2.2 Historia del cultivo en México

El cultivo de la uva en México tiene como primer antecedente histórico el año de 1524, cuando Hernán Cortés ordenó plantar vides nativas para luego injertarlas con europeas. De esta manera, la producción de uva es una clara muestra del proceso de mestizaje, que se realizó en nuestro país con la llegada de los españoles: " Del cultivo de la *Vitis vinifera* en América, puede afirmarse que México fue el primer país donde los españoles lo intentaron con éxito. En la década de los treinta se inicia la explotación comercial de la uva llevada a cabo por los mineros que se establecieron en el valle de Santo Tomás fundando así, en el año de 1938, la primera empresa vinícola del país: "Bodegas de Santo Tomás" (Yoldi, 1996).

2.2.3 Superficie y producción nacional

Alrededor de 16 estados de la República Mexicana son productores de uva; entre los cuales Sonora, Baja California, Zacatecas, Coahuila y Aguascalientes contribuyen con el 93% de la superficie sembrada y cosechada; así como el 95% de la producción, a pesar de que existen otros 11 estados productores de vid en México. La superficie sembrada y cosechada disminuye ligeramente con los años debido a la importación de uva desde Chile.

Hoy en día, la producción vinícola del país tiene tres destinos principales de acuerdo a datos aportados por la Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa del estado de Sonora; se señala que para 1994, de la producción total de uva del país que ellos estiman en 504,000 toneladas, el 17.50% es para uva de mesa, el 21.82% para uva pasa (que son las de mayor generación de divisas al país), mientras que el restante 60.68% se destina a la industria (Yoldi, 1996).

2.2.4 Variedades

Aparentemente las variedades rojas son más susceptibles a la enfermedad de Pierce que las blancas (Anónimo, 2000). Según su uso, de acuerdo a lo reportado por la Dirección General de Política Agrícola de la SAGARPA y de la Dirección de Sistema-Producto, las variedades se agrupan de la siguiente manera:

a) Para la industria vitivinícola en brandis y vinos de mesa; Pinot Noir, Ruby, Cabernet, Petite Sirah, Grenache, Malber, Cabernet Sauvignon, Cariagne y Zinfandel (variedades rojas); y Sauvignon Blanc, Palomino, Chenin Blanc, San Emilión, Pinot Blanc y White Riesling (variedades blancas). b) Para consumo en fresco. Barlinka, Italia, Rish Baba,Emperador, Exotic, Cardinal, Rosa del Perú Queen, Tokay, Flame, Superior, Ribier y Red malaga (variedades rojas), además de Thompson seedles, Malaga, ,Oliveer Blanch, Dattier de Beirut,y Blak Monukka (variedades blancas) (Yoldi, 1996).

2.3 Principales patógenos que afectan a la vid.

Los principales problemas de la vid en México se pueden clasificar como bióticos y abióticos. Dentro de los bióticos se encuentran todos los causados por organismos que afectan la calidad, disminuyen el rendimiento y atacan la estructura permanente de la parra , las enfermedades más sobresalientes son el mildiu (*Plasmopara vitícola*), cenicilla (*Uncinula necator*), brazo muerto (*Eutypa armeniaceae*), pudrición texana (*Phymatotrichum omnivorum)*, enfermedad de Pierce *(Xylella fastidiosa)* y virosis (GFV, GLV y GCBV); plagas como la Chicharrita (*Dikerella cockerelli y Erythroneura elegantula*), descarnador de la vid (*Harrisina brillians*), mosquita de la fruta (*Drosophila* spp), phylloxera (solo la fase no alada *Dactylosphaera vitifoliae*); la presencia de nematodos (*Meloidogyne* sp. y *Xiphinema* sp.) y malezas . Dentro de los abióticos destacan la presencia de heladas y pH elevado (Jiménez y Madero, 2001).

2.3.1 Características y ubicación taxonómica de *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa es una bacteria gram negativa, alargada, de forma bacilar y pared celular crenulada doble o triple (Donadio y Soares, 1997) (Fig. 1). Los bacilos miden de 0.2-0.4 de ancho por 1.0-4.0 µm de largo, son inmóviles y se crecen bien en medios PW, CS20, BCYE (Shaad *et al.*, 2001) y XF26 (Chang y Donaldson, 1993), se desarrollan a una temperatura entre 20 y 32° C con un óptimo de 29°C; puede ser observada por microscopia de contraste. Esta especie junto con hospedantes alternos y vectores causa la enfermedad de Pierce en vid, también llamada "enfermedad de Anaheim" ó "viña enferma de California", es causada por la acumulación de bacterias en los haces vasculares (Fig.2). Fue nombrada como enfermedad de Pierce en reconocimiento a la contribución de Newton Pierce en el estudio de esta enfermedad en 1941 (Guevara, 2000).

La bacteria pertenece al Reino: Protista, División: Gracilicute, Orden: Xanthomonales, Familia: Xanthomonadacea, Genero: Xylella y Especie: fastidiosa (Schaad, 2001).

Fig.1. Célula de *Xylella fastidiosa* (Foto de M Garnier en Donadio, 1997).

Fig. 2 Aglomeración de bacterias en vasos del xilema (Anónimo, 2000)

2.3.2 Distribución.

La bacteria con sus diferentes variantes tiene una amplia distribución mundial, en algunos lugares se confirma como virulenta y en otros solamente se ha detectado. Berisha *et al.*, (1998) mencionan que en Kosova Yugoslavia se detectó una cepa virulenta de *X. fastidiosa* en plantas de vid con síntomas de la enfermedad de Pierce. Hernández y Ochoa (1994) mencionan la presencia de la enfermedad en Venezuela afectando a vid. También se ha reportado en almendros de la India y árboles de pera en Taiwán (Leu,1998), así como en cítricos y café en Brasil (Donadio y Soares, 1997).

En Estados Unidos se ha reportado la presencia de la bacteria desde Florida hasta Texas por el Golfo, Arizona, Alabama, Arkansas, Georgia, Indiana, Kentucky, Lousiana, Maryland, Mississippi, Missouri, Montana, Nebraska, New Jersey, New México, North Carolina, Pennsylvania, Tennessee, Virginia y en California ampliamente distribuida (Purcell y Hopkins, 1996).

En México Guevara (2000) menciona que la enfermedad de Pierce fue detectada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) – Campo Experimental Costa de Ensenada (CECOEN) en 1995 en el Valle de Guadalupe, Baja California Norte y en 1998 se detectó por ELISA en algunos viñedos del Valle de Santo Tomás y San Vicente. Aunque estos brotes se eliminaron, la enfermedad representa un peligro potencial para la viticultura regional y nacional.

2.3.3 Hospedantes.

La bacteria *Xylella fastidiosa* causa pérdidas económicas en varios cultivos agrícolas de importancia, existen varios tipos o cepas, el tipo que induce la enfermedad de Pierce, el enanismo de la alfalfa y el tizón o quemadura de la hoja en almendro, parecen ser del miso grupo (PD), mientras que el tipo que produce el enanismo del durazno, del chabacano y la escaldadura de la hoja del ciruelo pertenece a un tipo o cepa diferente (PPD) (Hill y Purcell, 1997). Al parecer existe otro grupo que en cítricos produce la clorosis variegada y puede atacar al café (Donadio y Soares, 1997).

Sin embargo los cultivos antes mencionados no son los únicos hospedantes, se conocen mas de cincuenta tan solo para el grupo PD (Anexo 7.4), entre estos plantas forestales, ornamentales y malezas, muchas de las cuales se encuentran en zonas aledañas o en áreas de producción y podrían servir como reservorios de la bacteria puesto que algunas plantas son también hospederas de vectores (Hernández y Ochoa, 1994).

2.3.4 Síntomas de la enfermedad de Pierce en vid.

Las hojas presentan una clorosis intervenal, mientras los márgenes se tornan amarillos en variedades blancas (Fig. 3) y rojizos en variedades rojas o tintas (Fig. 4). Conforme la enfermedad avanza, los márgenes de las hojas se secan,

tornándose de color café con aspecto de quemadura, presentan anillos concéntricos del margen hacia el centro de las hojas y mueren dejando los pecíolos adheridos a los tallos (Fig. 4). En el tallo la enfermedad se expresa por una maduración irregular de los brotes nuevos, produciendo zonas verdes rodeadas de zonas castañas, presentan entrenudos cortos a menudo en forma de zigzag. Los síntomas de mediados de verano y otoño son más confiables para la identificación de la enfermedad que los de primavera, debido a que es cuando existe la mayor población de vectores (Guevara, 2000). Otro síntoma característico de la enfermedad es el retraso del inicio de la brotación en primavera y cuando estas plantas brotan presentan pocos retoños y estos son cloróticos o raquíticos. Los racimos sufren corrimiento, las raíces se secan a partir del segundo año y la planta entera presenta disminución en el crecimiento (Ferraro, 1983). Mejía *et al.*, (2000) menciona que los síntomas son causados por el bloqueo del sistema vascular de la planta, principalmente el xilema, este bloqueo a su vez es causado por la multiplicación bacteriana, la formación de toxinas, tílides y exudados de defensa de la planta.

Las variedades altamente susceptibles rara vez sobreviven más de 2-3 años, mientras que las más tolerantes pueden aguantar la infección por 5 años o más. Ha sido evidente en los viñedos jóvenes que llegan a infectarse, que los daños son más severos que en viñedos viejos (Goodwin y Purcell, 1992).

Fig. 3. Síntomas iniciales en variedades variedades blancas (Hellman, 2002).

Fig.4. Síntomas avanzados en rojas (Anónimo, 2002)

2.3.5 Transmisión y vectores de *X. fastidiosa*

Xylella fastidiosa se dispersa por material infectado, pero también por vectores con aparato bucal chupador, principalmente de las familias Cicadellidae y Cercopidae. El insecto se alimenta de una planta enferma (comúnmente una maleza asintomática) y adquiere la bacteria, la cual se adhiere al aparato bucal del vector y se reproduce en el mismo, si el insecto adquiere la bacteria en estado de ninfa la pierde en la primera muda, sin embargo si la adquiere como adulto, es infectivo durante el resto de su vida, liberándola cada vez que se alimenta en una planta sana.

En vid los vectores más conocidos y más cercanos reportados en California (EUA) son la chicharrita verde *Draeculacephala minerva* (Fig. 5), chicharrita verde azul cabeza roja *Carneocephala fulgida* (Fig.6) y *Graphocephala atropunctata* (Fig.7), que incluso presenta preferencia por algunos cultivares de vid (Purcell, 1981). Auque en México se reportan estos insectos como vectores para vid, Turner y Pollard, (1959) mencionan a *Homolodisca cuagulata* (Fig.8), *H. faciales, H. Simillis, H. Insolita, Graphocephala versuta* y *Cuerna costalis* trasmitiendo a *X. fastidosa* como vector principal en durazno. En California se menciona a *Homolodisca cuagulata, Homolodisca lacerata* y *Graphocephala atropunctata* como vectores de la enfermedad en algunas plantas de uso ornamental como la adelfa (oleander) (Costa *et al.*, 2000).

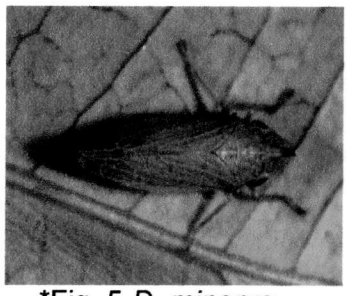

*Fig. 5 *D. minerva*

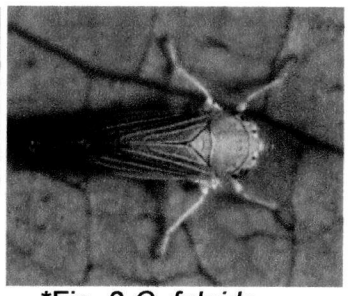

*Fig. 6 *C. fulgida*

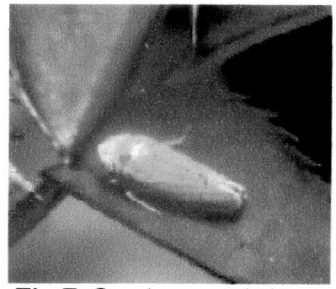

Fig.7 *G. atropunctata* * (Foto de Dumbar, 2002)

Fig.8 *H. cuagulata*

*Fotografías de Anónimo (2000)

2.3.6 Manejo

En primer lugar es necesario que el material propagativo a utilizar este libre de la bacteria, puesto que una vez que esta ingresa a la planta, comienza su establecimiento y no existe hasta este momento forma de combatirla; por lo que es necesario eliminar las plantas enfermas y establecer medidas regulatorias para la introducción de material vegetal y su movilización en territorio nacional (Mejía y, López, 2001).

El principal hospedero de los insectos vectores dentro de los lotes de producción y en las zonas circundantes es el zacate gramma (*Cynodon dactilon*) por lo que se recomienda el control cultural con rastreos, además de hacer un control de malezas para reducir las poblaciones del vector que aumentan de agosto a noviembre. Para controlar al vector se recomienda hacer monitoreo y control químico con productos como el Dimetoato 1-1.5 l /ha, imidacloprid y diazinon entre otros, además de hacer inspecciones continuas en plantaciones para detectar plantas enfermas (Guevara, 2000).

Se ha intentado controlar a la bacteria directamente en plantas enfermas con Tetraciclina, pero el resultado fue la disminución temporal de los síntomas y no se logró el control (Hopkins y Mortensen, 1971). También se han realizado experimentos utilizando tratamientos de temperaturas bajas en plantas de vid infectadas y con síntomas de la enfermedad de Pierce, encontrando que el preacondicionamiento de las plantas a 2-4° C (para reducir mortalidad), seguido de un tratamiento de –8 a –12°C repetido por 2- 3 veces o más, logra una disminución de síntomas y mantiene las plantas sanas hasta por tres años (Purcell, 1977). En cuanto a la utilización de temperaturas altas Goheen, (1973) señala que el tratamiento de material vegetal propagativo a 45°C por al menos 3 horas, tiene un alto porcentaje de control.

Robacker y Chang (1992) mencionan que el cultivo de tejidos a partir de ápices de 45 mm de brotes en uvas del tipo Muscadine previamente inoculadas, resultó en plantas sanas, lo que puede ser una alternativa para rescatar material genético valioso. El procedimiento anterior ha funcionado también para eliminar *Agrobacterium tumefaciens,* otra de las bacterias de interés económico (Thies y Graves, 1992).

2.4 Generalidades sobre la papa

La papa en nuestro país es la segunda dicotiledónea más utilizada como fuente de energía, por su alto valor alimenticio, ya que los especialistas consideran que la papa contiene carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales, así como vitaminas A, C, G y vitaminas del complejo B. De igual forma se considera que bajo las condiciones apropiadas, la papa tiene un contenido mayor de nutrientes que los cereales, de tal forma que le sigue en importancia a la soya, la cual ocupa el primer lugar en cuanto al rendimiento de proteínas vegetales. La importancia económica que tiene dicha hortaliza, se debe al ingreso que proporciona a sus productores, así como a la cantidad de empleos que genera en las diferentes regiones productoras, sobre todo durante el periodo de cosecha (Valadez,1997).

2.4.1 Origen

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de América, específicamente, de la región sur, donde se ubica la zona andina, que comprende los países de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile, aunque también se ha podido demostrar, que algunas variedades silvestres, son originarias de México (Castaños,1993).

2.4.2 Historia del cultivo

Se considera que los incas cultivaban esta hortaliza desde hace 2,000 años en Perú , lo que habla necesariamente, de la tradición de este producto en las culturas indígenas del continente. Posteriormente, con la llegada de los españoles el uso de esta especie se extendió en México y Europa en el año de 1537. Durante el periodo de 1600 a 1845, la papa se constituyó como la principal fuente de alimentos de Irlanda, después de la hambruna, los inmigrantes de este país, trajeron a Norteamérica la papa en el año de 1719 (Hooker, 1981).

2.4.3 Superficie y producción nacional

La papa se cultiva en gran parte del territorio nacional, se produce en 23 estados, distribuidos en las diferentes regiones del país. De ese total de entidades, cinco concentran el 52% de la superficie total cosechada y el 54% del total de la producción; estos son, por orden de importancia, Sinaloa, México, Puebla, Guanajuato y Nuevo León. Revisando los datos de la década actual, en lo que se refiere a superficie sembrada, podemos encontrar que se ha reducido de manera significativa ya que pasó de 82,645 has. en 1990 a 63,558 has. en 1996, lo que representa una diferencia de 23%.

Los datos anteriormente señalados, tienen su impacto en los volúmenes productivos, en donde se puede observar que las superficies de riego produjeron en promedio el 70% de la producción, correspondiéndole al 30% restante, a las superficies de temporal. En rendimiento, los datos son muy similares, ya que el promedio de productividad durante el periodo de 1990-1996 en las superficies de riego fue de 22.707 ton/ha, mientras que las de temporal alcanzaron sólo 11.886 ton/ha. Es posible ubicar estados en los que los rendimientos están por encima de la media nacional como es el caso de Coahuila donde en 1996 el rendimiento fue de 30.906 ton./ha., Baja California con 31.949 ton./ha., Zacatecas con 32.794 ton./ha. y el que alcanzó mayor nivel, fue Jalisco con 34.637 ton./ha (Yoldi, 1998).

2.4.4 Variedades

Algunos especialistas señalan que se cuenta en el mundo con más de un millar de variedades, las cuales se pueden dividir en una primera instancia, de acuerdo al uso que se les da en variedades industriales, variedades para consumo en fresco y variedades llamadas finas. En nuestro país también existe un importante número de variedades entre las que destaca la Alpha, que participa con el 44% de la superficie nacional cosechada y más de la mitad de la producción total del país; además se cuenta con otras como la López, Tollocan, Atzimba, Greta, Murca, Furore, White Rose y Criolla, muchas de las cuales son variedades liberadas, resistentes a tizón tardío, sin embargo no se sabe si presentan resistencia a *Ralstonia solanacearum* r3, pues esta raza no se encuentra en México (Yoldi, 1998).

2.5 Principales patógenos que afectan al cultivo

La papa es uno de los cultivos más afectados por diversos patógenos, insectos, nematodos, ácaros y otros factores. Las principales enfermedades bacterianas son la pudrición blanda por *Erwinia carotovora* patovar *atroseptica,* la pudrición café por *Ralstonia solanacearum*, pudrición anular causada por *Clavibacter michiganen*sis subsp. *Sepedonicum* (Hooker, 1981). En cuanto enfermedades fungosas la principal es el tizón tardío causado por *Phytophtora infestans*, el tizón temprano causado por *Alternaria solani*, Oidiosis por *Erysiphe cichoracearum*, Esclerotiniosis por *Sclerotinia sclerotiorum*, pudrición por *Rhizoctonia solani* y marchitez por *Fusarium spp.* El cultivo se ve afectado también por numerosos virus como el PRLV ó virus del enrollamiento de las hojas, los virus, PVY, PVA , PVX, PMV, PSV, que muestran hojas arrugadas y mosaicos, APMV "Andean Potato Mottle Virus" , APLV "Andean Potato Latent Virus", TRV "Tobacco Rattle Virus" AMV el virus mosaico de la alfalfa y el virus de la mancha anular del tabaco (TRSV), además de la punta morada de la papa causada por un micoplasma y algunas otras enfermedades fisiológicas (CIP, 1985; Hooker, 1981).

2.5.1 *Ralstonia solanacearum* características y ubicación taxonómica

Bacteria gram- negativa, redondeada, de pared celular simple , mide de 0.5-0.7 por 1.5-2.5 µm, (Schaad *et al.*, 2001). Su óptimo crecimiento es de 30-32°C. Las células cultivadas en medio son motiles con un flagelo polar, mientras que las silvestres son no móviles. Esta especie causa la pudrición café o marchitez bacteriana en numerosas especies cultivadas, *R. solanacearum* raza 3 causa la marchitez bacteriana de la papa también conocida como "vaquita de la papa" (Hooker, 1981).

R. solanacearum Reino: Protista, Clase: Gracilicute Orden: Pseudomonales Familia:Pseudomonaceae, Genero: Ralstonia y Especie: solanacearum. (Schaad, *et al.*,2001).

2.5.2 Distribución

La marchitez bacteriana está ampliamente distribuida en todas las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo, es uno de los principales factores limitantes para el cultivo de papa y otras especies, esta enfermedad es causada por la raza 1 de *R. solanacearum* . La raza 2 causa la enfermedad del Moko del plátano, la cual se encuentra en Centro, Sudamérica y el Caribe. La raza 3 afecta a papa y tomate principalmente; y se ha reportado en Inglaterra y Australia, por lo general se encuentra en zonas frías de alta latitud (Fahy y Presley, 1983).

2.5.3 Razas y Hospedantes

Los especialistas han clasificado a la bacteria *Ralstonia solanacearum* en 4 razas fisiológicas, separándolas de acuerdo a los hospedantes que ataca cada una de ellas en condiciones de campo, los síntomas que presentan en hospederos diferenciales y por la apariencia de las colonias en un medio que contenga cloruro de tetrazolium. La raza 1 afecta a tabaco, tomate, otras Solanáceas, plátanos dipliodes y

otras especies. La raza 2 afecta plátanos triploides y heliconias. La raza 3 afecta principalmente papa y tomate, pero no es muy virulenta en otras Solanáceas y la raza 4 afecta a mora (Gaxiola, 1978). Este sistema se complementa con características como tamaño y color de colonia, producción de tirosinasa, reacción de hipersensibilidad en tabaco, especificidad a antibióticos y temperatura óptima de crecimiento (French, 1985).

El segundo sistema clasifica a *R. solanacearum* en 5 biovares (antes biotipos) de acuerdo a su capacidad para utilizar tres disacáridos y/o para oxidar tres alcoholes. El biovar II coincide con la raza 3 en la mayoría de sus características, el viobar 5 coincide con la raza 4, pero los biovares I, III y IV, no parecen estar muy relacionados en su habilidad patogénica, pues se encuentran en la raza 1 y 2 (French *et al.*,1995).

Cuadro 1. Clasificación de *R. solanacearum* en biovares

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilización de disacáridos					
Celobiosa	-	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	-	+
Oxidación de alcoholes					
Dulcitol	-	-	+	+	-
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-

2.5.4 Síntomas

La bacteria penetra principalmente por heridas y se distribuye a través del sistema vascular de la planta. Los síntomas varían de acuerdo a la especie hospedante y otros factores, pero en papa la raza 3 de *R. solanacearum,* ocasiona marchitez,

esta avanza marchitando la mitad de una hoja, luego las hojas de un lado de los tallos y cuando el avance de la enfermedad es muy rápido se marchitan todos los tallos de la planta, lo cual se debe a la pudrición del tejido vascular. Cuando se realiza un corte transversal en los tallos marchitos se observa un color café y exudan un mucílago lechoso, pero al realizar un corte longitudinal se observan franjas alargadas de color obscuro. Los tubérculos no siempre presentan síntomas externos visibles, pero en infecciones severas se observa exudado bacteriano en los ojos y cicatriz del estolón (causando que el suelo quede adherido en la hendidura de los ojos). Al realizar un corte transversal en un tubérculo enfermo se puede observar un anillo de color pardo en los haces vasculares donde al presionar salen gotas de mucílago color perla, posteriormente el tubérculo se descompone por infecciones secundarias (Roncal, 1990).

2.5.5 Transmisión

La bacteria *R. solanacearum* particularmente la raza 3 se disemina principalmente por tubérculos infectados al utilizarlos como semilla y en suelos infectados puede persistir durante cuatro años, penetra por heridas naturales originadas durante la emergencia de las raicillas, por daños mecánicos, por nematodos o por el corte de raíces durante las labores culturales. El uso de tubérculos partidos así como de maquinaria usada para eso y otras herramientas, puede contribuir a la dispersión de la enfermedad (Roncal, 1990).

2.5.6 Manejo

La base del manejo de *R. solanacearum* r3 actualmente es el uso de semilla sana con variedades tolerantes. No existe un control químico efectivo, por lo tanto es necesario aplicar varias técnicas integradas para lograr la reducción o erradicación de la enfermedad. Cuando esta enfermedad se presenta por dos años consecutivos,

es necesario rotar con una especie que no sea solanácea. El control cultural incluye el control oportuno de malezas, eliminar plantas enfermas, movimiento mínimo de la planta a partir de la emergencia, desinfección de las herramientas antes de pasar a otro lote de cultivo y sembrar de preferencia en la estación fría. Se recomienda también el control del nematodo agallador (*Meloidogyne incógnita*) en campos infectados (CIP, 2002).

2.6 Métodos tradicionales de detección de *X. fastidiosa* y *R. solanacearum* r3

En forma tradicional para la detección de fitobacterias se toman en cuenta los síntomas y signos que pueden observarse en el hospedante, se realiza el aislamiento en medios de cultivo, una vez que se tienen bacterias se observa la morfología colonial y se les realizan diferentes pruebas bioquímicas para determinar a que género y especie corresponden, la desventaja para bacterias de lento crecimiento como *X. fastidiosa* es que requieren de 1-3 semanas para su crecimiento y la cantidad de bacteria no es suficiente para realizar pruebas bioquímicas. El método mas utilizado en los últimos años para detección y diagnóstico de bacterias es el empleo de anticuerpos específicos con la técnica de ELISA en sus diferentes variantes y sin embargo puede dar falsos resultados cuando no se tiene la experiencia necesaria, no se cumplen los requisitos de la técnica o simplemente por que los anticuerpos reaccionan con los componentes celulares vegetales (Mejía *et al.*, 2000).

2.6.1 Aislamiento en medios de cultivo

Fry *et al.*, (1990) mencionan que todas las cepas o tipos de la bacteria *X. fastidiosa* son difíciles de cultivar en un medio artificial y no crecen en medios generales, por que se requiere de medios específicos para su cultivo. Chang y Donaldson, (1993) reportan un medio específico para cultivar la bacteria aislada de vid el XF-26.

Mientras que Fry *et al.*, (1990) utilizan el medio PD2 para el aislamiento de la bacteria . Se ha empleado también el medio BCYE, para el aumento de la bacteria en cítricos como reporta Hartung *et al.*, (1994). Existen otros medios que pueden permitir el crecimiento de la bacteria como el CS-20 (Shaad *et al.*, 2001).

Para el aislamiento de *Ralstonia solanacearum* se describen varios medios de cultivo semiselectivos, sin embargo ninguno ha sido enteramente satisfactorio para todas las bacterias de la especie. El medio mas conocido y distribuido es el SM-1, el SMSA, SMSA modificado y el TTC (Shaad *et al.*, 2001).

2.6.2 Morfología colonial

Chang y Donaldson (1993) describen las colonias de la bacteria *X. fastidiosa* como opalescentes, blancas y de un tamaño medio de 0.04-0.43 mm de diámetro, después de 7 días de crecimiento en medio XF-26. Fry *et al.*, (1990) mencionan que las colonias son pequeñas de 0.5-1.0 mm diámetro, redondas con forma de domo y de color blanco, en medios PD2, PD3 y NA, después de 9 días de crecimiento. Mientras Rodríguez (2001) menciona de manera general que las colonias de la bacteria son convexas, mucoides y opacas.

En el caso de *solanacearum* r3 Rodríguez (2001), describe a las colonias del género *Ralstonia* como blancas y en las primeras horas de incubación son convexas, pero conforme pasa el tiempo se hacen fluidas, no producen pigmento fluorescente en medio B de King.

2.6.3 Tinción diferencial

Como las células bacterianas son incoloras, se requiere del empleo de colorantes para hacerlas mas nítidas al microscopio, para lo cual se emplean técnicas de tinción

simple o diferencial. Para la tinción simple el azul de metileno de Loeffler es uno de los reactivos más utilizados, es excelente para las bacterias del género *Curtobacterium*, donde puede demostrar el perlado y los gránulos en los bacillos esporulados (*Bacillus* y *Clostridium*) teñidos con este reactivo, donde las esporas aparecen como cuerpos no teñidos dentro de las células azules. En la tinción diferencial una de las técnicas más utilizadas es la "Tinción de Gram", por que no solo permite diferenciar la forma y agrupación de las bacterias, sino también es de considerable valor para identificación y clasificación, al separar a las bacterias en gram negativas y gram positivas (Rodríguez, 2001).

2.6.4 Pruebas bioquímicas y fisiológicas

Una serie de características fisiológicas se utilizan para diagnosticar bacterias fitopatógenas, como la habilidad para usar determinados sustratos, la producción o reducción de sacarosa, metabolismo oxidativo o fermentativo de la glucosa, temperatura óptima de crecimiento, y tolerancia al cloruro de sodio (Seege, 1993).

Las pruebas bioquímicas son de gran importancia en la caracterización de las bacterias fitopatógenas, ya que utilizan sus propias habilidades metabólicas, características tales como la producción de enzimas, tolerancia a ciertos compuestos tóxicos y la transformación de ciertos sustratos, como cualquier otro método de caracterización e identificación de bacterias, las pruebas bioquímicas están sujetas a ciertas objeciones , como el hecho de que se pueden producir mutantes que lleven información genética de un fago combinado con el material genético de la bacteria y que presenten otras características.

2.6.5 Pruebas de patogenicidad

La característica más importante de la mayoría de las bacterias fitopatógenas es su capacidad para destruir las células en la zona infectada en sus hospedantes a lo que

se llama patogenicidad (Seege,1993). Para probar la patogenicidad de una cepa bacteriana se requiere de reproducir los síntomas en el hospedante o plantas homologas en el menor tiempo posible, hasta ahora se tienen: la reacción de hipersensibilidad en tabaco, pudrición del tubérculo de papa e inoculación de frutos (Rodríguez, 2001). Para bacterias que producen marchitez se realiza la inoculación por punción o por inmersión de la raíz en la suspensión bacteriana.

Es posible utilizar pruebas de patogenicidad para *X. fastidiosa* con el inconveniente de que los síntomas en sus hospedantes se desarrollan como mínimo después de 6 semanas después de la inoculación y algunos toman incluso hasta 24 meses (Shaad *et al.*, 2001). En una investigación realizada para observar la reacción de plantas de tabaco a la inoculación de *X. fastidiosa* cepa de cítricos (CVC), los síntomas de la enfermedad aparecieron a las diez semanas después de la primera inoculación (una inoculación cada 30 días) y se observaron los síntomas típicos como lesiones naranja obscuro en los márgenes de las hojas viejas (Lopes, *et al.* 2000).

2.7 Métodos Serológicos

Cuando se introduce un patógeno (antígeno) en la sangre de un organismo de sangre caliente, este reacciona produciendo anticuerpos, estos son globulinas que son producidas en células sanguíneas. El suero que contiene los anticuerpos es conocido como antisuero. Los anticuerpos antes mencionados tienen la capacidad de reaccionar con los antígenos (compuestos de proteína), esto es la base de los métodos serológicos. La doble precipitación en gel, inmunoflourescencia, y ELISA, son utilizadas para la detección bacterias fitopatógenas y son más específicas y precisas que las pruebas bioquímicas y fisiológicas, debido a que diferencian entre especies y aún patovares, su inconveniencia es que no permiten determinar la viabilidad del patógeno.

2.7.1 DAS-ELISA

La prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), es un método confiable y rápido para la detección de agentes fitopatógenos, ya que hace posible la detección de cantidades muy pequeñas de estos agentes en órganos de plantas (Cruz, 1997).

La variante DAS- ELISA (sándwich de doble anticuerpo), es la prueba de diagnóstico más comúnmente utilizada en la detección de fitopatógenos. Se basa en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno, seguida de la adición de los antígenos o fitopatógenos, los cuales se adhieren a los anticuerpos ya adheridos a la placa, posteriormente se agregan nuevamente un anticuerpo ligado con una enzima (conjugado), que se une a los patógenos capturados en la placa, enseguida se agrega un sustrato que reacciona hidrolizado con la enzima, dando un cambio de color cuando esta presente el patógeno (anticuerpo + antígenos + anticuerpo-enzima + sustrato = color). Los resultados se pueden determinar visualmente y cuantificar con un lector de placas que contiene un espectrofotómetro (Cruz, 1997). Esta variante de la técnica es la que se utiliza para la detección de *X. fastidiosa y R. solanacearum* r3.

2.7.2 Inmuno-PCR

La detección de patógenos que combina el uso de anticuerpos para captar al patógeno más el PCR o Inmunocaptura como su nombre lo dice se basa en la adsorción del anticuerpos específico a una placa de poliestireno, enseguida por la adición del antígeno o fitopatógeno, los cuales se adhieren a los anticuerpos, después del lavado de la placa los fitopatógenos, en este caso las bacterias quedan adheridas (capturadas) al anticuerpo y cualquier otro compuesto se elimina. Después de esto, esta mezcla es agregada directamente a la reacción de PCR . Este

procedimiento ha sido usado con éxito para detectar el Plum Pox Potyvirus y bacterias del género *Salmonella* (Henson y French, 1993).

2.8 Técnicas moleculares

En las últimas décadas el surgimiento de poderosas técnicas de recombinación de ácidos nucleicos ha propiciado una época dorada tanto en la biología molecular, como en las demás ciencias biológicas, donde han aportado herramientas para caracterizar y detectar a microorganismos fitopatógenos (Martínez, 2000). Estas técnicas están basadas en el análisis de ácidos nucleicos y detectan variaciones directas a nivel de ADN conocidas como huellas (Valadez, y Kahal, 2000). Algunas de las técnicas son Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación de los polimorfismos en los fragmentos de restricción (AFLP), Amplificación aleatoria de marcadores de ADN polimorfico (RAPD) y Reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas como PCR (Lin, *et al.* 1996).

Los RFLPs y RAPDs son técnicas que se basan en el uso de endonucleasas de restricción que fragmentan el ADN de los organismos, estos fragmentos se amplifican y de acuerdo al patrón de huellas, que muestra las similitudes y diferencias entre fitopatógenos de una misma o diferente especie (Lin, *et al.* 1996). Para los RAPDs se utilizan iniciadores aleatorios, donde los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas, no involucra la transferencia tipo Southern y son una herramienta para generar mapas genéticos y analizar relaciones taxonómicas (Valadez y Kahal, 2000). Los RFLPs expresan diferencias en sitios específicos del ADN mediante el uso de "sondas" que son pequeños segmentos de ADN cromosómico, para detectar fragmentos de ADN en una muestra compleja de ADN cromosómico mediante la hibridación tipo Southern, se usan para detectar ciertos genes, por ejemplo los que confieren resistencia a fitopatógenos (Valadez, et al. 1997). Las técnicas anteriormente descritas son de uso constante en investigación, pero para detección de bacterias fitopatógenas su utilización es menos frecuente.

2.8.1 PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en Inglés), fue descrita por Kary Mullis en 1985, y desde entonces ha revolucionado las ciencias biológicas en general; es una de las técnicas más ampliamente usadas por su gran especificidad y sencillez (Leyva y Martínez, 2001). Esta técnica se ha venido utilizando en diagnóstico medico, criminalística, identificación forense y en detección de fitopatógenos (Brown, 1995). La PCR es una reacción enzimática en la cual un segmento de ADN de una región específica del genoma de la especie se amplifica (copia) de manera cíclica en una mezcla de reacción *in vitro*. Esto permite un aumento exponencial del segmento seleccionado de ADN, llegando a obtener millones de copias que por cantidad es posible visualizar aún cuando la secuencia que se busca se encuentre en concentraciones muy bajas (Saiki, 1988). Existen muchas variantes de PCR como lo son : el PCR "nested", "hot start" PCR, "Touch down" PCR, PCR inverso, AP-PCR ó RAPD, RT-PCR, RACE, DD-PCR, PCR múltiple, PCR cuantitativo, PCR *in situ* y PCR asimétrico (Leyva y Martínez, 2001).

2.8.1.1 Componentes de la PCR

La mezcla de reacción se compone de los siguientes elementos: agua bidestilada estéril, buffer, sales que en una reacción estándar se encuentran entre 0.5 y 2.5 mM, Mgcl una concentración errónea de este puede nulificar la reacción, desoxirribonucleótidos trifosfatos o dNTP's (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) se encuentran entre 20 y 200 uM , sin embargo concentraciones altas diminuyen la especificidad de la reacción. Iniciadores la concentración puede estar en un rango de 0.05-1.0 uM. El ADN necesario varía de 0.5 – 1.0ug. y la ADN polimerasa se agrega de 1-2.5 U de la enzima por cada reacción de 100 ul (Aguilar, 2000). Debido a que las concentraciones son muy variables, para cada organismo en particular se tienen que evaluar diferentes concentraciones hasta estandarizar las más óptimas para una reacción determinada (Martínez, 2000).

El buffer o amortiguador

El buffer estándar para PCR contiene 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3) y 1.5 mM de $MgCl_2$. (Sambrook *et al.*, 1989).

Iniciadores, cebadores o primers

Los iniciadores son fragmentos de ADN sintéticos con un número pequeño de pares de bases complementarios a una región de ADN. Los iniciadores alinean a diferente distancia en pares de bases uno del otro en el ADN molde, dependiendo del organismo son de 18 – 30 nucleótidos de longitud. Para utilizarlos en una reacción se encuentran en solución y se agrega la misma cantidad de cada uno de ellos (Henson y French, 1993).

Los iniciadores a utilizar para detección de *X. fastidiosa* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa son RST31 y RST33. Estos iniciadores detectan todas las cepas de la bacteria amplificando un fragmento de 730 pb, la digestión de este producto con la enzima RsaI se utiliza para diferenciar los grupos de PD y PPD (Minisavage *et al.*, 1994). Además de CVC1 y 272-2int reportados por Pooler y Hartung (1995), quienes mencionan que los dichos iniciadores detectan mediante un fragmento de 600 pb solamente la cepa de CVC que causa la clorosis variegada en cítricos.

Nombre	Iniciador	Tamaño en bp
RST31	5´-GCGTTAATTTTCGAAGTGATTCGATTGC-3´	28
RST33	5´-CACCATTCGTATCCCGGTG-3´	19
CVC1	5´-AGATGAAAACAATCATGCAAA-3´,	21
272-2-int	5´-GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT-3´.	21

Los iniciadores a utilizar para detección de *R. solanacearum* r3 por Reacción en Cadena de la Polimerasa son T3A y T5A. Estos iniciadores detectan las 3 razas de la bacteria y amplifica un fragmento de 100pb para la raza 3 (Seal *et al.*, 1992)

T3A	5´-GGGGGTTCGAATTCCCGCCGCCCCA-3´	25
T5A	5´-AGTCCGGTGCTCTAACCAACTGAG-3´	24

Los dNTPs

Los desoxinucleósidos trifosfatados (dNTPs) son usados a concentraciones de 100 a 200 μM cada uno, estos se deben mezclar en una relación 1:1:1:1 dATP, dGTP, dCTP y dTTP para obtener una solución de igual concentración, se mantienen almacenados como los demás componentes de la reacción a una temperatura de – 20° C. (Sambrook *et al.*, 1989).

El ADN blanco

El ADN contenido en la secuencia blanco puede ser agregado al PCR en forma de cadena sencilla o doble. En el caso del ADN circular cerrado, la amplificación es menos eficiente comparado con el ADN lineal, aunque se han reportado concentraciones mínimas de hasta fentogramos. (Leal-Klevezas *et al.*, citado por Martínez, 2000).

Para ser utilizado en la reacción el ADN debe ser de calidad, esto es, encontrarse libre de contaminantes como tejido, proteínas, restos celulares u otras moléculas y no estar degradado, puesto que esto influye en la eficiencia de la reacción, generalmente las características anteriores dependen del método de extracción y la asepsia. La cantidad de ADN necesario varía de 0.5 – 1.0 ug.

Ciclos y temperaturas

La técnica también llamada reacción de polimerización en cadena en una mezcla de reacción consta de tres pasos básicos: el primero es una desnaturalización, que sirve para separar el molde doble de ADN a cadenas sencillas mediante temperatura alta (94°C). El segundo paso es el de alineamiento (pareamiento), donde los iniciadores se alinean con sus secuencias complementarias en el segmento de ADN blanco (la temperatura de alineamiento varia dependiendo de la longitud y bases nitrogenadas de la molécula iniciadora, esta varía de 25°C a 65° C). El tercer paso es la elongación (extensión), donde la ADN polimerasa Taq comienza a incorporar los dNTP's a partir del extremo 3' de los iniciadores pareados para formar una cadena nueva de ADN. Este ciclo se repite de 25 a más veces en un aparato llamado termociclador (Valadez y Kahal, 2000).

Un ciclo térmico consta de la desnaturalización, alineamiento y extensión, cada uno de estos pasos por cierto tiempo a una temperatura específica. Esta temperatura depende del de las características de los iniciadores a utilizar, el número de bases y la proporción de cada una de ellas en el iniciador principalmente, que influyen más sobre la temperatura de alineamiento. Por lo antes mencionado es muy importante al estandarizar una reacción de PCR para un organismo en particular optimizar estas temperaturas (Martínez,2000). De acuerdo a Minisavage *et al.*, (1994) para la amplificación de *X. fastidiosa* es necesario temperaturas de 95:55:72°C, por 30:30:45 segundos en 40 ciclos. *R. solanacerum* r3 se amplifica con temperaturas de 94:48:72 por 10:15:60 segundos en 35 ciclos (Seal, *et al.*,1992)

La visualización del fragmento amplificado se realiza después de someter el producto de la reacción a una electroforésis en gel y de la tinción respectiva con bromuro de etidio; los fragmentos de ADN sintetizados se observan en un transiluminador de luz ultravioleta en forma de luminiscencia. La PCR es una técnica altamente sensible, debido a esto la contaminación es uno de los mayores problemas en el desarrollo de la misma. Es primordial cuidar que la muestra a amplificar no contenga ADN

extraño o de otros organismos, que puede provocar que los resultados sean confusos, más aun dar falsos positivos. Para evitar contaminación es recomendable tomar alícuotas de los "stocks" de reactivos, desinfectar el área de trabajo con hipoclorito de sodio al 20% y usar material completamente estéril (Rodríguez, 2001)

2.8.1.2 Extracción de ADN

El ADN posee algunas diferencias con respecto al ARN, es una cadena doble, todos sus nucleótidos contienen desoxirribosa y ninguno de ellos presenta la base uracilo, sino que en lugar de este presenta timina (Smith, 1998). En la célula los ácidos nucleicos (ADN y ARN) no se encuentran en forma libre sino asociados con complejos núcleoproteicos. Estos complejos a su vez pueden encontrarse en diversos compartimentos celulares como el núcleo, el cloroplasto o el citoplasma (Ramírez y Aguilar, 2001). Por lo anterior es necesario todo un procedimiento que permite ir separando y desechando los diferentes componentes celulares hasta obtener el ADN puro.

Una importante propiedad de la PCR, principalmente en el diagnóstico es la capacidad para amplificar una secuencia blanco a partir de una preparación cruda de ADN, es decir ADN extraído con un método estándar de extracción sin recurrir a un protocolo sofisticado de purificación (Valadez, y Kahal, 2000).

En algunas bacterias fitopatógenas es posible aislar la bacteria del hospedante para reducir la cantidad de compuestos contaminantes. Para la extracción de ADN bacteriano existen varios procedimientos diferentes. En general estos métodos siguen algunos principios básicos como el uso de una solución de lísis para romper las paredes celulares y las membranas, con el fin de liberar el ADN, seguida del uso de surfactantes o agentes desnaturalizantes para la solubilización y dispersión de otras moléculas, la separación o precipitación del ADN y finalmente el lavado con etanol. Los método más utilizados para la extracción de ADN de fitopatógenos son

Dellaporta (minipreparación), Doyle y Doyle (CTAB) y varios métodos proporcionados por diferentes casas comerciales. Sin embargo Lodhi *et al.*, (1994), mencionan que la vid es una especie que presenta gran cantidad de polifenoles y polisacáridos que pueden dificultar el diagnóstico por técnicas moleculares.

2.8.1.3 Inhibidores

Koonjul *et al.*, (1999) mencionan que la adición de Polyvinylpyrrolidona (PVP) directamente en el tubo de reacción de PCR al preparar la mezcla produce la neutralización de los efectos inhibitorios de los compuestos polifenolicos sobre la amplificación del ARN. De acuerdo Moreira (1998), el uso de agarosa de bajo punto de fusión (LMP), mezclada con ADN y tratada con TE, elimina polisacáridos y contaminantes en la amplificación de ácidos nucleicos. Existen también métodos comerciales de purificación que eliminan los contaminantes del ADN.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas utilizadas.

Para los diferentes ensayos se utilizaron las cepas de referencia XF01y RSR3 del Laboratorio de Fitobacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria; además de tejido de vid infectado con *Xylella fastidiosa* colectado en el Valle de Guadalupe Baja California Norte.

3.2 Medios de cultivo utilizados.

Se evaluaron tres medios específicos para *X. fastidiosa*, inoculando 10 cajas Petri de cada medio por el método de estría cruzada. Las cajas se colocaron en bloques una sobre otra en la incubadora a 28° C por 30 días. Las cajas se revisaron diariamente para observar la formación de colonias. Los medios evaluados fueron XF-26, PW suplementado y CS20 (Anexo 7.1). Para el crecimiento y cultivo de *Ralstonia solanacearum* r3 se utilizó el medio selectivo TTC (Anexo 7.2) y se mantuvo a la misma temperatura.

3.3 Serología DAS-ELISA.

La primer prueba de detección se llevó a cabo con DAS- ELISA, lo que permitió comprobar la presencia de *X. fastidiosa* en el tejido de vid y confirmar la identidad de las bacterias en sus respectivos cultivos.

a) Sensibilización o cobertura de la placa.

Se adicionó en los pozos previamente seleccionados de una placa de microtitulación, de acuerdo al mapa de distribución de muestras, el anticuerpo (gammaglobulina) específico para *X. fastidiosa* y *R solanacearum* r3 . Para esto, se diluyó el anticuerpo en solución amortiguadora de cobertura (Anexo 7.3.2), en una relación de 1:200, adicionando 100 µL de la dilución por celda de la placa con excepción de los pozos blanco, utilizando una micropipeta y puntas estériles. Se colocaron las muestras por duplicado, así como el blanco y los controles positivo y negativo (como se muestra en el mapa del Anexo 7.3.1).

b) Incubación

La placa se cubrió con una tapa y se incubó por 4 horas a temperatura ambiente.

c) Lavado.

Con el fin de eliminar el anticuerpo no adherido a la placa, esta se colocó en la lavadora automática especial TECAN®, que contenía la solución amortiguadora PBST (Anexo 7.3.3). Los pozos de la placa se llenaron automáticamente por la lavadora, una vez llenos se vació el contenido de la placa sacudiendo fuertemente, y se secó golpeando sobre papel secante hasta eliminar todo resto de solución de lavado. Esta operación se repitió ocho veces.

d) Adición de la muestra

En un tubo Eppendorf se preparó una suspensión bacteriana de $1x10^6$ UFC/mL con 200 µL de amortiguador de extracción y colonias de *X. fastidiosa* ó *R. solanacearum* r3 según el caso, todo bajo condiciones de asepsia. Posteriormente la suspensión se agitó con vortex por un minuto antes de agregar a la placa. Para *X. fastidiosa* se

utilizó el amortiguador de extracción para vid (Anexo 7.3.4) y para *R solanacearum* amortiguador general de extracción (Anexo 7.3.5)

El control positivo (bacteria liofilizada) proporcionado por la casa comercial se preparó diluyendo éste en amortiguador de extracción de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se preparó también otro control positivo diluido al 50% con respecto a la concentración inicial. El control negativo utilizado fue planta sana o amortiguador. De cada uno de estos controles se adicionaron también 100 µL por pozo.

Las muestras de tejido enfermo se desinfectaron externamente, después se pesaron de 0.5 a 1.0 g del tejido vegetal que se colocaron en bolsas de plástico con 10X10 cm; enseguida se agregó el amortiguador de extracción correspondiente en una proporción de 1:10 (peso:volumen) y se maceró con el pistilo de un mortero. De la parte acuosa, se tomaron 100 µL para cada pozo de la muestra y 100 µL para la repetición correspondiente, cambiando de punta estéril en cada adición.

e) Incubación

Nuevamente la placa se cubrió con la tapa y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

f) Lavado

Se lavó por segunda vez, para eliminar el antígeno que no se adhirió al anticuerpo primario. De acuerdo al procedimiento descrito anteriormente .

g) Adición del conjugado (anticuerpo - enzima)

El conjugado que se utilizó para detectar *X. fastidiosa* es el anticuerpo marcado con la enzima peroxidasa, incluido en el "kit" comercializado por la compañía **agdia®** . Este conjugado se preparó diluyéndolo en una proporción 1:200 en el componente

MRS. Dicho componente se diluyó previamente en amortiguador PBST en una proporción 1:4, considerando 100 µL por cada pozo utilizado de la placa con excepción de los blancos. Para el caso de *R. solanacearum* r3, el conjugado estuvo compuesto por el anticuerpo más la enzima fosfatasa alcalina, el procedimiento fue el mismo, pero la dilución se llevó a cabo en amortiguador de conjugado (Anexo 7.3.6).

h) Incubación

La placa se cubrió con la tapa y se incubó de la misma manera anteriormente descrita.

i) Lavado

Se lavó ocho veces para eliminar los restos de conjugado enzimático que no se pegaron al antígeno. El lavado se realizó repitiendo el procedimiento anteriormente descrito.

j) Revelado (adición del sustrato)

Para el revelado de las placas con muestras de *X. fastidiosa* se procedió de la siguiente manera: en un recipiente pequeño se preparó una dilución del OPD amortiguador en agua, en una proporción 1:10. Se agregó un trozo de 1 cm^2 (una pieza se utiliza para 10 mL de dilución) de papel indicador sumergiéndolo por 2 minutos en la dilución anterior, el cual contiene el sustrato. La cantidad de sustrato se prepara considerando 100 µL por pozo de la placa incluyendo los blancos. La placa se cubrió con la tapa y se colocó en oscuridad por 20 minutos. Cuando se observó la reacción de color naranja, la placa de microtitulación se llevó al lector automático **Biorad®** Modelo 3550 para tener una apreciación numérica de los resultados. Para este caso se considera una absorbancia de 490 nanómetros con referencia de 495 en el lector.

En el caso de *R. solanacearum* r3, se adicionó el sustrato de fosfatasa alcalina preparado, diluyendo el P-nitrofenil fosfato (Sigma, N2765) en SOLAM (Anexo 7.3.7) de sustrato en una relación de 1 mg/1 mL.. Se agregaron 100 µL de esta solución en cada pozo de la placa, seguido de una incubación de 20 a 30 minutos en oscuridad y en cámara húmeda a temperatura ambiente, antes de observar la reacción. Después de este tiempo se observó una reacción de color verde claro y se llevó al lector automático considerando una absorbancia de 405 nanómetros con referencia de 415 para el programa del lector automático.

3.4 Métodos de extracción de ADN de bacteria a partir de tejido infectado.

Con la finalidad de extraer ADN de bacteria con suficiente calidad para ser usado en la PCR se evaluaron varios métodos de extracción que se describen a continuación.

3.4.1 Métodos comerciales.

3.4.1.1 Plant DNA-Zol.

- De pecíolos de vid infectados con *X. fastidiosa* (confirmado mediante DAS-ELISA) se pulverizaron 0.1 g. El tejido infectado se congeló previamente en el mortero a –70° C en un ultracongelador.

- El tejido pulverizado se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 0.3 mL de Plant DNA- Zol y se mezcló por inversión.

- El tubo se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

- Se agregaron 0.3 mL de cloroformo, para luego agitar vigorosamente.

- Nuevamente se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y en agitación.

- Luego se centrifugó a 12000 g por 10 minutos.
- El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio.
- El ADN se precipitó con 0.250 mL de etanol absoluto.
- Enseguida se mezcló por inversión de 6 a 8 veces.
- Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- El tubo se colocó en la centrifuga **Eppendorf**® Modelo 5415D por 5 minutos a 5000g y luego se decantó.
- La pastilla formada en el fondo del tubo se lavó con Plant DNA Zol –etanol absoluto (1: 0.75).
- Utilizando vortex se mezcló 0.3 mL de esta solución con la pastilla.
- Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 5000g por 4 minutos.
- La pastilla se lavó con etanol al 70% (500 µL) centrifugando a 5000g por 4 minutos.
- Se decantó el etanol y el ADN se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril.

3.4.1.2 Nucleo Spin Plant.

- Se pesaron 50 mg de tejido de pecíolos de vid infectados con *X. fastidiosa* (confirmado mediante DAS-ELISA), se congelaron en un mortero con pistilo a -70° C (en un ultra congelador) y se maceraron hasta pulverizar.

- El tejido pulverizado se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, adicionándole 300 µL de Amortiguador C1 y se mezcló.

- El tubo se dejó incubar por 30 minutos a 65° C de temperatura y se centrifugó 10 minutos a 10 000 g.

- El sobrenadante claro se transfirió a un tubo limpio, se agregaron 300 µL de amortiguador C4 más 200 µL de etanol absoluto y se mezcló con vortex por 30 segundos.

- La mezcla resultante se paso a un cartucho o columna colocado sobre un tubo sin tapa de 2 mL para centrifuga de Núcleo Spin Plant, se centrifugó por 60 segundos a 13 000 rpm para luego descartar el líquido que paso a través del cartucho.

- Como paso opcional para remover contaminantes se adicionaron 500 µL de amortiguador CW al la columna de NucleoSpin Plant, se centrifugó por 60 segundos a velocidad máxima y se descartó el liquido que fluyó a través del cartucho.

- Se agregaron 500 µL del amortiguador C5 al tubo de Núcleo Spin Plant, nuevamente se centrifugó por 60 segundos a 13 000 rpm y se descartó el fluido.

- El cartucho con tubo, sin agregar nada, se centrífugo por 60 segundos una velocidad de 13 000 rpm con el fin de eliminar restos del amortiguador C5.

- El cartucho de Núcleo Spin Plant se ajustó aun tubo estéril para microcentrífuga de 1.5 mL, se adicionaron 50 µL de amortiguador CE previamente calentado a 65° C para diluir el ADN que se encuentra atrapado en el cartucho. Por último se centrífugo el cartucho con tubo por 60 segundos a 13 000 rpm y del fluido resultante se recuperó el ADN.

3.4.2 Métodos no comerciales.

3.4.2.1 CTAB (Doyle y Doyle, 1990).

- Se maceraron 0.2 g de pecíolos de vid infectados con *X. fastidiosa* (confirmado mediante DAS- ELISA) con 1mL de amortiguador CTAB (1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris-HCL pH 8.0 y 2.0 g de CTAB por 100 mL de amortiguador).

- El macerado se vació en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se colocó en una estufa a 60 ° C durante 30 min, con agitación ocasional.

- Enseguida se aplicó un volumen de fenol-cloroformo (500g de fenol, 0.5 g 8-hidroxiquinoleina, 480 mL de cloroformo, 20 mL de alcohol isoamílico y 125 mL de Tris- HCL pH 7.4 aforado a 1000 mL con $H_2 0$ destilada) y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos.

- El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio. Se aplicó 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos (repitiendo el procedimiento).

- Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio. A continuación se aplicaron 0.8 volúmenes de isopropanol (almacenado con anterioridad a –20 ° C) y se dejó toda la noche a –20°C.

- Se centrifugó a 10-13 000 rpm durante 30 minutos y se decantó el isopropanol.

- Se agregó etanol al 70% (almacenado con anterioridad a –20 °C) y centrifugó a 8 000 rpm durante 10 minutos.

- Se decantó el etanol y se secó la pastilla en una estufa a 60° C (alrededor de 10 a 15 minutos). La pastilla seca se disolvió en 50 µL de amortiguador TE.

3.4.2.2 Dellaporta *et al.*, (1983)

Minipreparación

- Se pesaron de 0.2 a 0.3 g de tejido vegetal y se pulverizaron en un mortero estéril, para luego vaciar la muestra en tubos para microcentrífuga.

- A cada tubo se le adicionaron 500 µl de solución Dellaporta, 50 µL SDS 20% y 10 µL de β-mercapto-etanol, por cada tubo y se agitaron vigorosamente.

- La muestra se colocó durante 15 minutos a 65° C (en baño maría) y se adicionaron 200 µL de acetato de potasio 5 M, para luego mantenerla en hielo por 40 minutos.

- Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 13 000 rpm a 4° C (el peso de los tubos se equilibró con acetato de potasio).

- Se extrajo el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio, adicionando luego 600 µL de isopropanol frío.

- Para precipitar se dejó incubando a –20°C toda la noche.

- Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron 20 minutos a 13 000 rpm a 4° C, luego se decantó y dejó secar la pastilla.

- Se le adicionaron 650 µL agua desionizada estéril por tubo de microcentrífuga dejando que la pastilla se disolviera.

- Enseguida se adicionaron de 10 a 15 µL de RNAsa **GIBCO ®**, posteriormente se incubó a 37° C de 1 hora.

- Después de incubar se centrifugó por 5 minutos a 13 000 rpm y trasfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

- Se adicionaron 500 µL de fenol, se agitó por inversión y se centrifugó a 13 000 rpm a 4° C durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió un tubo limpio.

- El paso anterior se repitió para eliminar proteínas.

- Para eliminar el fenol se agregaron 650 µL de cloroformo, se centrifugó y transfirió la parte superior a un tubo limpio.

- Se repitió el paso anterior con 550 µL de cloroformo, centrifugando y transfiriendo la parte superior a un tubo limpio.

- Se adicionaron 75 µL de acetato de Na 3 M y 500 µL de isopropanol, manteniendo el tubo por 30 minutos a –20 °C.

- Después de centrifugar 10 minutos a 13 000 rpm a 4° C, la pastilla se lavó con 2 volúmenes de etanol al 70%, centrifugando por 5 minutos a 13 000 rpm a 4° C.

- El etanol se decantó y la pastilla de ADN se dejo secar, para resuspenderla en 30-40 µL de TE (EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM).

3.4.2.3 Método modificado de Minisavage *et al.*, (1994)

- Utilizando amortiguador SCPAP (Succinato de sodio 1.0 g, Citrato trisodico 1.0 g, K_2HPO_4 1.5g , $KHPO_4$ 1.0 g y 0.02 M de Ascorbato de sodio, se tomó un pecíolo de vid, previamente desinfectado externamente, se insertó en la punta de una jeringa, pasando el amortiguador a través de él para extraer las bacterias que se encuentran en el sistema vascular de la planta[1] (aproximadamente 400 μL^1).

- Utilizando este filtrado o en su defecto 0.2 g de tejido de pecíolo pulverizado en mortero enfriado a -70° C en ultracongelador, se agregó amortiguador de extracción y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, además de 5% de Polyvinylpolypyrrolidona (insoluble y tratada con ácido por el procedimiento de Holben *et al.*, 1988).

- Se adicionaron 400 µL de solución de lisis (TAE 1X, 0.75% de SDS , 0.15 mg de recién disuelta proteinasa K / mL y 2% de Triton X-100[1]).

- El tubo se incubó por 1.5 horas a 65° C en una estufa.

- Se adicionaron 100 de Na Cl 5M más 80 µL de CTAB- Na Cl (4.1 % de Na Cl + 10 % CTAB) precalentado a 65° C. Los tubos se mezclaron por inversión y se incubaron 10 minutos a 65° C.

- Después se aplicó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13 000 rpm[1] durante 20 minutos[1].

- Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio. A continuación se aplicó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).

- Se centrifugó a 13 000 rpm[1] durante 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Enseguida se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol frío y se dejó a –20° C toda la noche.

- Se centrifugó 20 minutos a 13 000 rpm[1] a temperatura ambiente, para luego decantar. Después se agregó etanol frío al 70% y se centrifugó a 8 000 rpm[1] durante 10 minutos.

- Se decantó el etanol y se secó la pastilla. Esta de disolvió en 50 µL de agua bidestilada estéril[1].

1 Modificado

3.5 Métodos de extracción de ADN de colonias bacterianas.

Para la extracción de ADN directamente de las colonias de *X fastidiosa* y *R. solanacearum* r3, se probaron los métodos Plant-DNA-zol y CTAB anteriormente descritos.

Antes de empezar el procedimiento para extraer el ADN de colonias bacterianas se adicionaron 300 µL de amortiguador de extracción en un tubo Eppendorf estéril en el cual se suspendió una asada de colonias de la bacteria. Los 300 µL de suspensión bacteriana se utilizaron en lugar del tejido pulverizado y los procedimientos de extracción continuaron como ya se han descrito anteriormente.

3.6 Estandarización de la reacción de PCR para *X. fastidiosa*.

Los diferentes componentes utilizados en la mezcla de reacción fueron de la casa **GIBCO BRL®**

3.6.1 Concentración de ADN.

Para estimar la cantidad óptima de ADN se utilizó ADN extraído por el método de Plant- DNA-zol directamente de cultivos de bacteria purificada. La concentración de ADN en solución acuosa se determinó por medio de un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda Bio. Se evaluaron las concentraciones de 79, 158, 316 y 474 ng de ADN por reacción (158 ng/µL) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estandarización de la concentración de ADN de *Xylella fastidiosa*.

Tubo	**Amortiguador**	**$MgCl_2$**	**dNTPs**	**Iniciadores picomoles**		**Enzima**	**ADN**
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	1.5	200	50	50	1.5	079
2	1X	1.5	200	50	50	1.5	158
3	1X	1.5	200	50	50	1.5	316
4	1X	1.5	200	50	50	1.5	474

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

3.6.2 Estandarización de la concentración optima de enzima.

Para realizar la estimación óptima requerida de enzima, ADN polimerasa Taq, se utilizaron 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 unidades de la misma por reacción, considerando la concentración comercial del producto de 5.0 U/µL. Las cantidades del resto de los reactivos permanecieron sin variación como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Mezclas de reacción para la estandarización óptima de la enzima ADN polimerasa *Taq* para *X. fastidiosa.*

Tubo	Amortiguador	$MgCl_2$	dNTPs	Iniciadores (picomoles)		Enzima	ADN
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	1.5	200	50	50	1.0	316
2	1X	1.5	200	50	50	1.5	316
3	1X	1.5	200	50	50	2.0	316
4	1X	1.5	200	50	50	2.5	316

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

3.6.3 Estandarización de la concentración de cloruro de magnesio.

Para estimar la cantidad óptima del cloruro de magnesio se evaluaron cuatro concentraciones del mismo 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM (Cuadro 4).

Cuadro 4. Mezclas para la estandarización de la concentración de $MgCl_2$ para *X. fastidiosa.*

Tubo	Amortiguador	Mg Cl_2	dNTPs	Iniciadores picomoles		Enzima	ADN
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	1.5	200	50	50	1.5	316
2	1X	2.0	200	50	50	1.5	316
3	1X	2.5	200	50	50	1.5	316
4	1X	3.0	200	50	50	1.5	316

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

3.6.4 Estandarización de la cantidad de dNTPs.

Para encontrar la mejor concentración de dNTPs, se utilizó una presentación comercial que contiene las cuatro bases en una concentración de 10 mM de cada una de ellas. Se probaron cuatro diferentes concentraciones 100 µM, 200 µM, 300 µM y 400 µM como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Estandarización de la concentración de dNTPs para *X. fastidiosa*

Tubo	Amortiguador	$MgCl_2$	dNTPs	Iniciadores picomoles		Enzima	ADN
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	1.5	100	50	50	1.5	316
2	1X	1.5	200	50	50	1.5	316
3	1X	1.5	300	50	50	1.5	316
4	1X	1.5	400	50	50	1.5	316

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

3.6.5 Estandarización de la concentración óptima de iniciadores.

La concentración inicial de los iniciadores específicos esta dada en cierto número de µg/µmole y/o nanomoles, por lo tanto se realizó una dilución de nanomoles a picomoles. Cada nanomol se diluye en 10 µl de agua. La solución quedó a 100 picomoles/µL. De ésta, se preparó una segunda dilución para tener una concentración de 25 picomoles/ µL. Para la optimización de la concentración de iniciadores se evaluaron 25, 37.5, 50 y 62.5 picomoles por reacción (Cuadro 6).

Cuadro 6. Mezclas de reacción para la estandarización de la cantidad de iniciadores para *X. fastidiosa*.

Tubo	Amortiguador	$MgCl_2$	dNTPs	Iniciadores picomoles		Enzima	ADN
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	1.5	200	25.0	25.0	1.5	316
2	1X	1.5	200	37.5	37.5	1.5	316
3	1X	1.5	200	50.0	50.0	1.5	316
4	1X	1.5	200	62.5	62.5	1.5	316

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

3.6.6 Evaluación de temperaturas para la amplificación de *X. fastidiosa.*

Se evaluaron diferentes temperaturas teniendo como base lo mencionado por Minisavage *et al.*, (1994), empezando con 95:48:72° C por 20:20:20 segundos. La temperatura de alineamiento se fue aumentando un grado por evaluación y los tiempos 10 segundos a cada fase del ciclo.

3.7 Estandarización de la reacción de PCR para *R. solanacearum* r3.

Todos los reactivos utilizados para la estandarización del PCR de *R. solanacerum* r3 fueron también de casa comercial **GIBCO BRL®** .

3.7.1 Concentraciones evaluadas

Para realizar la estandarización de la cantidad de ADN se utilizaron extracciones de bacteria por los métodos de Plant DNA-zol y CTAB. El ADN utilizado se cuantificó en el espectrofotómetro por el procedimiento ya descrito logrando una

lectura de 405 ng/ µL. Para realizar la estimación óptima de la concentración de los diferentes componentes de la mezcla se utilizaron cuatro tubos por evaluación. Para ADN se evaluaron 202, 405, 810 y 1215 ng (Cuadro 7). De enzima ADN Taq polimerasa 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 unidades (Cuadro 8). Se evaluaron 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM de Mg Cl_2 (Cuadro 9). dNTPs 100 µM, 150 µM, 200 µM y 250 µM (Cuadro10). Las concentraciones de iniciadores evaluadas fueron 12.5, 25, 37.5 y 50 picomoles (Cuadro 11). Las temperaturas se evaluaron de la misma manera que para *X. fastidiosa* antes descrita.

Cuadro 7. Estandarización de la concentración de ADN para *R. solanacearum* r3.

Tubo	**Amortiguador**	**Mg Cl_2**	**dNTPs**	**Iniciadores picomoles**		**Enzima**	**ADN**
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	2.0	200	25	25	2.5	202
2	1X	2.0	200	25	25	2.5	405
3	1X	2.0	200	25	25	2.5	810
4	1X	2.0	200	25	25	2.5	1215

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

Cuadro 8. Estandarización de la Taq polimerasa en *R. solanacearum* r3

Tubo	**Amortiguador**	**Mg Cl_2**	**dNTPs**	**Iniciadores picomoles**		**Enzima**	**ADN**
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	2.0	200	25	25	1.0	810
2	1X	2.0	200	25	25	1.5	810
3	1X	2.0	200	25	25	2.0	810
4	1X	2.0	200	25	25	2.5	810

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

Cuadro 9. Mezclas para la estandarización la concentración de Mg Cl_2 en *R. solanacearum* r3.

Tubo	Amortiguador	Mg Cl_2	dNTPs	Iniciadores picomoles		Enzima	ADN
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	1.0	200	25	25	2.5	810
2	1X	1.5	200	25	25	2.5	810
3	1X	2.0	200	25	25	2.5	810
4	1X	2.5	200	25	25	2.5	810

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

Cuadro 10.Estimación de la concentración de dNTPs para *R. solanacearum* r3

Tubo	Amortiguador	Mg Cl_2	dNTPs	Iniciadores picomoles		Enzima	ADN
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	2.0	100	25	25	2.5	810
2	1X	2.0	150	25	25	2.5	810
3	1X	2.0	200	25	25	2.5	810
4	1X	2.0	250	25	25	2.5	810

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

Cuadro 11. Cantidad de iniciadores para *R. solanacearum* r3.

Tubo	Amortiguador	$MgCl_2$	dNTPs	Iniciadores picomoles		Enzima	ADN
		mM	µM	RST31	RST33	U	ng
1	1X	2.0	200	12.5	12.5	2.5	810
2	1X	2.0	200	25.0	25.0	2.5	810
3	1X	2.0	200	37.5	37.5	2.5	810
4	1X	2.0	200	50.0	50.0	2.5	810

NOTA: La mezcla total por tubo de reacción fue de 50 µL y las cantidades indicadas corresponden a concentraciones finales en la reacción.

3.8 Electroforesis en geles de agarosa.

3.8.1 Visualización de la calidad del ADN.

El procedimiento para la realización de los geles de agarosa fue llevado a cabo con base en las recomendaciones de Maniatis et.al. (1989). Se prepararon geles de agarosa al 1%, pesando 0.333 g de agarosa (de acuerdo a la capacidad del portageles) esta cantidad se disolvió en 30 mL de amortiguador TAE 1X y se calentó a 95° C. Cuando la agarosa estuvo completamente transparente se dejó enfriar a 45° C y se le agregó bromuro de etidio, esta mezcla se vertió en un portageles, al cual previamente se le había colocado un peine de acrílico para formar los carriles.

Una vez solidificado el gel se retiró el peine y el portageles se colocó en la cámara de electroforesis, enseguida se agregó amortiguador TAE 1X hasta cubrir el gel. De cada muestra de ADN extraído por los diferentes métodos se tomaron 790 ng y se mezclaron con 3 µL de amortiguador de carga y esta mezcla se depositó en uno de los carriles del gel.

La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder (BIO-RAD Modelo 200/2.0) y se mantuvo a 60 voltios por 10 minutos y a 80 voltios por 30 minutos, se apagó la fuente de poder y el gel se retiró colocándolo en un transiluminador (Kodak ®.) de luz UV para visualizar la presencia de ADN.

3.8.2 Visualización de los productos de PCR.

Para observar la amplificación de fragmentos de ADN después de la PCR tanto en la estandarización de los diferentes componentes de la mezcla de reacción como en la mezcla final se prepararon geles de agarosa con el procedimiento anteriormente descrito pero a una concentración de 1.5 %.

Para estimar el peso molecular de los fragmentos se utilizó 1µg (1µL) de marcador de 100 pares de bases de la casa comercial **GIBCO BRL®** . Tomando 15 µL del tubo de reacción de PCR se mezclaron con 3 µL de amortiguador de carga. Esta mezcla se depositó en uno de los carriles del gel. La electroforesis se corrió 10 minutos a 60 voltios y 25 minutos a 80 voltios. El gel se observó en el transiluminador de luz UV y los fragmentos de ADN sintetizados se compararon con el marcador de peso molecular y finalmente se tomaron las fotografías.

3.9 Métodos para eliminar inhibidores de la reacción de PCR para *X. fastidiosa*.

La vid es una especie que presenta una gran cantidad de inhibidores de la PCR que los procedimientos de extracción de ADN no logran eliminar. Debido a lo anterior se evaluaron diferentes métodos para eliminar los inhibidores en la reacción de PCR para *X. fastidiosa*.

BIBLIOTECA CENTRAL U. A. CH.

3.9.1 Inmunocaptura

El procedimiento de inmunocaptura se llevó a cabo siguiendo los mismos pasos que para la prueba de ELISA hasta el paso c). Esto es, se sensibilizó la placa ocupando 3 pozos para la muestra y no se sensibilizaron celdas para controles. La placa de microtitulación se incubó y lavó de la manera ya descrita. La muestra se preparó de igual manera que para el procedimiento de ELISA preparando la cantidad suficiente de cada muestra para los 3 pozos.

La placa se lavó y secó. Inmediatamente después de esto se agregaron 15 µL por pozo de agua bidestilada estéril previamente calentada a 90° C en un tubo Eppendorf. Se puso la tapa a la placa de microtitulación y se colocó sobre un vaso de precipitado con agua caliente. Esta se dejó reposar por 10 minutos y se destapó para colectar con una micropipeta y puntilla estéril el agua de los pozos. El agua de cada muestra se colecto en un tubo Eppendorf de 0.5 mL (conteniendo el anticuerpo y posiblemente la bacteria). De esta agua se agregaron 2 µL la mezcla para la PCR. Estos tubos de reacción se llevaron al termociclador y se programó con las condiciones probadas para la amplificación de *X. fastidiosa*.

3.9.2 Utilización de diferentes concentraciones de PVP agregada directamente a la reacción de PCR.

De acuerdo a los antecedentes mencionados por Koonjul *et al.*, (1999), se decidió probar el efecto de la Polyvinylpyrrolidona (PVP) agregada directamente en el tubo de reacción de PCR, utilizando ADN extraído de pecíolos de vid infectados con *X. fastidiosa*.

Se evaluó el efecto de PVP con diferente peso molecular, tomando de una solución madre al 20% recientemente preparada, para lograr diferentes concentraciones finales de PVP en una reacción total de 50 µL.

Cuadro 12. Concentraciones de PVP probadas en la reacción de PCR.

P. M. PVP	Stock al 20 %	Concentración final %
10 000	1.25 µl	0.5 %
	2.50 µl	1.0
	3.75 µl	1.5
	5.00 µl	2.0
24-30 000	1.25 µl	0.5 %
	2.50 µl	1.0
	3.75 µl	1.5
	5.00 µl	2.0
40 000	1.25 µl	0.5 %
	2.50 µl	1.0
	3.75 µl	1.5
	5.00 µl	2.0

NOTA: La mezcla total de reacción por tubo fue de 50 µL

3.9.3 Purificación del ADN en bloques de agarosa.

Tomando como base la información de Moreira, (1998); para este procedimiento se utilizó agarosa a una concentración de 1.6 % en una mezcla de 1: 1 V/V con ADN en solución acuosa, extraída por diferentes métodos. Esta mezcla se calentó y luego solidificó enfriándola. Los pequeños bloques se colocaron en un matraz con capacidad de 20 mL, se agregó amortiguador TE y se colocó en agitación por 5 horas, pasadas las cuales se cortó una pequeña rebanada de un bloque (2.5 µL) para agregar a un tubo de reacción con la mezcla de PCR , sustituyendo al ADN y llevó al termociclador con el programa probado para *X. fastidiosa.*

3.9.4 Sistema de purificación de ADN Prep-A-Gene®

Este sistema se utilizó para purificar ADN de *X. fastidiosa* en solución. En un tubo estéril de 1.5 mL se agregaron 3 volúmenes (150 µL) de "amortiguador de purificación", 40 µL de ADN en solución y 10 µL Prep-A-Gene matrix, considerando estos dos últimos como base para calcular el volumen de amortiguador.

Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional, centrifugando después por 30 segundos a 10 000 rpm.

El sobrenadante se decantó, luego se resuspendió la pastilla en "amortiguador de purificación" 25 veces lo agregado de Prep-A-Gene matrix (250 µL). Luego se centrífugo por 30 segundos y decantó el sobrenadante.

La pastilla se lavó dos veces con "amortiguador de lavado 25X" (preparado agregándole 1 volumen de etanol absoluto antes de usarlo). Después se centrífugo para eliminar los restos de etanol.

Enseguida se diluyó la pastilla en 1-1.5 volumen (50 µL) de "amortiguador de dilución" y se incubó 10 minutos a 60° C y se centrífugo (eliminando los restos) a máxima velocidad y el sobrenadante con el ADN se pasó a un tubo limpio y se verificó que no quedaran rastros de Prep-A-Gene matrix.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Prueba de crecimiento en diferentes medios de cultivo.

De los diferentes medios específicos probados para *Xylella fastidiosa* como son XF-26, PW suplementado y CS20, solamente se observó crecimiento bacteriano en el medio PW suplementado, observándose el inicio de este crecimiento a partir de los 8 días después de la siembra y alcanzando mayor crecimiento después de los 15 días en incubadora a 28° C en el total de las cajas Petri. En los medios XF-26 y CS20 el crecimiento de *X. fastidiosa* fue nulo, solamente se desarrollaron bacterias contaminantes. Para el caso del medio XF-26, es posible que la falta de crecimiento se haya debido a que no se agregaron los aminoácidos Lisina y Serina.

Ralstonia solanacearum r3 mostró un abundante crecimiento tan solo un día después de la siembra en medio selectivo TTC sin ningún problema, manteniéndola a 28° C, aunque es posible que las colonias se desarrollen en cuestión de horas. Sin embargo para su aislamiento inicial se requiere de 72 horas de crecimiento.

4.2 Morfología colonial de *X. fastidiosa* y *R. solanacearum* r3

Las colonias de *Xylella fastidiosa* desarrolladas en el medio PW suplementado fueron de tamaño muy pequeño de 0.3 a 1.0 mm de diámetro, de forma redonda, convexas, de aspecto húmedo y mucoide de un color ligeramente crema, casi cristalino (lo más común), aunque se desarrollaron también colonias de color amarillo muy claro casi crema, como las reportan Donadio y Soares, (1997). Es muy posible que las colonias presenten características de acuerdo al medio de cultivo y a la cepa o grupo de la bacteria, esta observación fue debida a que la cepa utilizada de referencia tenía un origen diferente a la obtenida del tejido de vid infectado presente en las plantas analizadas.

La bacteria *Ralstonia solanacearum* r3 en el medio TTC desarrolló colonias de color blanco, redondas, de tamaño variable 0.5-3.0mm, convexas con un punto de color rosáceo en el ápice, este punto va adquiriendo un tono morado a medida que envejecen las colonias, estas se unen mostrando abundante crecimiento hasta cubrir el medio de cultivo, los cultivos viejos ya no presentan color blanco, sino que todo el crecimiento bacteriano es de color morado.

4.3 DAS ELISA.

El procedimiento de DAS ELISA tomó aproximadamente un día y medio, esta técnica fue muy eficiente en este trabajo para confirmar la identidad de *X. fastidiosa* y *R solanacearum* r3 en medio de cultivo y así poder reaislarlas posteriormente; así como, para confirmar la presencia de estas bacterias en tejido vegetal enfermo.

Es importante resaltar que para el caso de *X. Fastidiosa*, los análisis de DAS ELISA mostraron resultados positivos cuando las muestras de tejido se tomaron de pecíolos de planta infectada, mientras que al analizar muestras de tejido de hoja de la misma planta, la evaluación mostró valores negativos, confirmando la preferencia de la bacteria por tejido de conducción en la planta Guevara (2000).

4.4 Métodos de extracción de ADN de tejido vegetal.

De los dos métodos comerciales de extracción de ADN para *Xylella fastidiosa*, el que funcionó mejor fue Plant DNA-Zol, con el cual se logró obtener una buena cantidad y calidad de ADN; ya que mostró poca fragmentación en gel de agarosa al 1%. Por su parte, el ADN obtenido con el método de Nucleo Spin Plant no se logró observar visualmente.

En cuanto a los métodos no comerciales el que funcionó mejor fue el de CTAB, con el cual se logró obtener gran cantidad de ADN; sin embargo, con los métodos de Dellaporta y Minisavage no fue posible observar ADN en el gel. Aun cuando con algunos métodos se verificó la presencia de ADN, no se logró la amplificación respectiva en la reacción de PCR. Este resultado negativo pudo deberse a que en el ADN purificado contenía una mezcla de ADN de planta y posiblemente de bacteria, pero también pudo deberse a la presencia de inhibidores no eliminados con los métodos de purificación utilizados.

4.5 Extracción de ADN de colonias bacterianas.

Para la extracción directa de ADN a partir de colonias de *Xyllela fastidiosa* y *R. solanacearum* r3, los métodos CTAB y Plant-DNA-zol dieron buenos resultados, logrando suficiente cantidad y calidad del ADN obtenido; aunque con "Plant-DNA-zol" el ADN fue menos fragmentado.

4.6 Mezcla de reacción definitiva de PCR para *X. fastidiosa*.

Utilizando ADN bacteriano extraído con el método de Plant-DNA-zol directamente de colonias bacterianas de *X. fastidiosa*, se logró la estandarización de cada uno de los componentes de la PCR, las cuales se muestran en el cuadro 13. La amplificación obtenida fue de un fragmento de aproximadamente 733 pb (Figuras 9 y 10) con los iniciadores RST31: RST33, tal como lo reportan Minisavage *et al.*, (1994). Cabe resaltar que este resultado no concuerda con lo reportado por Pooler y Hartung (1995), quienes mencionan que con los iniciadores CVC1 y 272-2int no se amplifica la cepa CD que causa la enfermedad de Pierce; ya que solo reconocen la cepa de CVC de *X. fastidiosa* que causa la clorosis variegada en cítricos dando lugar a un fragmento de 600pb. Sin embargo, en el presente trabajo sí se logro la amplificación del fragmento de 733pb en la cepa PD de vid con dichos iniciadores.

El programa de ciclaje que logró resultados positivos fue: 5 minutos a 95° C para desnaturalización inicial, seguido de 10 ciclos [95° C, 40 s; 50° C, 40 s; 72° C, 60 s], además de 30 ciclos de [95° C, 40 s; 55° C, 40 s; 72° C, 60 s], con una extensión final de 7 minutos a 72° C.

Cuadro 13. Mezcla de reacción definitiva para la PCR de *X. fastidiosa*

Reactivo	Concentración final	Concentración del stock
Buffer	1X	10 X
Mg Cl_2	2.5 mM	50 mM
Mezcla de dNTPs	200 µM	10 mM
Primer RST31	50 pmoles	25 pmol / µL
Primer RST33	50 pmoles	25 pmol / µL
Taq polimerasa	1.25 U	5 U / µL
ADN	320 ng	-
H_2 0 bidest. estéril	-	-

NOTA: La mezcla de reacción final fue de 50 µL

En la Figura 9, carril 2, se muestra la amplificación un fragmento de 733 pb utilizando el ADN extraído con el método CTAB; mientras que en las reacciones en donde fue adicionada la PVP en las diferentes concentraciones y pesos moleculares mencionados, no mostraron amplificación alguna. En la Figura 10, carriles 2 y 3, se muestran los productos de amplificación de ADN *X. fastidiosa* obtenido con el método de Plant DNA-Zol. Nótese que en la Figura 9, además del producto de 733 pb se observa otro producto de mayor peso molecular, que pudiera indicar inespecificidad de la reacción, posiblemente originado por el método de extracción utilizado; mientras que el la Figura 10 no se aprecia dicho producto.

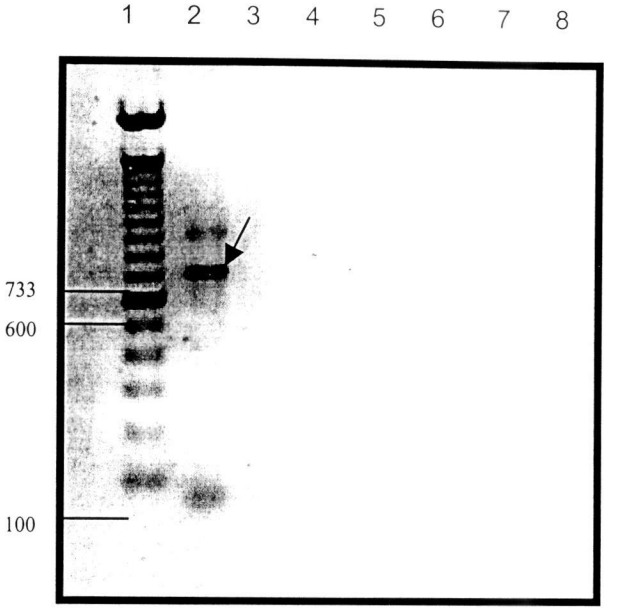

Figura 9. Amplificación de ADN de *X. fastidiosa* obtenido con el método CTAB con los iniciadores RST31:RST33. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb; Carril 2: producto de 733 pb; carriles 3 a 8: amplificaciones con 0.5 y 1.0 % de PVP adicionadas a la reacción de PCR de 10 000, 24 000 y 40 000 PM con resultados negativos.

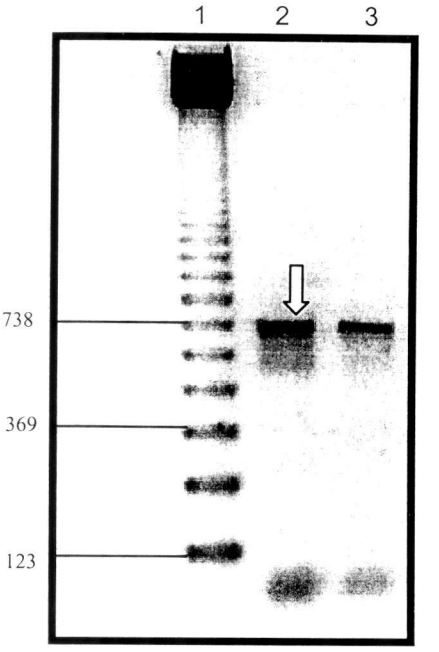

Figura 10. Amplificación de *X. fastidiosa* con el método Plant DNA-zol y los iniciadores RST31:RST33. Carril 1: marcador de peso molecular de 123 pb. Carriles 1 a 3: ADN de Xylella fastidiosa obtenido con Plant DNA-Zol.

En la Figura 11. Carriles 3, 4 y 8, se muestra la amplificación de un fragmento de alrededor de 700 pb con los iniciadores CVC1 y 272-2int, cabe resaltar que este resultado no concuerda con lo reportado por Pooler y Hartung (1995), quienes mencionan que con los iniciadores no se amplifica la cepa CD que causa la enfermedad de Pierce; ya que solo reconocen la cepa de CVC de *X. fastidiosa* que causa la clorosis variegada en cítricos dando lugar a un fragmento de 600pb. Sin embargo, en el presente trabajo sí se logro la amplificación del fragmento de 733pb en la cepa PD de vid con dichos iniciadores.

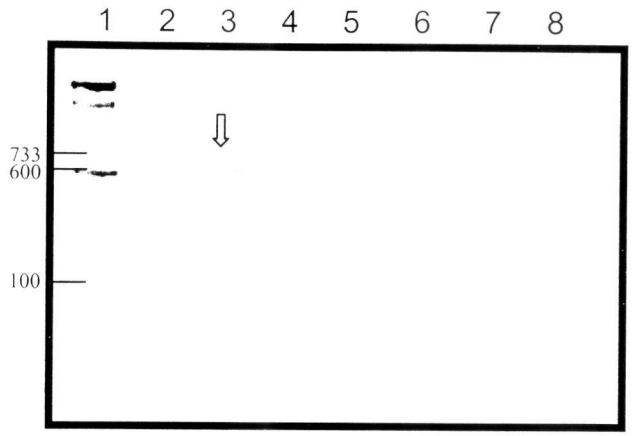

Fig. 11. Amplificación de *X. fastidiosa* en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: marcador de peso molecular 100pb; carril 2: control negativo sin ADN; carriles 3,4 y 8: fragmentos amplificados de 733 pb en la cepa PD de *X. fastidiosa* con iniciadores CVC1 y 272-2int específicos para la cepa que causa CVC en cítricos. Carriles 5 y 6 PCR utilizando ADN purificado en bloques de agarosa. Carril 7 PCR utilizando ADN purificado por Prep-A-Gene®

4.7 Calidad y concentración del ADN.

La calidad del ADN extraído por los diferentes métodos se visualizó claramente por electroforesis en un geles de agarosa al 1%. El ADN utilizado para *X. fastidiosa* se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda Bio® por el procedimiento ya descrito, logrando una lectura de 158 ng/µl. El ADN utilizado para *R. solanacearum* r3 se cuantificó en el espectrofotómetro por el procedimiento ya descrito logrando una lectura de 405 ng/ µl.

4.8 Visualización de los productos de PCR.

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se visualizaron con éxito en geles de agarosa a una concentración de 1.5 %, con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases como referencia.

4.9 Métodos para eliminar inhibidores de la PCR para *X. fastidiosa*.

El procedimiento de inmunocaptura que normalmente es eficiente en la amplificación de bacterias difíciles de identificar, en este caso no tuvo éxito al tratar de eliminar los inhibidores de la reacción. Esto puede ser debido a que la estructura de la bacteria es compleja, ya que no permite liberar fácilmente el ADN debido a la presencia de tres paredes celulares que la rodean (Donadio y Soares, 1997).

Ninguna de las cuatro diferentes concentraciones de PVP de las tres presentaciones de peso molecular agregada directamente en el tubo de reacción de PCR neutralizó los efectos inhibitorios de los diferentes compuestos contaminantes en el ADN extraído de tejido de vid infectado por *X. Fastidiosa* (Fig.11). El uso de cantidades mínimas de ADN embebido en agarosa al 1.6 %, pretratada con TE no logró eliminar los polisacáridos y contaminantes, puesto que simplemente se no se logró la amplificación del fragmento típico para *X. fastidiosa.* La utilización del sistema de purificación comercial de ADN Prep-A-Gene® para purificar ADN previamente extraído y en solución acuosa, no mostró resultados positivos en la amplificación.

4.10 Mezcla de reacción final de PCR para *R. solanacearum* r3.

La estimación óptima de la concentración de los diferentes componentes de la mezcla para *R. solanacearum* r3, se logró utilizando ADN extraído de bacteria, con las concentraciones de cada uno de los reactivos que lograron mejores resultados las cuales se muestran en el cuadro 14. La programación de temperaturas que lograron amplificar fue 3 minutos a 94° C para desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos [94° C, 30 s; 56° C, 30 s; 72° C, 60 s], con una extensión final de 8 minutos a 72° C. El fragmento amplificado fue de aproximadamente 100 pb (Fig.12), como se ha reportado para la raza 3 de esta bacteria utilizando los iniciadores T3A y T5A (Seal *et al.*, 1992).

Cuadro 14. Mezcla de reacción definitiva para *R. solanacearum* r3.

Reactivo	Concentración final	Concentración del stock
Buffer	1X	10 X
Mg Cl_2	2.0 mM	50 mM
Mezcla de dNTPs	200 µM	10 mM
Primer T3A	25 pmoles	25 pmol / µl
Primer T5A	25 pmoles	25 pmol / µl
Taq polimerasa	2.5 U	5 U / µl
ADN	8	-
H_2 0 bidest. estéril	-	-

NOTA: La mezcla de reacción final fue de 50 µL

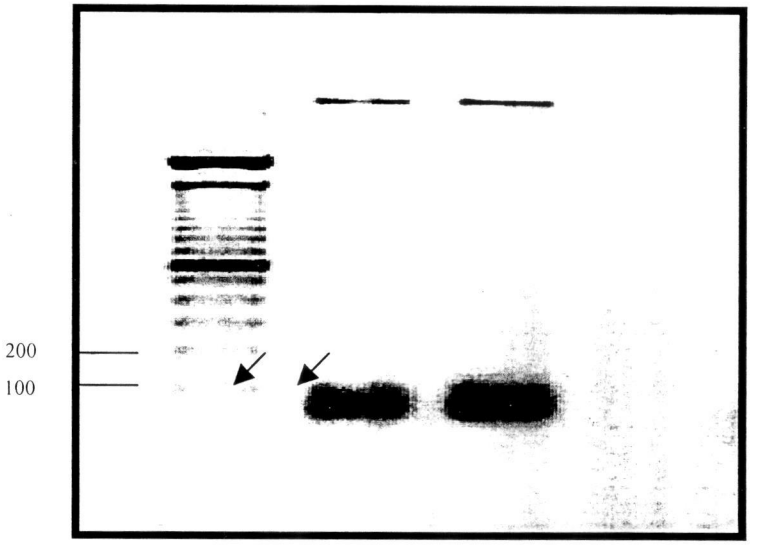

Figura 12. Productos de amplificación de ADN de *Ralstonia solanacearum* r3 obtenido con Plant DNA-Zol. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb; carriles 2 y 3 productos amplificados de 100pb. Carril 4: control negativo.

5. CONCLUSIONES

En las diferentes evaluaciones realizadas en la presente investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El cultivo *in vitro* de *Xylella fastidiosa* en medio nutritivo PW suplementado fue posible después de 7 días.

2. El cultivo de *Ralstonia solanacerum* r3 no presenta ningún problema para su desarrollo *in vitro* en medio TTC.

3. La técnica de DAS ELISA detectó sin problema a *Xylella fastidiosa* a partir de tallos, pecíolos o nervaduras gruesas de tejido infectado; sin embargo, el resultado es negativo cuando se utiliza tejido foliar con nervaduras secundarias para preparar la muestra.

4. La técnica de DAS ELISA también resultó ser de gran utilidad en la detección de *Ralstonia solanacerum* r3 directamente de tubérculo, que es el órgano que comúnmente se importa como semilla.

5. Ningún método de extracción de ADN de *Xylella fastidiosa* a partir de tejido infectado mostró resultados positivos en su detección con PCR, posiblemente por la presencia de inhibidores presentes en el ADN aislado.

6. Los métodos de extracción de ADN de Plant DNA-zol y CTAB resultaron eficientes en la detección con PCR de *Xylella fastidiosa* y *Ralstonia solanacerum* r3.

7. Los procedimientos utilizados para eliminar inhibidores del ADN de *Xylella fastidiosa* no mostraron resultados satisfactorios.

8. La tecnología de PCR mostró ser una herramienta eficiente y rápida para detectar o confirmar la presencia de *Xylella fastidiosa* y *Ralstonia solanacerum* r3.

9. Se demostró la funcionalidad de los iniciadores CVC1 y 272-2int en la detección de *Xylella fastidiosa* cepa PD mediante el producto amplificado de 733 pb, después de la estandarización de las condiciones de PCR realizadas en este trabajo.

6. LITERATURA CITADA

Aguilar, R. J., 2000. Biología Molecular. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. SAGAR. México D. F. pp 1-5.

Anónimo, 2002. The Pierce´s disease. http://www.cnr.berkeley.edu/xylella /page.html

Berisha, B., Chen Y. D., Zhang G. Y., Xu B. Y. and Chen T. A. 1998. Isolation of Peirce´s disease bacteria from grapevines in Europe. Academic Publishers. Netherlands. European Journal of Plant Pathology. 104: 427-433.

Brown J. C. 1995. What is the PCR. http://larcon.cc.ukans.edu/

Castaños C. M. 1993. Horticultura. Manejo simplificado. Universidad autónoma Chapingo. Dirección General de Patronato Universitario 527p.

Chang C. J. and Donalson, R. C. 1993. *Xylella fastidiosa:* cultivation in chemically defined médium. Phytopathology. 83:192-194.

CIP 1985. Principales enfermedades, nematodos , Insectos y ácaros de la papa. Centro Internacional de la Papa. Lima Perú. 43 p.

Cheng, et al., 2000. Long PCR Reagent guide lines. http.//twod.med.harvard.edu/auge/estep/protocol.num

Costa H. S., Blua M. S., Bethke J. A. and Redak R. A. 2000. Transmisión of *Xylella fastidiosa* to olander by the glassywinged sharpshooter, *Homolodisca coagualata*. Hort Science. 35 (7): 1265-1267.

Cruz F. M. 1997. ELISA. Guía Ilustrada de la prueba de inmunoadsorción de enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. SAGAR. 22p.

Dellaporta S. L., Wood J. and Hiccks J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology. Rep. 1:12-21.

DGSV. 1995. Norma Mexicana de Fitosanidad. Direccion General de Sanidad Vegetal (007y 012). SAGARPA.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. Focus. 12:13-15.

Donadio, L. C. y Soares, M. C. 1997. Clorose Variegada dos Citros. Edicião Conmemorativa do 15° Aniversario da Estacicão Experimental de Citricultura de Bebedouro. FUNDECITRUS. Bebedouro, Brasil. 162p.

Dumbar, E. 2002. *Grphocephala atropunctata* . http://www.bugpeople.org/taxa/homoptera/Cicadellidae

Fahy P. C. and Persley G. J. 1983. Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide. Academic Press. London. 160 p.

Ferraro, O. R. 1983. Viticultura moderna. Editoria Hemisferio Sur. Uruguay. pp 753-754.

Fry, S. M., Milholland R. D. and Huang P. Y. 1990. Isolation and growth of strains of *Xylella fastidiosa* from infected grapevines on nutrient agar media. Plant Disease. 74:522-524.

French, E. R. 1985. Interaction between strains of *Ralstonia solanacearum* its hosts and the environment. Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific.13:94-104.

French, E. R., Gutarra L., Aley P. and Elphinstone J. 1995. Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. Lima . Fitopatología 30(3):126-130.

Gabor, B. And Wiebe, W. 1997. Tomato Diseases. A practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. Seminis. Vegetable Seeds.

Gaxiola L. S. 1978. Estudios sobre la marchitez de la papa causada por la bacteria *Pseudomoanas solanacearum* E. F Smith en el Valle del Fuerte Sinaloa. Parasitología Agrícola. Instituto tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey. 56p.

Guevara, L. J., 2000. La enfermedad de Pierce en el cultivo de la vid en la costa de Ensenada B. C. Folleto Técnico No 20. SAGAR. INIFAP. CACOEN. Baja California, México. 24p.

Goheen, A. C. 1973. Association of a rickettsialike organism with Pierce´s disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. Phytopathology. 63 (3):341-345.

Goodwin, P. and Purcell, A. H. 1992. Pierce´s disease. In: Grape Pest Management. 2nd Edition. Oakland, USA: University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. pp 76-84.

Hartung, S. J., Beretta J., Brlansky H. R., Spisso J. and Lee F. R. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and serological

relationships with other strains of *Xylella fastidiosa* . Phytopathology. 84: 591-597.

Hellman, E. 2002. Viticulture. http://www.agriculture.viticulture/varieties/2FHHorticulture

Henson, J. M. y French, R. 1993. The polimerasa chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathology. 3: 81-109.

Hernández G. L. y Ochoa, C. F. 1994. Diagnóstico de *Xylella fastidiosa* en la vid y malezas asociadas con el cultivo. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 33: 7-10.

Hill B. L., and Purcell, A. H. 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. Phytopathology. 87: 1197-1201.

Holben E. W., Jansson K. J., Chelm K. B. and Tiedje M. J. 1988. DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. Applied and Enviromental Microbiology. 54(3):703-711.

Hopkins D. L. and Mortensen, J. A. 1971. Suppression of Pierce´s disease symptoms by tetracycline antibiotics. Plant Disease. 55:610-612.

Hooker W. J. 1981. Compendium of Potato Diseases. American Phytopathological Society. 125 p.

Jiménez, D. F. y Madero T. E. 2001. Importancia de la vid en México. Situación actual del agente causal de la enfermedad de Pierce *Xylella fastidiosa* en vid de México. Memorias del Simposium Internacional, SAGARPA.. INIFAP. CNRF-DGSV. CESVBC. México. 24p.

Koonjul P. K., Brandt F. W., Farrant M. J. and Lindsey G. G. 1999. Inclusion of Polyvinylpyrrolidone in the polimerasa chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. Nucleic Acids Research. 27(3):915-916.

Lin J. J., Kuo J. and Ma J. 1996. A PCR- based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. Nucleic Acids Research. 24(18): 3649-3650.

Leu, H. H. 1998. Development and application of monoclonal antibodies against *Xylella fastidiosa* the causal bacterium of pear leaf scorch. Journal of Phytopathology. 146: 31-37.

Leyva, L. N. E. y Martínez S. J. P. 2001. Manual de procedimientos. Curso Fitopatología Molecular. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. CINVESTAV- DGSV. México D. F. p 7.

Lodhi, A. M., Ye G. N., Weeden F. N. and Reisch I. B. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevines cultivars. Plant Molecular Biology Reporter. 12 (1):6-13.

Lopes, S. A., Ribeiro D. M. and Franca S. C. 2000. *Nicotiana tabacum* as an experimental host for the study of plant-*Xylella fastidiosa* interactions. Plant Disease. 84:827-830.

Maniatis T. E., Fritsch F., and J. Sambrook. 1989. "Molecular cloning, A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N. Y. Vol. 1. p. 6.

Martínez, S. J. P. 2000. Perspectivas de la biología molecular para el diagnóstico fitosanitario en México y diseño de primers para PCR. Identificación e

patógenos de importancia cuarentenaria mediante técnicas moleculares. CINVESTAV. IPN. México. pp 1-10.

Mejía S. D., Gutiérrez R. J. M. y López N. J. 2000. Enfermedad de Pierce. Ficha Técnica DF-03. SAGAR. Dirección General de Sanidad Vegetal. Méx. D. F. 3 p.

Mejía, S. D. 2001. Bacterias cuarentenarias. Taller de Plagas y enfermedades de importancia cuarentenaria. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología y Entomología. SAGARPA. CNRF. DGSV. Querétaro. Méx. pp 16-33.

Mejía, S. D. y López, N. J. 2001. Manejo Integrado de la vid. Situación actual del agente causal de la enfermedad de Pierce *Xylella fastidiosa* en vid de México. Memorias del Simposium Internacional, SAGARPA.. INIFAP. CNRF-DGSV. CESVBC. México. 24p.

Minisavage, G. V., Thompson C.M., Hopkins D. L., Leite R. M. and Stall R. E. 1994. Development of a polimerasa chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. Phytopathology. 84: 456-461.

Moreira., D. 1998. Efficent removal of PCR inhibitors using agarose-embeddes DNA preparations. Nucleic Acids Reserch.26:13:3309-3310.

Pedroza S. A. 1995. Epidemiología agrícola. Principios y aplicaciones. Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. México. p 3.

Pooler R. M. and y Hartung S. J. 1995. Specific PCR Detection and Identification of *Xylella fastidiosa* Strains Causing Citrus Variegated Chlorosis. Current Microbiology 31:377-381.

Purcell A. H. 1981. Vector preference and inoculation efficiency as components of resistance to Pierce´s disease in European grape cultivars. Phytopathology. 71 (4):429-435.

Purcell A. H. 1977. Cold therapy of resistance to Pierce´s disease of grapevines. Plant Disease Reporter. 61 (6):514-518.

Purcell A. H. and Hopkins D. L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology. 34:131-151.

Ramírez R. V. R. y Aguilar R. J. 2001. Manual de procedimientos . Curso Fitopatología Molecular. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. CINVESTAV- DGSV. México D. F. p 11.

Robacker, C. D. and Chang, C. J. 1992. Shoot-tip culture of Muscadine grape to eliminate Pierce´s disease bacteria. Hort Science. 27(5):449-450.

Rodríguez, M. M. L. 2001. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Segunda Edición. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo Estado de México. 119p.

Roncal O. M. S. 1990. Efecto de dos especies de *Bacillus*_y ajo sobre *Pseudomonas solanacearum*. Fitopatologia. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 38 p.

Saiki, R. K. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of the DNA with thermostable DNA polymerase. Science. 239: 487-491.

Sambrook, J. *et al. 1989. Molécular cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring, N. Y. USA..

Seal E. S., Jackson A.L. and Daniels J. M. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgrups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerasa chain reaction amplificación. Applied and Envairomental Microbiology. 58: 3759-3761.

Seege, D. C. 1993. Bacterial plant pathology: cell and molecular aspects. Department of cell and structural biology. University of Manchester. Cambridge University Press. Great Britain. p 172.

Schaad, N. W., Jons J. B. and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. Bacteriology Committe of the American Phythopathological Society. APS Press. St Paul Minnesota. U. E. pp 151-156.

Smith, C. A. y Wood, E. J. 1998. Biología molecular y biotecnología. Addison-Wesley Iberoamericana, S. A.. Delaware, E.U.A. pp 247.

Thies, L. K. and Graves, C. H. 1992. Meristem micropropagatión protocols for *Vitis rotundifolia* Michx. Hort Science. 27(5):447-449.

Turner, W, F. and Pollard, H. N. 1959. Insect transmission of phony peach disease. United States Departamet of Agriculture Technical Bulletin No 1193.

Valadez, M. E. y Kahal, G. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Editorial Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. 147p.

Valadez, L. A. 1997. Producción de hortalizas. Editorial Limusa, S. A. de C. V. México D. F. 298p.

Yoldi, M. 1996. Dos perfiles de la producción frutícola en Sonora: la uva para mesa y la uva pasa. Caridades Agropecuarias. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. Dirección General de Operaciones Financieras. No 37. pp 1-14.

Yoldi, M. 1998. La papa en México un cultivo con potencialidad. Caridades Agropecuarias. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. Dirección General de Operaciones Financieras. No 57. pp 1-15.

7. ANEXO

7.1 Medios de cultivo para *Xylella fastidiosa*

7.1.1 XF- 26

	(g /L H_2O destilada)
SALES	
K_2HPO_4	1.5
$(NH_4)_2HPO_4$	0.5
$MgSO_4$ 7 H_2O	2.0
ACIDOS TRICARBOXILICOS	
Citrato trisodico	1.5
Succinato disdico	1.5
AMINOÁCIDOS	
L - Arginina	0.4
L - Alanina	0.2
L - Asparagina	0.4
L – Cisteina	0.4
Glicina	0.2
L – Glutamina	2.0
L – Histidina	0.4
L – Isoleucina	0.2
L – Leucina	0.2
L - Lisina	0.2
L - Metionina	0.2
L - Fenilalanina	0.2
L - Prolina	0.2
L - Serina	0.2
L - Treonina	0.2
L - Triptofano	0.04
L - Valina	0.2
Rojo de fenol	0.02
Almidón de papa	0.2
Agar	15

7.1.2 PW (Suplementado)

	(g /L H_2O destilada)
Soytona	4.0
Tryptona	1.0
Hemin Chloride	10 mg
$MgSO_4$ 7 H_2O	0.4
K_2HPO_4	1.2
KH_2HPO_4	1.0
$(NH_4)_2HPO_4$	0.8
Rojo de fenol	20 mg
L- Glutamina	4.0
L- Histidina	1.0
Albumina de Suero de Bovino	6.0
Almidón de papa	2.0
Ciclohexamida	23 mg
Agar	12

7.1.3 CS20

	(g /L H_2O destilada)
Soytona	2.0
Tryptona	2.0
Hemin Chloride	5.0 mg
$MgSO_4$ 7 H_2O	0.4
$(NH_4)_2HPO_4$	0.85
K_2HPO_4	1.0
L- Glutamina	6.0
Dextrosa	1.0
Almidón de papa	2.0
L- Histidina	1.0
Rojo de fenol	10 mg
Agar	12

7.2 Medio selectivo TTC para *Ralstonia solanacearum* r3.

	(g /L H_2O destilada)
Casaminoacidos	1.0
Peptona	10.0
Glucosa	5.0
Agar	17.0
2,3,5- Trifenil cloruro de tetrazolio	5.0 ml
Esterilizar el medio y antes de vaciar agregar el cloruro de tetrazolio.	

7.3 DAS ELISA

7.3.1 Distribución de muestras en la placa de poliestireno.

MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B			*P			B		*P			
B												
C	[+]			*H			[+]		*H			
D												
E	+			*P			+		*P			
F												
G	-			*D			-		*D			
H												

B =Celda blanco, donde solo se agrega sustrato, [+] = Testigo positivo concentrado,
+= Testigo positivo diluido, - = Testigo negativo, * = Muestras.

7.3.2 Buffer de cobertura

	(g /L H_2O destilada)
Carbonato de sodio	1.59
Bicarbonato de sodio	2.93
Acida de sodio	0.20
Ajustar pH a 9.6, refrigerar a 4° C.	

7.3.3 Buffer de lavado PBST

	(g /L H_2O destilada)
Cloruro de sodio	8.00 g
Fosfato dibásico de sodio (anhídrido)	1.15 g
Fosfato monobásico de potasio	0.20 g
Cloruro de potasio	0.20 g
Tween – 20	0.50 g
Ajustar pH a 7,4.	

7.3.4 Buffer de extracción para vid

	(g /L H_2O destilada)
Tris	60.5
Cloruro de sodio	8.0
Polyvinilpyrrolidona (PVP) MO 24-40 000	20.0
Polietilen Glycol	10.0
Acida de sodio	00.2
Tween 20	0.5 ml
Ajustar el pH a 8.2 y mantener a 4° C.	

7.3.5 Buffer general de extracción

	g/L 1X PBST
Sulfato de Sodio	1.30
Polivinilpirrolidona	20.00 ml
Acida de Sodio	00.20
Albumina de pollo	2.00
Tween – 20	20.00 ml
Ajustar pH a 7,4. Mantener a 4° C.	

7.3.6 Buffer de conjugado (ECL).

	g/L 1X PBST
Albumina de Suero de Bovino	2.00
Polivinilpirrolidona (PVP) PM: 24-40,000	20.00
Acida de Sodio	00.20
Ajustar pH a 7,4. Conservar a 4° C.	

7.3.7 Buffer o Solución Reveladora (PNP)

	(g /L H_2O destilada)
Dietanolamina	2.00
Agua destilada	20.00 ml
Acida de Sodio	0.20
Ajustar pH a 9,8. Conservar a 4° C.	

7.4 Especies hospedantes para la cepa PD de *Xylella fastidiosa*

Nombre científico

Acacia longifolia
Acer macrophyllum
Acer negundo
Aesculus californica
Aesculus californica
*Aesculus californica**
*Agropyron sp.**
Alnus rhombifolia
Ampelopsis arborea
Amsinckia douglasiana
*Artemisia absinthium**
Artemisia douglasiana
Artemisia douglasiana
Artemisia douglasiana
Avena fatua
Avena fatua
Baccharis pilularis
Baccharis pilularis
Baccharis salicifolia
*Beta vulgaris**
Bidens pilosa var. *pilosa*
*Brassica rapa**
Bromus catharticus
Bromus rigidus
Bromus sp.
Callicarpa americana
Callistephus chinensis
*Calycanthus occidentalis**
*Calycanthus occidentalis**
Canna sp.
Chenopodium ambrosioides
Chenopodium ambrosioides
Citrus limon
Citrus reticulata
Citrus sinensis
Claytonia perfoliata
Conium maculatum
Coprosma baueri
Cotoneaster francheti
Cotoneaster rotundifolia
Cynodon dactylon
Cynodon dactylon
*Cynodon dactylon**
*Cyperus acuminatus**
Cyperus eragrostis
Cyperus esculentus
Cytisus scoparius
Daucus carota var. *sativa*
*Daucus carota**
Digitaria sanguinalis
Digitaria sanguinalis
*Distichlis spicata**
Duranta repens
Echinochloa crus-galli
Echinochloa crus-galli
*Elymus sp.**
Epilobium californicum
Epilobium paniculatum
Eragrostis diffusa
Erodium cicutarium
Escallonia montevidensis
*Eschscholzia californica**
Eugenia myrtifolia
Fragaria californica
Franseria acanthicarpa
Fraxinus dipetala
Fraxinus latifolia
*Fritillaria sp.**
Fuchsia magellanica
Genista monspessulana
Hedera helix
Hedera helix
*Hedera helix**
Helianthus sp.
*Heteromeles arbutifolia**
Heteromeles arbutifolia
Hordeum murinum
*Hordeum nodosum**
Hordeum vulgare
Hydrangea paniculata
Juglans californica
Lactuca serriola
*Lactuca serriola**
Lathyrus cicera
Lathyrus clymenium
Lathyrus sativa
Lolium multiflorum
Lolium temulentum
Lonicera japonica
Majorana hortensis
Malus sylvestris
Malva parvifolia
Matricaria suaveolens
Medicago hispida
Melilotus alba
Melilotus indica
Melilotus officinalis
Melilotus sp.
Melissa offcinalis
Mentha sp.
Mimulus aurantiacus
*Nasturtium officinale**
*Nerium oleander**
*Nerium oleander**
Oeanthe sarmetosa

Oenothera hookeri
Parthenocissus quinquefolia
Parthenocissus tricuspidata
Paspalum dilatatum
Pelargonium hortorum
Pennisetum clandestimun
Phalaris minor
Phalaris paradoxa
Philadelphus lewisii
Phleum pratense
Pittosporum crassifolium
Plantago lanceolata
*Plantago lanceolata**
Platanus occidentalis
Poa annua
*Poa pratensis**
Polygonum convolvulus
Polygonum persicaria
*Polygonum ramosissimum**
*Polypogon monspelensis**
Populus fremontii
*Populus sp.**
*Portulaca oleracea**
*Prunus armeniaca**
Prunus demissa
Prunus mume
Prunus sp.
*Pseudotsuga menziesii**
Pyracantha augustifolia
Quercus agrifolia
*Quercus domosa**
Quercus lobata
Reseda odorata
*Rhamnus californica**
Rheum rhaponticum
Rosa californica
Rosa californica
*Rosa californica**
Rosmarinus offcinalis
Rubus discolor
Rubus discolor
Rubus sp.
Rubus ursinus
Rubus ursinus
Rumex crispus
*Salix bebbiana**
Salix laevigata
Salix lasiolepis
*Salix sessilifolia**
Sambucus canadensis
*Sambucus mexicana**
Sambucus mexicana
Sambucus mexicana
Setaria lutescens
Sonchus asper
Sorghum halepense
*Sorghum halepense**
Sorghum vulgare
*Sorghum vulgare**
Symphoricarpos albus
Symphoricarpos albus
Syringa vulgaris
*Tatragonia expansa**
*Toxicodendron diversilobum**
Toxicodendron diversilobum
Toxicodendron diversilobum
Trifolium fragarium
Trifolium hybridum
Trifolium incarnatum
Trifolium pratense
Trifolium repens
Trifolium repens var. latum
Umbellularia californica
Uritca dioica ssp.gracilis
Urtica dioica ssp.gracilis
Veronica sp.
Vicia monathus
Vinca major
Vinca major
Vinca minor
Vitis californica
*Vitis californica**
Vitis rupestris
Vitis vinifera
Vulpia myuros var. hirsuta
Xanthium strumarium

IMPRENTA ANHER
IMPRESIONES & ENCUADERNACIONES
FRAY PEDRO DE GANTE No. 118-D
TEXCOCO, EDO. DE MEXICO