

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

✓
**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA EL
DIAGNÓSTICO SIN AISLAMIENTO DE FITOBACTERIAS EN ALCATRAZ
(*Zantedeschia aethiopica* Spreng) Y CRISANTEMO (*Chrysanthemum morifolium*
Ramat): ESPECIFICIDAD Y ERROR**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OPIONA DE EXAMENES PROFESIONALES

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL



**PRESENTA:
MARÍA MATEOS HERNÁNDEZ**

c1

CHAPINGO, MÉXICO. DICIEMBRE DE 1998.



B, b. 87961

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO SIN AISLAMIENTO DE FITOBACTERIAS EN ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* Spreng) Y CRISANTEMO (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) : ESPECIFICIDAD Y ERROR.

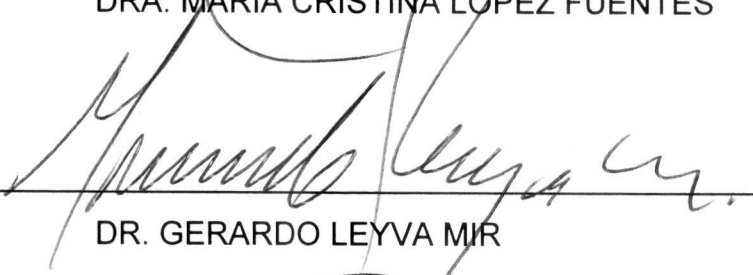
Tesis realizada por María Mateos Hernández bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: _____


DRA. MARÍA CRISTINA LÓPEZ FUENTES

ASESOR: _____


DR. GERARDO LEYVA MIR

ASESOR: _____


MC. JOSÉ LUIS AYALA ORDUÑO

33532

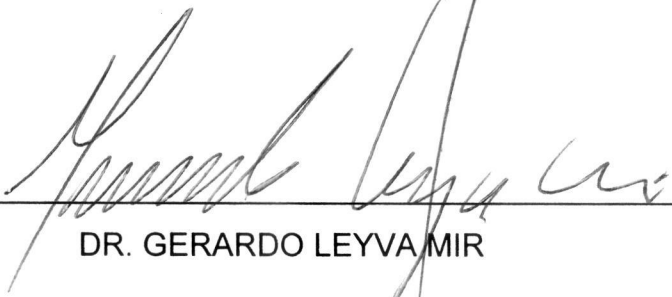
APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOFUORESCENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO SIN AISLAMIENTO DE FITOBACTERIAS EN ALCATRAZ (*Zantedeschia aethiopica* Spreng) Y CRISANTEMO (*Chrysanthemum morifolium* Ramat): ESPECIFICIDAD Y ERROR.

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de María Mateos Hernández autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE: _____


DRA. MARÍA CRISTINA LÓPEZ FUENTES

ASESOR: _____


DR. GERARDO LEYVA MIR

ASESOR: _____


MC. JOSÉ LUIS AYALA ORDUÑO

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

A la Doctora María Cristina López Fuentes por la acertada dirección para la realización de la presente investigación.

Al Doctor Gerardo Leyva Mir por las acertadas observaciones hechas al presente trabajo.

Al Maestro en Ciencias José Luis Ayala Orduño por las observaciones realizadas a la presente investigación y por la amistad brindada en el tiempo de conocernos.

A todos los profesores del departamento de Parasitología Agrícola porque de una manera u otra han influido en mí para llegar a formarme tanto profesional como personalmente.

Y finalmente, a todas aquellas personas que me han tenido la mano y que me es imposible nombrar a todas sin cometer la falta de olvidarme de alguien.

DEDICATORIA



*~ Dedico el presente trabajo a la memoria de mi mamá (q.e.p.d.) que
siempre confió en mí.*

*~ A mis hermanas Lupita y Susy que son lo mas preciado que tengo en la
vida.*

~ A mis sobrinos Cesar, Oscar, Karen y Danielito.

*~ A ti porque la vida se abre ante nosotros como un reto que debemos
afrontar con la seguridad del triunfo.*

CONTENIDO

	PÁG.
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
BIOGRAFÍA.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Importancia.....	3
2.2 Caracterización del patógeno que será el espécimen homólogo en el control de inmunofluorescencia utilizando pruebas bioquímicas o fisiológicas.....	4
2.3. Caracterización del patógeno usando métodos serológicos.....	5
2.4. Inmunofluorescencia.....	6
2.4.1. Inmunofluorescencia directa.....	7
2.4.2. Inmunofluorescencia indirecta.....	8
2.5. Variantes del método.....	9
2.5.1. Tinción de colonias inmunofluorescentes.....	9
2.5.2. Doble tinción.....	12
2.5.3. Fijación inmunoabsorbente.....	12
2.5.4. Filtros membranosos.....	13
2.5.5. Inmuno-oro y plata.....	14
2.6. Utilización de la técnica de inmunofluorescencia.....	14

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Obtención del material enfermo.....	26
3.2 Diagnóstico de las fitobacterias encontradas en plantas de alcatraz y crisantemo que formarían parte del cepario para posteriores pruebas de inmunofluorescencia.....	28
3.2.1 Observación en el microscopio.....	29
3.2.2 Obtención de los especímenes homólogos.....	30
3.2.2.1 Aislamiento de las bacterias.....	30
3.2.2.2 Purificación de las bacterias.....	30
3.3 Postulados de Koch.....	31
3.3.1 Pruebas de patogenicidad.....	31
3.3.2 Reacción de hipersensibilidad en tabaco.....	33
3.3.3 Pudrición en tubérculos de papa.....	33
3.4 Pruebas bioquímicas.....	34
3.5 Serología.....	35
3.5.1 Inmunización en el conejo.....	36
3.5.2 Obtención del antisuero.....	36
3.5.3 Purificación del antisuero.....	38
3.5.4 Preparación del fluorocromo conjugado.....	38
3.6 Inmunofluorescencia.....	40
3.7 Control para la tinción inmunofluorescente.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1 Prueba de hipersensibilidad en tabaco.....	42
4.2 Pruebas de patogenicidad.....	42
4.3 Pruebas bioquímicas.....	42
4.4 Producción del antisuero.....	43
4.5 Inmunofluorescencia.....	44
5. CONCLUSIONES.....	47
6. LITERATURA CITADA.....	49

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁG.
1	Algunas de las pruebas bioquímicas usadas para la detección e identificación de bacterias fitopatógenas.....5
2	Referencias seleccionadas en la aplicación de la técnica de inmunofluorescencia para la detección de bacterias fitopatógenas en semilla.....17
3	Pruebas bioquímicas para identificar los especímenes homólogos encontrados en plantas de alcatraz y crisantemo.....34
4	Horarios de inmunización para la producción de antisuero contra bacterias fitopatógenas.....37
5	Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la obtención de los especímenes homólogos aislados de plantas de alcatraz y crisantemo.....43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
1	Esquema de tinción de bacterias mediante inmunofluorescencia directa.....7
2	Representación esquemática del método de inmunofluorescencia indirecta.....8
3	Diagrama de tinción de colonias inmunofluorescentes.....11
4	Esquema de inmunofluorescencia inmunoabsorbente.....13
5	Inmunofluorescencia en secciones longitudinales de una hoja para observar un organismo parecido a micoplasma llamado Stolbur y que se presenta en Francia.....24
6	Micrografías inmunofluorescentes de control (A) y tratamiento con terbutol (B) en puntas de raíces de cebolla teñidas para microtúbulos con un anticuerpo monoclonal.....25
7	Sintomatología en plantas de alcatraz y crisantemo.....27
8	Determinantes multiespecíficos (epitopes) del antígeno y sitios de reacción monoespecífica del anticuerpo.....36
9	Estructura de la fluorosceína.....39
10	Inmunofluorescencia.....45

RESUMEN

Dada la creciente demanda en la rapidez y seguridad en el diagnóstico sin aislamiento de bacterias fitopatógenas que atacan a los cultivos altamente rentables, se realizó la presente investigación durante 1997-1998 en el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo con el objetivo de evaluar la técnica de inmunofluorescencia para la detección de bacterias fitopatógenas en plantas de alcatraz y crisantemo.

Para la obtención de sustancias inmunofluorescentes se aislaron a las bacterias problema de plantas infectadas procedentes de viveros de Xochimilco, México, que presentaban pudriciones en la base del tallo y se identificaron mediante pruebas bioquímicas. Posteriormente se inyectaron de manera intravenosa en un conejo soluciones de bacterias en solución salina para la producción del antisuero necesario. Una vez obtenido el antisuero monoclonal, al cuál se le agregó la sustancia fluorescente se confrontaron a las bacterias problema tomadas de tejido vegetal de alcatraz y crisantemo aparentemente sano con su respectivo antisuero. Se identificaron a las bacterias que causan la pudrición en alcatraz y crisantemo siendo *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* y *Erwinia chrysanthemi* respectivamente.

Los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia demostraron la factibilidad de realizar dicha técnica en México para la detección de bacterias fitopatógenas en plantas de alcatraz y crisantemo con una confiabilidad del 90

% en el diagnóstico en 10 minutos. Dicha técnica exceptúa a las bacterias que poseen pigmentos fluorescentes.

PALABRAS CLAVE: *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, inmunofluorescencia, diagnóstico, *Zantedeschia aethiopica*, *Chrysanthemum morifolium*

ABSTRACT

There is an urgent need to obtain a fast and reliable diagnostic method for identification of pathogenic bacteria without isolation from host plants specially on cash crops moving across borders. This work was done to evaluate an immunofluorescence technique on the bacteria *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* from infected alcatraz and chrysanthemum plants, respectively at Xochimilco, México. To obtain the antigen a salt solution of the bacterial colonies were used. This solution was injected into a rabbit to produce the antisera. Once the monoclonal antisera was obtained these, together with the fluorochromes, were applied to the plant tissues to show the presence of the bacteria to which the antisera were produced.

Results obtained indicate that immunofluorescence technique is reliable in identifying the two bacteria since a 90% identification was obtained in about 10 min. However, this technique cannot be used on naturally fluorescence bacteria.

KEY WORDS: *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, immunofluorescence, diagnostic, *Zantedeschia aethiopica*, *Chrysanthemum morifolium*

BIOGRAFÍA

María Mateos Hernández nació en Tepeapulco, Hidalgo, el 19 de enero de 1971. Cursó sus estudios de nivel medio superior y superior en la Universidad Autónoma Chapingo de 1986 a 1993 recibiendo el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia con la tesis “El cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en México”.

De agosto de 1993 a diciembre de 1995 prestó sus servicios profesionales en el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) en levantamientos topográficos con equipo GPS. De enero a diciembre de 1996 asesoró a grupos de productores de maíz y frijol en el estado de Querétaro.

De enero de 1997 a diciembre de 1998 realizó estudios de maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

1. INTRODUCCIÓN

La oportuna detección e identificación de bacterias fitopatógenas a través de técnicas rápidas como el uso de la inmunofluorescencia permitirá un mejor control de microorganismos dañinos que no están presentes aún en el país, o que no han sido registrados ya sea en una zona determinada o en un nuevo cultivo y que mediante fronteras o aduanas pudieran introducirse ocasionando epifitias. En estos casos se requiere de la implementación de técnicas de diagnóstico rápidas y confiables como es la técnica de inmunofluorescencia, donde se observan los resultados en algunos minutos, a diferencia de las técnicas tradicionales que requieren de aproximadamente dos a tres meses, o como algunas de las nuevas técnicas que son aún muy sofisticadas como para usarlas de manera rutinaria.

La técnica de inmunofluorescencia está basada principalmente en la tinción de anticuerpos con una sustancia fluorescente frecuentemente conocida como fluoresceína, que al tener especificidad con la bacteria para la cual se produjo el anticuerpo, se hace visible una reacción de fluorescencia, dando como resultado una fluorescencia en el cuerpo de la célula bacteriana, lo cual indica la especificidad. Esta prueba puede realizarse de manera directa en tejido aparentemente sano y sin recurrir al aislamiento. Es una prueba rápida en donde se obtiene el resultado en 10 minutos teniéndose un diagnóstico con una seguridad del 90%. La utilidad de ésta técnica se refleja en los informes donde los cultivos aparentaban estar libres de alguna afección bacteriana.

Generalmente al usar una técnica nueva en el diagnóstico se plantean preguntas sobre el grado de confiabilidad que la prueba otorga, ¿cuáles son sus errores y cuál es su especificidad?.

Para lo cual se propuso el siguiente **OBJETIVO:**

Realizar la técnica de la inmunofluorescencia en la detección e identificación de bacterias fitopatógenas en plantas de alcatraz y crisantemo que presentan una pudrición semejante a la que provocan algunas bacterias en éstas plantas; asimismo, dar a conocer la especificidad y el margen de error que la prueba conlleva.

HIPÓTESIS:

Podría ser factible la utilización de la técnica de inmunofluorescencia para el diagnóstico de bacterias fitopatógenas que parasitan el reino vegetal, como en éste caso en plantas de alcatraz y crisantemo sin realizar aislamiento.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia

La técnica de inmunofluorescencia se ha usado principalmente en los diagnósticos que no requieren de un aislamiento previo de la bacteria a detectar en situaciones específicas, tales como puertos y fronteras del país, donde se requiere un diagnóstico rápido.

El procedimiento de inmunofluorescencia indirecto (IF) fue desarrollado para ser usado por la Wyoming Crop Improvement Association y otras agencias de certificación para ayudar a eliminar *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en lotes de semillas de frijol con fines de certificación; sin embargo, pruebas postcosecha con la técnica de inmunofluorescencia indirecta en lotes de semillas representativas ofrecen un método rápido para una selección inicial de la semilla. Las muestras que pasan la inspección de campo y obtienen una reacción negativa con IF pueden ser elegibles para la certificación. Las muestras que pasan la inspección de campo pero que muestren un resultado positivo en IF pueden requerir además pruebas de patogenicidad, o particularmente, debido a niveles de sensibilidad realizar procedimientos de bacteriófagos antes del dictamen de certificación (Schuster, 1955; Saettler, 1971, Malin *et al.*, 1983).

Sin embargo, el método de inmunofluorescencia también ha tenido una amplia demanda en los procedimientos cuarentenarios para detectar la

presencia de bacterias fitopatógenas en plantas aparentemente sanas, y de esta forma evitar su paso a zonas libres de éstos microorganismos.

Baginska (1996) mencionó que una de las bases para los procedimientos cuarentenarios descritos para *Erwinia amylovora* es la implementación de métodos para estudiar y ejemplificar los organismos registrados como cuarentenarios; dentro de éstos se encuentra formando parte esencial de la metodología la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Este autor mencionó el mismo procedimiento cuarentenario para *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*.

2.2. Caracterización del patógeno que será el espécimen homólogo en el control de inmunofluorescencia utilizando pruebas bioquímicas o fisiológicas

Esta caracterización puede llevarse a cabo utilizando medios de cultivo. A continuación se describe un pequeño número de pruebas que son suficientes para decidir: a) si un cultivo bacteriano es sospechoso de ser fitopatógeno; b) cuál de los organismos aislados de la planta enferma necesita ser estudiada con mayor precisión.

Algunas pruebas son realizadas tales como la prueba de Gram, tinción de esporas, producción de pigmentos fluorescentes, producción de ácido de la glucosa, reducción de oxidasa y nitratos (Kovacs), siendo algunos ejemplos de pruebas bioquímicas. Las pruebas de caracterización se realizan de cultivos puros (tipos o razas) que provienen de cultivos de bacterias aisladas.

Las pruebas de caracterización deben efectuarse de cultivos nuevos y puros únicamente, y en términos comparativos deben ser cultivos de la misma edad (cultivos de 24-36 horas son ideales).

Cuadro 1. Algunas de las pruebas bioquímicas usadas para la detección e identificación de bacterias fitopatógenas para la obtención del espécimen homólogo (Duveiller *et al.*, 1997., López, 1994., López, 1997).

PRUEBA BIOQUÍMICA	UTILIZACIÓN
Hipersensibilidad en tabaco	Determinación de la patogenicidad de la bacteria
Tinción de Gram	Diferenciación de bacterias Gram positivas y Gram negativas
Pudrición de tubérculos de papa	Identificación de <i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Xanthomonas</i>
Fermentación oxidativa de la glucosa	Bacterias aeróbicas, anaeróbicas y/o facultativas
Producción de levana	Diferenciación del género <i>Pseudomonas</i>
Licuefacción de gelatina	Detección de enzimas proteolíticas
Producción de indol	Habilidad para desdoblar el triptofano
Hidrólisis de la esculina	Para <i>Xanthomonas campestris</i>
Fluorescencia	Diferenciar <i>Pseudomonas</i> fluorescentes de las no fluorescentes
Producción de oxidasa	Diferenciar <i>Pseudomonas syringae</i> y <i>fluorescens</i>
Dihidrolasa de arginina	Detección de <i>Pseudomonas fluorescens</i> grupo <i>fluorescens</i>
Reacción en leche de litmus	Capacidad de acidificación o alcalinización
Producción de catalasa	Diferenciación del biotipo virulento de <i>Pseudomonas solanacearum</i> del avirulento.
Reducción de nitratos a nitritos	Diferenciación del género <i>Xanthomonas</i>
Utilización de carbohidratos	Oxidación incompleta de carbohidratos

2.3. Caracterización del patógeno utilizando métodos serológicos

Aunque la serología es casi tan antigua como la fitopatología misma, en años recientes, ésta ha progresado significativamente con el desarrollo de anticuerpos monoclonales y técnicas en donde se utiliza el antisuero. Estas técnicas son poderosas herramientas específicas para identificar bacterias fitopatógenas, llevando a cabo estudios epidemiológicos y logrando un entendimiento de las interacciones entre la planta y el patógeno a través de la detección de compuestos producidos por la bacteria.

Los anticuerpos policlonales, los cuales son obtenidos fácilmente a través de la inmunización de un animal (generalmente conejos), contienen diferentes anticuerpos que reaccionan con epitopes en las células bacterianas. Los anticuerpos monoclonales o MABS son producidas por cultivo de células y fusión tecnológica en donde la célula fusionada produce un solo tipo de

anticuerpo. En contraste con el antisuero policlonal, los MABS tienen la ventaja de ser específicos a un solo epítopo y pueden seleccionarse para un uso o afinidad particular.

2.4. Inmunofluorescencia

Lelliott y Stead (1987) mencionan la elaboración de algunas técnicas para diagnósticos rápidos de bacterias fitopatógenas derivadas de aquéllas desarrolladas en el campo médico para patógenos humanos. En años recientes se han tenido grandes avances en las técnicas de diagnóstico de patógenos humanos que aún no se han usado de manera rutinaria para bacterias de plantas; aunque algunas y particularmente aquéllas basadas en enzimas unidas a inmunoabsorbencia (enzyme lynked immunosorbent assay o ELISA) y el microscopio electrónico inmunoabsorbente se han aceptado exitosamente en la patología de plantas.

Las técnicas de inmunofluorescencia (IF) o anticuerpos fluorescentes (FA) ofrecen probablemente la técnica de serodiagnóstico más exacta y útil para la bacteriología, donde la reacción puede ser visualizada bajo el microscopio donde los antígenos reaccionando son frecuentemente reconocidos. Ésto se basa en la habilidad de un componente fluorescente para unirse a un anticuerpo. Cuando este conjugado se une a la bacteria, la reacción puede observarse en un microscopio usando una fuente de luz ultravioleta con un adecuado filtro para el tinte fluorescente utilizado. Las células que se combinan con el antisuero se presentan con halo fluorescente alrededor de la pared celular (Lelliott y Stead, 1987).

Dentro de la producción de reactivos y método de prueba, necesarios para obtener una reacción específica con una fluorescencia tajante, la preparación de ambos anticuerpos debe usarse con un título cercano a la

bacteria que se va a utilizar. Estos valores serán inferidos como diluciones de trabajo. Este es el mejor camino para determinar los valores de cada antisuero usado. También es aconsejable usar bajas concentraciones de células bacterianas, aproximadamente 10^6 células/ml para evitar exceso de antígeno o si se prefiere probar contra un rango de concentraciones de células y después usarlo, ya que cuenta con el título más alto (Lelliott y Stead, 1987).

2.4.1. Inmunofluorescencia directa

En el método directo de inmunofluorescencia la bacteria reacciona con un anticuerpo adherido a un fluorocromo (generalmente fluoroceína o rodamina). El fluorocromo se observa bajo luz ultravioleta con un microscopio compuesto y aceite de inmersión; las células fluorescentes se observan de color verde en un fondo oscuro.

En el método directo, como Goto (1990) señaló, el antisuero es marcado con un colorante preparado por la inmunización en conejos con células bacterianas y el antisuero marcado se aplica directamente al antígeno como se representa en la Figura 1.

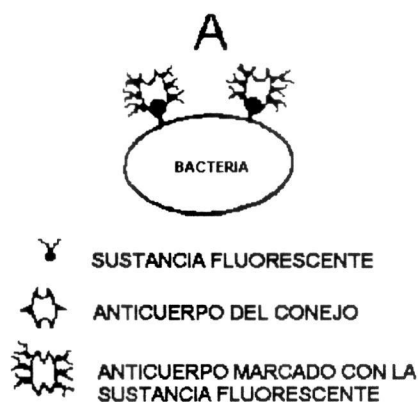


Figura 1. Esquema de tinción de bacterias mediante inmunofluorescencia directa. A: bacteria conjugada con el anticuerpo fluorescente (Goto, 1990).

2.4.2. Inmunofluorescencia indirecta

El método IF indirecto es frecuentemente más preferido sobre el método directo porque éste es más sensible y más específico. En el método indirecto la bacteria reacciona contra un primer anticuerpo, el cual reacciona con un segundo anticuerpo marcador fluorescente. La sensibilidad se incrementa debido a que varios anticuerpos pueden ser unidos a uno que reconozca el patógeno.

De Boer (1990) en la Figura 2 indica una representación del método indirecto de inmunofluorescencia en donde se involucra la fijación del ejemplar diluído correctamente en un portaobjetos, manejando la preparación con un anticuerpo específico para la bacteria de interés, y es entonces cuando se llevó a cabo la reacción del primer anticuerpo con un anticuerpo secundario, el cual se había teñido previamente con una sustancia fluorescente, generalmente fluorosceína. Entonces, se procedió a la observación en el microscopio equipado con filtros específicos para sustancias fluorescentes.

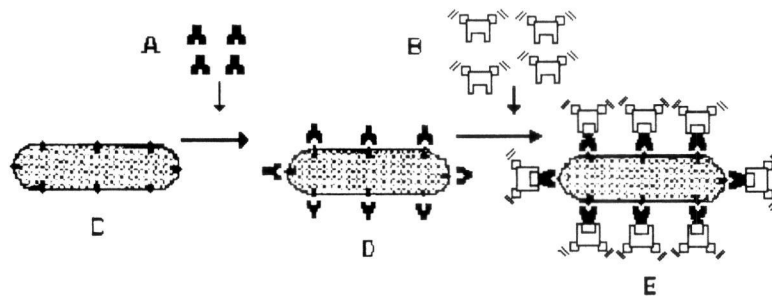


Figura 2. Representación esquemática del método de inmunofluorescencia indirecta. A: anticuerpos primarios. B: anticuerpos secundarios conjugados con un pigmento fluorescente. C: célula bacteriana fijada en un portaobjetos. D: célula bacteriana con anticuerpos primarios. E: anticuerpos secundarios conjugados con anticuerpos primarios en la célula bacteriana (De Boer, 1990).

La alta sensibilidad de la técnica del método indirecto IF tiene un límite de detección de 10^3 a 10^4 células/ml. Desde que la morfología de la célula pudo ser verificada, las reacciones positivas falsas debido a reacciones cruzadas se redujeron. Las principales limitaciones del método son la especificidad del antisuero, el pequeño volumen del ejemplar observado cuando el IF se usa en la detección cuantitativa del patógeno y el alto costo de un microscopio epifluorescente.

2.5. Variantes del método

El método de inmunofluorescencia para detección de bacterias también se ha usado ampliamente en la detección de otros organismos tales como hongos y algunos parecidos a micoplasmas. La inmunofluorescencia ha contribuido al descubrimiento de las interacciones entre organismos o entre moléculas complejas como en el caso de los herbicidas y su acción en las plantas. Por lo que el método se ha tenido que adaptar a las necesidades de los investigadores, dando como resultado un número considerable de variaciones del mismo.

2.5.1. Tinción de colonias inmunofluorescentes.

El principio en el cual se basa la tinción de colonias inmunofluorescentes (immunofluorescence colony o IFC) fue desarrollado para proveer sensibilidad a la detección y aislamiento, así como para combinar el aislamiento directamente con la identificación serológica de la colonia. El IFC facilita la fluorescencia de las colonias de la bacteria blanco para ser distinguidas de otros organismos en el agar con un microscopio con rayos ultravioleta (UV) a baja intensidad. Los resultados están disponibles después de uno a tres días y las preparaciones pueden ser interpretadas más fácilmente por técnicos que no tengan mucha experiencia en procedimientos de inmunofluorescencia. El aislamiento de

colonias inmunofluorescentes positivas puede realizarse para confirmar la identidad, pruebas de patogenicidad y colección de organismos con reacción cruzada para investigación de antisueros específicos (Van Vuurde, 1990).

Aunque también Van Vuurde *et al.* (1995) concibieron al método de tinción de colonias inmunofluorescentes como un concepto para la detección de bacterias en pruebas de calidad de materiales vegetales y en investigación ecológica, ya que este concepto que se ha desarrollado en la década pasada, brinda nuevas opciones para el estudio de la asociación bacteria-planta en los aspectos: detección *in situ* de bacterias que se encuentran formando unidades en la planta o en partes de la planta, tales como raíces o secciones de tallos; en el aislamiento selectivo de bacterias con reacción cruzada para investigación en el mejoramiento de la integridad de los sistemas de detección serológicos; en la distinción entre células cultivables y no cultivables; en la detección simultánea de diferentes bacterias blanco usando diferentes marcadores fluorescentes y un doble sistema de filtro de fluorocromo. Las colonias inmunofluorescentes positivas pueden ser identificadas directamente por aislamiento o PCR (Polymerase Chain Reaction), los cuales marcan esto fácilmente para reconocer falsos resultados positivos. Ellos concluyeron que el uso de la técnica de colonias inmunofluorescentes para aislamiento selectivo de bacterias con reacción cruzada es una herramienta indispensable para mejorar la especificidad del método mismo y de las demás pruebas serológicas.

Schober y Van Vuurde (1997) señalan la utilización de la tinción de colonias inmunofluorescentes (IFC) y una nueva técnica conocida como plateado en espiral para evaluar *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en achicoria. La bacteria blanco pudo detectarse a varias diluciones de lavado de la planta. La brillantez de las colonias teñidas de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* fue alto. El plateado en espiral tuvo un efecto positivo en la reducción del fondo comparado con la tinción de la bacteria. La combinación de

ambos métodos probó ser una herramienta funcional para la cuantificación de la bacteria blanco y no blanco y el aislamiento de la bacteria blanco como un cultivo puro de colonias IFC positivas. El método utilizó menos antisuero conjugado que el IFC tradicional y produjo resultados con mucha menos variación dentro de las bacterias reproducidas.

El procedimiento de tinción de colonias inmunofluorescentes se muestra en la Figura 3 descrito por Van Vuurde (1990) en donde se puede observar a detalle la metodología recomendada para tener óptimos resultados.

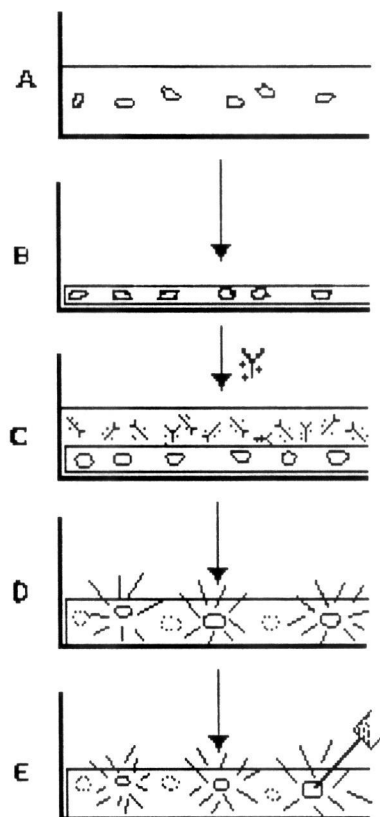


Figura 3. Diagrama de tinción de colonias inmunofluorescentes. A: crecimiento de colonias en agar. B: lavado del medio en agar con secado con aire caliente. C: incubación con anticuerpos conjugados con FITC. D: Observación con incidencia de luz azul a baja intensidad. E: Aislamiento de la bacteria de una colonia serológicamente positiva (Van Vuurde, 1990).

2.5.2. Doble tinción

La especificidad de la tinción inmunofluorescente puede ser probada por el teñido de dos anticuerpos diferentes que reaccionan con antígenos diferentes de la misma bacteria, permitiendo a las células individuales ser caracterizadas en base a dos antígenos que a uno solamente. Ésto es especialmente aplicable con dos anticuerpos monoclonales de especificidad conocida. Los dos anticuerpos son marcados con diferentes tintes fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina. La reacción de la bacteria con uno o ambos anticuerpos puede ser verificada mediante el microscopio con sus filtros apropiados (De Boer, 1990).

2.5.3. Fijación inmunoabsorbente

En la Figura 4 se representa el esquema para el procedimiento de inmunofluorescencia inmunoabsorbente propuesto por Klement *et al.* (1990). Esta variante incluye tanto al método directo como al método indirecto. Para ambos, primero es necesario poner una capa conteniendo los anticuerpos, seguido de incubación para permitir el inmunoatrape de la bacteria homóloga, después las partículas de los ejemplares que no fueron ligados son removidos mediante el lavado, ya que la fijación aseguró a la bacteria atrapada. Es entonces cuando se podrá realizar la tinción inmunofluorescente directa o indirecta.

Para incrementar selectivamente el número de células bacterianas en una preparación, los portaobjetos pueden ser cubiertos con una capa de antisuero para atrapar a la bacteria en el portaobjetos. La bacteria atrapada será subsecuentemente teñida mediante el procedimiento estándar. Los anticuerpos pueden ser fijados en el portaobjetos con etanol, fijador Kirkpatrick u otros fijadores utilizados para este fin (De Boer, 1990).

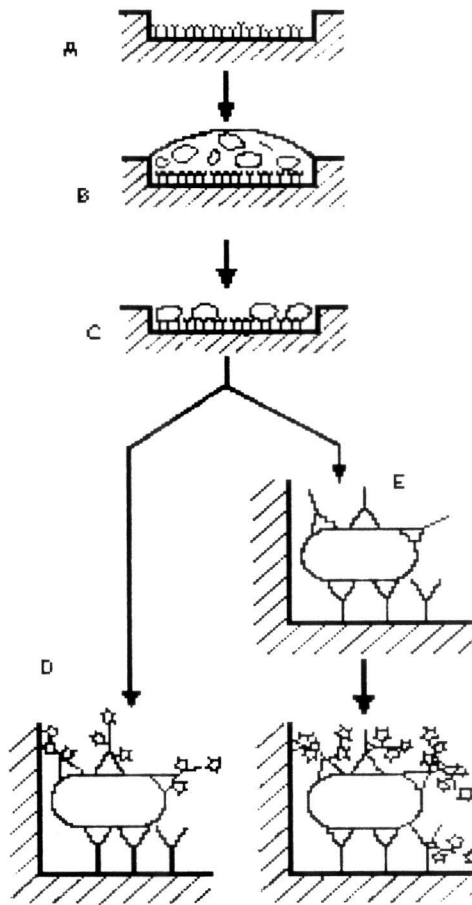


Figura 4. Esquema de inmunofluorescencia inmunoabsorbente. A: cubierta con anticuerpos. B: incubación del ejemplar. C: lavado del ejemplar. D: inmunofluorescencia directa. E: inmunofluorescencia indirecta (Klement *et al.*, 1990).

2.5.4. Filtros membranosos

Para detectar una bacteria fitopatógica en suspensiones diluídas, se puede depositar a la bacteria en membranas de policarbonato mediante filtración al vacío y teñirlas por inmunofluorescencia directamente en las membranas. Alternativamente, la bacteria puede ser teñida en la fase líquida previa a la deposición dentro de las membranas. La tinción en la fase líquida se hace simplemente suspendiendo la preparación en pastilla en el anticuerpo

diluido y después, la incubación removiendo el exceso de anticuerpo mediante centrifugación y resuspensión (De Boer, 1990).

2.5.5. Tinción de inmuno-oro y plata

Los anticuerpos son marcados con oro coloidal para que puedan ser usados. El procedimiento es el mismo que para inmunofluorescencia, excepto por el cambio en la preparación del anticuerpo secundario. Después de la tinción, las cuentas o gotas de oro requieren ser realizadas por el procedimiento de tinción en plata, en el cual el diámetro de las partículas de oro son incrementadas hasta 10 veces. La ventaja de esta opción es que las preparaciones pueden ser observadas con un microscopio de luz normal. La desventaja es que los reactivos son muy costosos (De Boer, 1990).

Knox *et al.* (1980) consignan la detección de anticuerpos a nivel de microscopio electrónico, teniendo como marcador secundario a un electrón opaco. El uso del oro coloidal tiene muchas ventajas en plantas superiores en inmunocitoquímica. Partículas de diferentes tamaños de oro coloidal son preparadas para llevar a cabo las nucleaciones de la partícula bajo diferentes condiciones de amortiguadores y de pH. Bajo estos protocolos, las partículas de 2 a 30 nm pueden ser producidas con relativamente pequeñas variaciones en tamaño. Luego, se acoplan a un anticuerpo secundario o una proteína A para formar un complejo que pueda detectar la localización del anticuerpo primario.

2.6. Utilización de la técnica de inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia ha contribuido en gran medida a la detección e identificación oportuna de aquellos microorganismo fitopatógenos como las bacterias sobre todo en semilla, evitando de esta forma infestaciones

y pérdidas. Sin olvidar, por supuesto, la detección de hongos, virus, nematodos que son perjudiciales para la producción de alimentos. E incluso en la detección de enfermedades en animales de interés zootécnico y del mismo hombre.

Van Vuurde *et al.* (1985) desarrollaron nuevas técnicas para proveer la sensibilidad y especificidad en los procedimientos de detección y aislamiento de bacterias en estudios epidemiológicos y de control de calidad. La dificultad en el control de bacterias patógenas hace desarrollar ensayos de rutina con propósitos cuarentenarios y de tolerancia, y para estudios de enfermedades bacterianas más importantes. Los métodos inmunológicos de detección han demostrado su mayor importancia para caracterización de virus, pero fueron incidentalmente exitosos en fitobacteriología. La inmunofluorescencia es un medio menos adecuado para un objetivo rutinario, pero tiene la ventaja que es altamente sensible (alrededor de 500 a 1000 por ml.) siendo de 10 a 100 veces más sensible que ELISA.

La inmunofluorescencia se ha usado exitosamente para la identificación y detección de numerosas bacterias fitopatógenas. Briansky *et al.* (1990) utilizaron dicha técnica para detectar el agente causal de la vena negra de las crucíferas, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que fue detectado e identificado exitosamente usando pruebas de inmunofluorescencia directa e indirecta.

Chittaranjan y De Boer (1997) señalan que se probó la especificidad de un nuevo anticuerpo monoclonal mediante pruebas de ELISA y de inmunofluorescencia para detectar *Xantomonas campestris* pv. *pelargonii* en geranios y en la solución nutritiva en el invernadero. Para probar la especificidad del anticuerpo monoclonal, también se sometieron a prueba otras bacterias como *X. campestris* con sus patovares, *Xanthomonas* spp. y 43 bacterias saprofíticas aisladas de *Pelargonium* sp. Ellos detectaron *X.*

campestris pv. *pelargonium* en plantas sintomáticas y asintomáticas. Los resultados obtenidos se confirmaron mediante PCR. En contraste con las pruebas realizadas en el tejido de la planta, se detectó a la bacteria en la solución nutritiva con mayor sensibilidad mediante inmunofluorescencia y PCR que por ELISA.

Fraaije *et al.* (1996) mencionan la comparación de algunos métodos para la detección de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en tubérculos derivados de tubérculos inoculados de *Solanum tuberosum* L. La sensibilidad de la PCR para la detección directa de *E. carotovora* subsp. *atroseptica* en extractos de cáscara cruda de papa fue de 10^7 - 10^8 células/ml, debido a que la PCR fue inhibida a causa de los componentes derivados del tubérculo. Con el método de dilución en placa y ELISA, fueron detectadas 10^5 y 10^7 células bacterianas por ml, respectivamente, mientras que mediante la técnica de tinción de colonias fluorescentes detectó 10^4 - 10^5 células/ml siendo la mas sensitiva técnica probada para detección directa de *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. La transmisión de esta bacteria fue detectada en seis cultivares de papa mientras que las otras técnicas no detectaron la transmisión.

Gorris *et al.* (1994) señalan la producción de siete anticuerpos monoclonales para detectar *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en tubérculos de papa con diferentes métodos serológicos, encontrando que uno de estos anticuerpos llamado 4G4 reaccionó con alta especificidad para el serogrupo I de *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, el serogrupo más común de tubérculos de papa. No se encontró reacción cruzada con otras fitobacterias o bacterias saprofíticas de los tubérculos. Únicamente una raza de *E. chrysanthemi* de la papa presentó reacción cruzada. Comparando los métodos serológicos usados, el de inmunofluorescencia indirecta detectó específicamente 240 células/ml de *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, aunque también ELISA-DAS pudo detectar eficientemente a la bacteria en tubérculos y

plantas infectadas. También Gorris *et al.* (1996) en un trabajo que realizaron para producir y caracterizar anticuerpos monoclonales para *Erwinia amylovora* probaron éstos en diferentes técnicas serológicas, tales como aglutinación ligada (SA), inmunofluorescencia indirecta (IF), ELISA convencional, ELISA-DAS, Western Blotting, seguido por ELISA y por último ELISA-inmunograbado. Los resultados mostraron una considerable homogeneidad serológica entre las diferentes razas probadas.

El empleo de la técnica de inmunofluorescencia también ha tenido utilidad práctica y es muy importante en la detección de bacterias desde la semilla de especies vegetales como tomate, pimiento y frijol, entre otras. En el Cuadro 2 se muestra un resumen de algunos de los investigadores que fueron pioneros en la aplicación de la técnica de inmunofluorescencia para la detección de bacterias fitopatógenas en semillas de diferentes especies vegetales, donde se puede observar que desde la década de los setentas el empleo de dicha técnica ya era muy importante en la investigación bacteriológica.

Cuadro 2. Referencias seleccionadas en la aplicación de la técnica de inmunofluorescencia para detección de bacterias fitopatógenas en semilla.

ESPECIES DE BACTERIAS	ESPECIES DE PLANTAS	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Clavibacter michiganensis</i>	tomate tomate	Akerman <i>et al.</i> (1973) Rat (1982)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	col	Schaad y Donalson (1980)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	frijol	Malin <i>et al.</i> (1983)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	tomate, pimiento	Cruz y Fernández (1976)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	frijol frijol	Coleno (1978) Trigalet y Bidaud (1978)

Malin *et al.* (1983) consignan la utilización del método de inmunofluorescencia indirecta para detectar e identificar *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en semillas infectadas de frijol, encontrando que la inmunofluorescencia es un procedimiento sensible para detectar e identificar bacterias fitopatógenas, ya que mediante inmunofluorescencia indirecta (IF) se detectó *X. campestris* pv. *phaseoli* a concentraciones bajas en semillas de frijol, mencionando además que el IF es rápido (28 horas) comparado con ensayos de doble difusión que consumen más tiempo (> 40 horas), especialmente cuando numerosas muestras se prueban simultáneamente.

Por otro lado Van Vuurde (1985) reportó que la inmunofluorescencia (IF) ha demostrado su valor potencial para detectar bacterias patógenas de semillas en estudios modelo realizado en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en semillas de col y en *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli* y *X. campestris* pv. *phaseoli* en semillas de frijol. Las ventajas de IF para una aplicación rutinaria consisten en que la prueba puede ser realizada en pocos días por técnicos con conocimiento microbianos limitados y a bajos costos. El principal riesgo en IF son las reacciones cruzadas o no específicas entre el antisuero y organismos saprofíticos. Durante el desarrollo del método IF, una prueba comparativa puede ser incluida para evaluar la especificidad y sensibilidad de la prueba. El aislamiento de la bacteria es muy importante al respecto.

Para reducir el riesgo de un falso resultado positivo o negativo en las caracterizaciones comerciales de ejemplares de semillas, se realizó un procedimiento rutinario en *P. syringae* pv. *phaseoli* basado en el escrutinio de todos los ejemplares en IF, seguido por aislamiento y pruebas de patogenicidad de ejemplares IF positivos (Van Vuurde, 1985).

Aunque Duveiller y Bragard (1992) de manera similar mencionan la realización de la prueba de inmunofluorescencia para detectar *Xanthomonas*

campestris pv. *undolosa* en semillas de grano pequeño, debido a que los métodos serológicos requieren menos tiempo que otros; además de ofrecer la posibilidad de un procedimiento específico para probar el germoplasma. Y como también apunta Schaad (1982), la inmunofluorescencia ha probado ser muy sensitiva para detectar complejas reacciones antígeno-anticuerpo, requiriéndose alta especificidad del antisuero. Duveiller y Bragard (1992) compararon el método de dilución en placas, el de DOT inmunobinding y el de inmunofluorescencia encontrando que este último es más sensible y rápido. Los procedimientos de prueba de semillas generalmente involucran la combinación de inmunofluorescencia seguido de una placa sobre un medio de agar, para confirmar los resultados positivos; además, encontraron que la sensibilidad de ELISA es 10-100 veces más baja que la inmunofluorescencia.

En un esfuerzo por entender los mecanismos por medio de los cuales el hongo antagonista *Limonomyces roseipellis*, el cual es un basidiomicete que suprime la producción de pseudotecios de *Pyrenophora tritici-repentis* en tejidos infestados de trigo, interactúa con dicho patógeno, Pfender *et al.* (1991) utilizaron la técnica de tinción inmunofluorescente para visualizar las hifas de estos dos hongos y cómo interactúan dentro del tejido dañado. Además, debido a que las hifas de la mayoría de los hongos son generalmente similares en apariencia, las técnicas basadas en la producción de anticuerpos han sido desarrolladas para específicamente teñir el hongo seleccionado y de esta manera distinguirlo de otros hongos, *in situ*. Para este propósito desarrollaron una tinción de doble fluorescencia. Un anticuerpo adicionado con isotiocianato de fluoresceína (FICT) se utilizó para observar *P. tritici-repentis*, una lecitina conjugada de isotiocianato de tetraetilrodamina (TRITC) fue usada para *L. roseipellis* y un revelador de tinción se usó para cubrir problemas de autofluorescencia en las hifas teñidas con TRITC.

Los resultados que se obtuvieron fueron que las hifas de *P. tritici-repens* y *L. roseipellis* fueron distinguidas una de otra en tejido seccionado de la paja de trigo. *P. tritici-repentis* se tiñó en verde frecuentemente y en muy pocas ocasiones de rojo; sin embargo, *L. roseipellis* frecuentemente se tiñó de rojo y nunca se tiñó de verde. Se hallaron puntos de contacto entre los dos hongos donde *L. roseipellis* apareció formando estructuras parecidas a apresorios contra la pared de *P. tritici-repentis* y penetrándolo a la vez. También, con esta técnica fue posible observar las relaciones espaciales de estos dos hongos, como ellos colonizan al tejido de la planta y la naturaleza de su interacción.

Ávila *et al.* (1995) mencionan que se probó un anticuerpo monoclonal para detectar *Pythium ultimum* de otras especies que conviven con él, para lo cual realizaron diversas pruebas serológicas dentro de las cuales estaba la de inmunofluorescencia. Los resultados encontrados demostraron la alta sensibilidad y especificidad de la prueba para detectar a *P. ultimum*. El micelio joven fue altamente reactivo con fluorescencia verde, estando concentrado principalmente en las paredes celulares. La intensidad de fluorescencia verde en el oogonio, anteridio y oosporas jóvenes, fue menor que en el esporangio joven o en la hifa con crecimiento activo. La fluorescencia fue decreciendo a medida que la hifa y el micelio envejecieron y no se detectó en esporangios maduros.

Mediante la combinación de métodos bioquímicos y serológicos Hernández *et al.* (1997) señalan la identificación de cepas de *Azospirillum* sp. aisladas de la rizósfera del maíz. Al estudiarse las relaciones serológicas existentes entre las cuatro especies pertenecientes al género *Azospirillum* se observó que frente a *A. brasilense* hubo dos determinantes antigénicos; sin embargo, frente a las otras especies sólo aparece el determinante genérico. De ahí la necesidad de utilizar antisueros monoespecíficos, cuestión que eliminaría las reacciones cruzadas y permitiría diferenciar una especie de las otras.

Además, ellos encontraron que entre ese género y otros aislados del mismo hábitat tales como *Pseudomonas* y *Bacillus*, comprobaron que mediante la técnica utilizada en ningún caso se observaron reacciones positivas, lográndose de esta forma un antisuero capaz de discriminar microorganismos no pertenecientes a *Azospirillum* sp. De Polli, *et al.* (1990) establecieron la posibilidad de diferenciar especies de este género mediante inmunofluorescencia indirecta. Kooslak y Bohlool (1983) hicieron un estudio poblacional del género mediante las técnicas de inmunodifusión doble (IDD) e inmunofluorescencia (IF).

Con la técnica de inmunofluorescencia, Salinas y Schots (1994) detectaron conidios de *Botritis cinerea* en flores de corte donde se reconocieron a 43 aislamientos de *B. cinerea* de seis países. El porcentaje de conidios que fluorescieron fue del 50-100 %. No se presentó reacción positiva con gerberas sanas o con esporas producidas por otros hongos o bacterias; aunque sí hubo reacción cruzada con cuatro especies de *Botrytis* presentes, pero su patrón de fluorescencia fue diferente los conidios de *Botrytis cinerea*. Bossi y Dewey (1992) también encontraron un comportamiento similar entre *B. cinerea* y *B. fabae* y también fue observada una reacción cruzada entre *B. aclada*, *B. elliptica* y *B. squamosa*, indicando epitopes comunes. A la fecha aún no se conoce la composición química de estos epitopes. Los autores concluyeron que la prueba para detectar la presencia de conidios de *B. cinerea* en flores de gerbera será basada en pruebas de inmunofluorescencia, siendo una ventaja la sensibilidad y especificidad que ella representa.

La técnica de inmunofluorescencia fue usada por Fos *et al.* (1992) para detectar un organismo parecido a micoplasma llamado Stolbur en solanáceas e insectos para identificar al vector. Todas las solanáceas cultivadas (tomate, pimiento, berenjena y tabaco) fueron inoculadas previamente con el micoplasma para posteriormente ser probadas con inmunofluorescencia, dando

reacciones positivas en todas ellas, concluyendo que inmunofluorescencia es la mejor técnica para detectar éste micoplasma en plantas y que esto no depende de la especie de la planta o el órgano que se pruebe.

También Tian *et al.* (1996) utilizaron la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de un organismo parecido a micoplasma en *Paulownia* spp., cuyo síntoma es una especie de escoba de bruja de donde tomaron el antígeno para la producción de anticuerpos. Después de la absorción con extracto sano de *Paulownia* spp., el antisuero pudo efectivamente detectar al micoplasma en diferentes tejidos de plantas infectadas usando isotiocianato de fluoresceína (FITC) mediante microscopio de inmunofluorescencia indirecta. Comparado con la prueba de tinción que usó 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), la inmunofluorescencia indirecta fue más específica, más sensible y más fácil de usar. Además de facilitar la detección del micoplasma *in situ*, la identificación de las razas y el diagnóstico de la planta enferma asociada con el micoplasma.

En la Figura 5 por medio de inmunofluorescencia se pudo detectar al micoplasma en diferentes partes del tejido vegetal comparado con un testigo sano que no presenta indicios de fluorescencia en la fotografía a diferencia de donde se detectó al microorganismo.

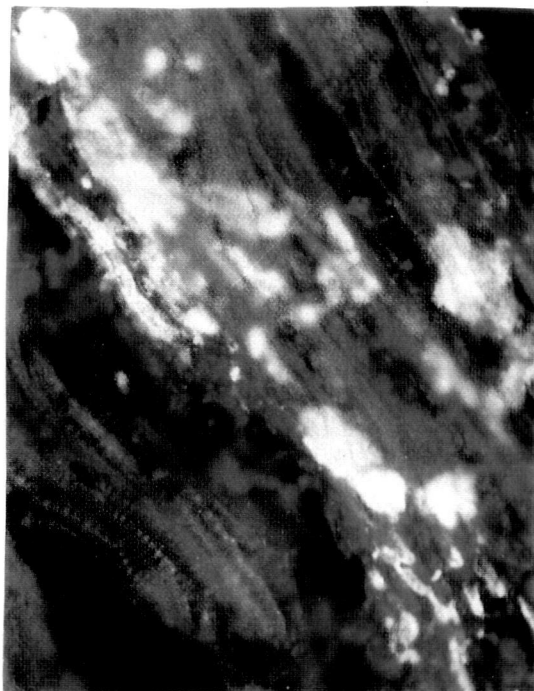
Muchos problemas en la ciencia de la maleza se han podido resolver gracias a la utilización de técnicas inmunoquímicas como lo señalaron Sherman y Vaughn (1991). La inmunofluorescencia y el inmuno-oro de microscopio electrónico son utilizados para obtener en tejidos y en secciones subcelulares la distribución de proteínas o herbicidas de interés.

La técnica de microscopia inmunofluorescente data de la década de los 40's y se utilizó ampliamente en la década de los 50's en la zoología. Sin

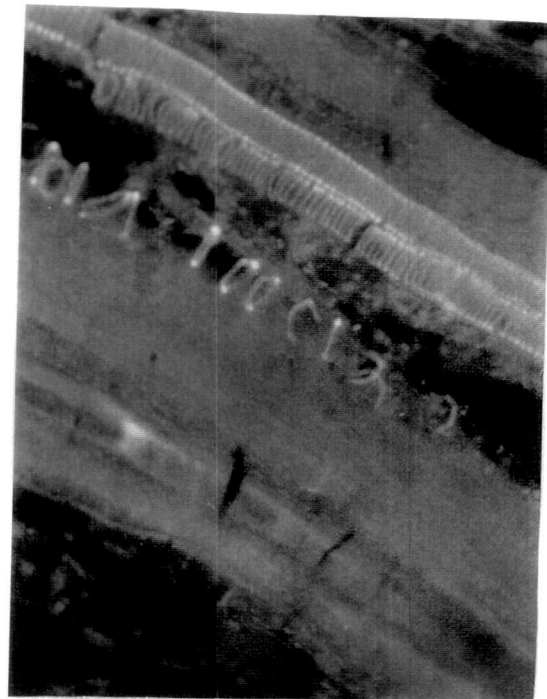
embargo, no fue hasta los 70's cuando aparecieron en la literatura botánica la utilización de anticuerpos específicos (Knox *et al.*, 1980); aunque estas técnicas son frecuentemente usadas por los botánicos hoy día. Los mismos autores indicaron que la inmunofluorescencia ha sido usada mas ampliamente en la investigación del cito-esqueleto de las plantas. Los microtúbulos y microfilamentos de las células vegetales son fijadas utilizando los protocolos de microscopía electrónica, debido a su pequeño tamaño requiriéndose de una tediosa reconstrucción para establecer su orientación tridimensional.

Aunque también Wick *et al.* (1981) describió un procedimiento que resuelve muchos de estos problemas. Las puntas de raíces fueron fijadas brevemente en un amortiguador que estabilizó el orden de los microtúbulos. Las paredes celulares fueron entonces suavizadas o ablandadas por enzimas celulíticas que permitieron el paso de los anticuerpos dentro de la célula. Las muestras fueron incubadas en un antisuero primario que reconoció a la tubulina y entonces en un antisuero secundario que había sido cultivado contra toda la molécula IgG del tipo hallado en el antisuero primario. Este anticuerpo secundario se acopló con una molécula indicadora fluorescente, tal como la fluoresceína (FICT) o rodamina. Las muestras fueron montadas en un medio en el cual se previno de un desteñimiento de la fluorescencia y posteriormente fueron examinados bajo un microscopio fluorescente. El patrón del arreglo de los microtúbulos pudo ser leído en la célula. La inmunofluorescencia permitió la observación de la determinación del efecto de un herbicida en el arreglo de los microtúbulos y en la disrupción mitótica en muchos experimentos posteriores.

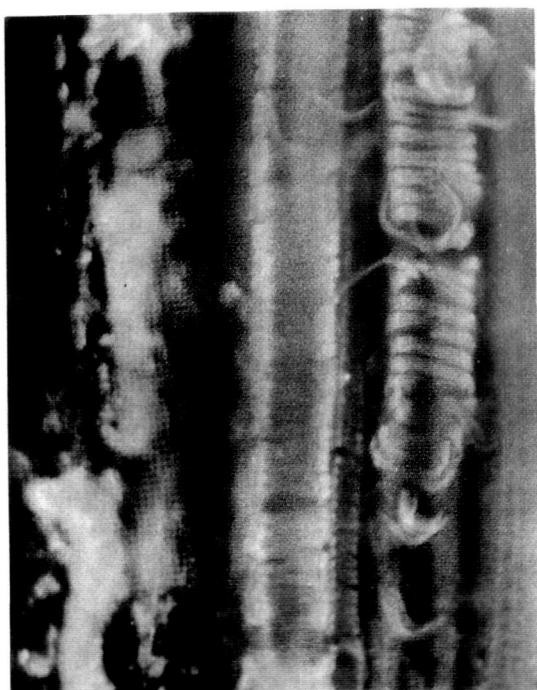
En la Figura 6 se muestra mediante la técnica de inmunofluorescencia la acción del herbicida terbutol en las plantas tratadas. En la célula de control (A) se puede observar un arreglo normal de los microtúbulos donde éstos se originan de una región en común hacia cada uno de los polos. En la célula



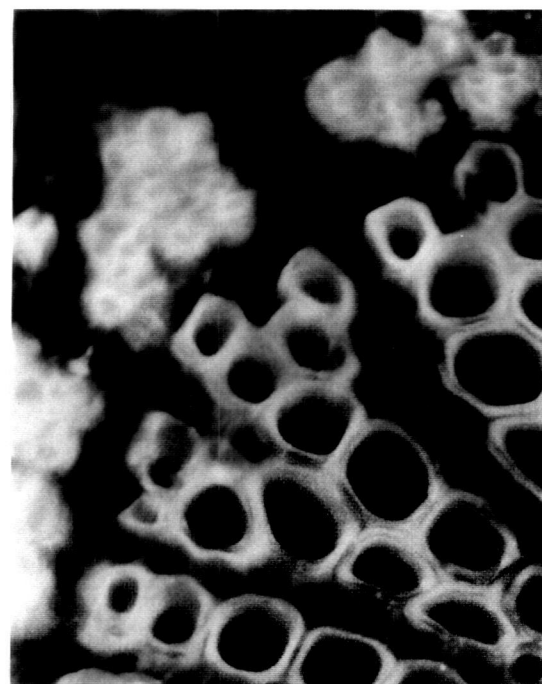
A



B

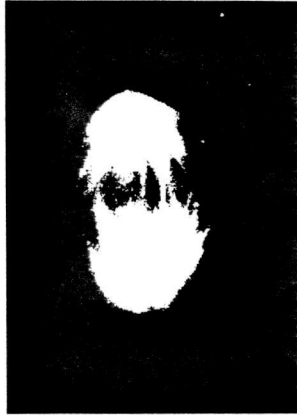


C



D

Figura 5. Inmunofluorescencia en secciones longitudinales de una hoja para observar un organismo parecido a micoplasma llamado Stolbur y que se presenta en Francia. A: Tomate infectado con Stolbur. B: tomate sano. C: tabaco infectado con Stolbur. D: Sección transversal de una hoja infectada con Stolbur (Fos *et al.*, 1992).



A



B

Figura 6. Micrografías inmunofluorescentes de control (A) y tratamiento con terbutol (B) en puntas de raíces de cebolla teñidas para microtúbulos con un anticuerpo monoclonal (Sherman y Vaughn, 1991).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

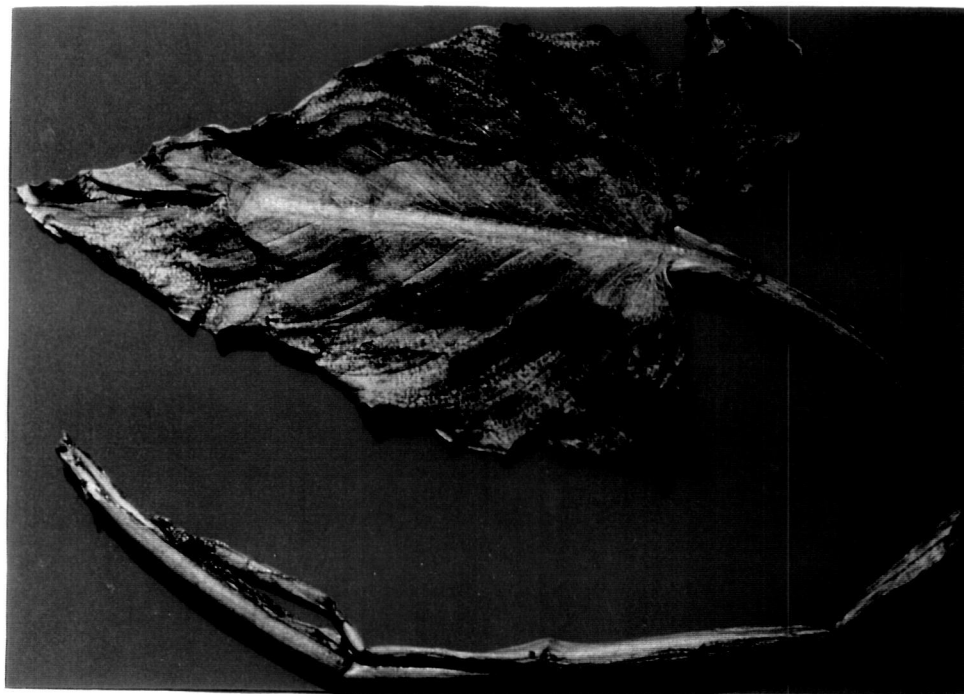
La inmunofluorescencia es una técnica rápida y confiable que requiere para su realización alrededor de 10 minutos, considerando que se dispone del antisuero específico para la bacteria a probar. Sin embargo, si no se cuenta con éste, se puede obtener mediante la inmunización en un conejo, siguiendo los protocolos que se tienen establecidos para dicho fin.

La presente investigación se llevó a cabo para demostrar los métodos de la inmunofluorescencia en la detección de fitobacterias, mismos que pueden ser directos o indirectos en bacterias que se encontraron presentes en las plantas de alcatraz y crisantemo. Naturalmente que éstas técnicas se realizaron desde el aislamiento de las bacterias hasta la obtención del inmunosuero fluorescente y su aplicación en las bacteriosis antes mencionadas. Cabe aclarar que desde un principio se tuvo cuidado de descartar a las bacterias que fluorescen de manera natural, ya que con ellas no es posible realizar esta técnica, debido a que se obtendrían resultados falsos positivos.

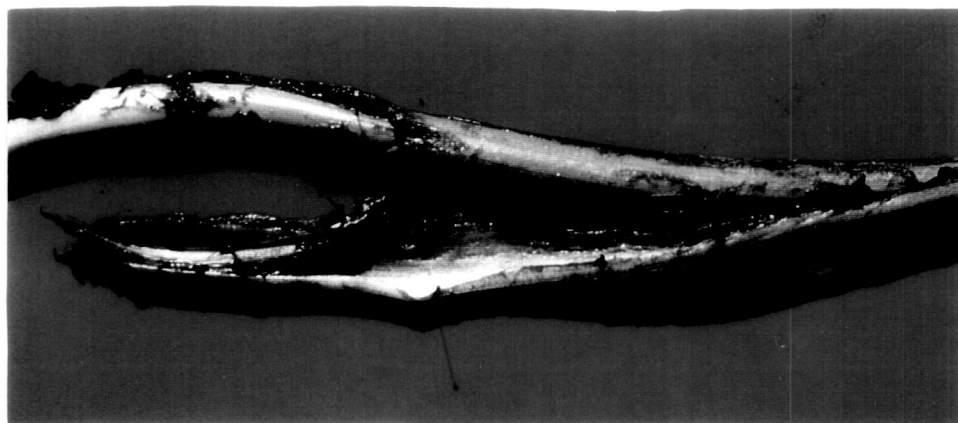
3.1. Obtención del material enfermo

Dado que la incidencia de una enfermedad que causa pudriciones en plantas de crisantemo y de alcatraz en los viveros de Xochimilco, Méx. era del 30%, se colectó el material de dicha zona trasladándose al Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo para su identificación y diagnóstico mediante la técnica de

inmunofluorescencia. En la Figura 7 se muestran los síntomas que presentaban las plantas de alcatraz y crisantemo al ser traídas de campo y de donde se aislaron las bacterias problema.



A



B

Figura 7. Sintomatología en plantas de alcatraz y crisantemo. A: pudrición en alcatraz. B: pudrición en la base del tallo de crisantemo.

3.2. Diagnóstico de las fitobacterias encontradas en plantas de alcatraz y crisantemo que formarían parte del cepario para posteriores pruebas de inmunofluorescencia.

Duveiller *et al.* (1997) sugirieron conceptos generales y métodos para la identificación de bacterias patógenas desde la observación de los síntomas y aislamiento de la bacteria hasta la caracterización del patógeno. Los patógenos pueden ser usualmente caracterizados mediante pruebas bioquímicas. Sin embargo, un gran número de caracterizaciones son posibles mediante la utilización de rango de hospederos, o por el uso de técnicas serológicas y/o moleculares.

Aunque muchas pruebas bioquímicas y fisiológicas se han desarrollado para caracterizar a las bacteria fitopatógenas basadas en aspectos fenotípicos, no todas tienen el mismo valor taxonómico, y los resultados obtenidos en algunos casos pueden variar dentro de una población entre cadenas o razas de una especie dada. No obstante, unas pocas pruebas son generalmente suficientes para identificar ciertos grupos o géneros de microorganismos. Así que, únicamente un pequeño número de pruebas tienen la clave de las diferencias entre las especies patogénicas.

En años recientes, el estudio de las bacterias fitopatógenas se ha visto beneficiado por los nuevos métodos biotecnológicos. El desarrollo de anticuerpos monoclonales ha proveído significativamente de técnicas serológicas, más importante aún, técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos ha hecho posible realizar estudios precisos de carácter taxonómico, así como estudios de factores que controlan su patogenicidad. En contraste con los métodos convencionales que dependen de las reacciones producidas por el patógeno, estas técnicas recientes tienen la enorme ventaja de caracterización, identificación y detección de microorganismos basados en

información genómica. Aunque aún dichas técnicas no están ampliamente disponibles, surgen nuevos descubrimientos y futuros prospectos de estudios actualmente comenzados conducidos en bacterias patógenas de algunas plantas que son brevemente presentadas en este capítulo.

Dentro de los métodos para la identificación y caracterización de fitobacterias se deben considerar los que a continuación se mencionan, mismos que no se pueden evitar si se desea tener un cepario que sirva de referencia para realizar otras técnicas de diagnóstico.

3.2.1. Observación en el microscopio

La observación en el microscopio puede ayudar a determinar si una enfermedad desconocida es de origen bacteriano o no. Algunos patógenos distintos de los hongos, tales como bacterias fitopatógenas no pueden ser identificadas basándose solamente en su morfología. Algunas células bacterianas son hialinas por lo que no pueden ser observadas bajo el microscopio compuesto. El microscopio oscuro provee muchos contrastes de luz pudiendo usarse para detectar células bacterianas transparentes de tejidos enfermos y poder determinar su tamaño y forma, además de su agrupación. Datos que auxilian a un óptimo diagnóstico.

En primer lugar, se realizó la observación al microscopio del material vegetal para detectar la presencia de células bacterianas y describirlas tanto del crisantemo como del alcatraz. Para ésto se realizó un corte del tejido vegetal cercano a las pudriciones. Después se tomó una muestra con la aguja de disección para poner células vegetales con agua estéril en un portaobjetos y de ésta manera proceder a la observación bajo el microscopio compuesto.

3.2.2. Obtención de los especímenes homólogos

3.2.2.1. Aislamiento de las bacterias

Posteriormente a la observación microscópica de las plantas enfermas colectadas con síntomas de pudriciones aparentemente causadas por bacterias localizadas en la base del tallo de ambos tipos de planta (contaminando la planta por completo vía ascendente a través del sistema vascular), se obtuvieron los aislamientos de las bacterias en los límites de las lesiones con la parte sana. Posteriormente, de estas lesiones se hizo una dilución con agua estéril.

El tejido de la planta se desinfectó externamente en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 3 minutos seguido de un lavado en agua destilada estéril. Después se procedió a remover una pequeña parte del tejido con un escapelo flameado en la orilla de la lesión en el límite entre el tejido dañado y el sano poniéndolo posteriormente de manera aséptica en la caja de petri cubierta de agua. Se cortaron trozos y se pusieron a reposar en agua estéril durante 20 minutos, usando una asa bacteriológica estéril se tomó una gota de la suspensión y se sembró en los medios de PDA y B de King. Se incubaron las cajas a 28°C por 24 horas. Para obtener cultivos puros, se necesitó posteriormente sembrar las colonias aisladas a nuevas cajas con el medio de cultivo describiendo la morfología de las colonias posteriormente.

3.2.2.2. Purificación de las bacterias

Cuando crecieron las colonias el siguiente paso fue purificarlas, para lo cual se seleccionaron a las colonias que presentaron características más cercanas a las bacterias buscadas tales como tamaño, color, consistencia y forma. Y también la observación al microscopio para detectar formas ajenas a las bacterias fitopatógenas. Posteriormente, dichas colonias se trasladaron a

nuevos medios de cultivo y de ésta forma se obtuvieron cepas puras. El proceso se llevó a cabo las veces que fueran necesarias hasta tener la certeza de su pureza.

3.3. Postulados de Koch

A través de los postulados de Koch se puede conocer si los especímenes aislados son los causantes de los síntomas encontrados en las plantas de alcatraz y crisantemo ya que cuando se desconoce completamente el origen de una enfermedad que se presenta en una determinada zona existe la necesidad de aplicar los postulados de Koch con la finalidad de determinar al agente causal.

La metodología que se aplicó para conocer con exactitud cuál fue el agente causal se consideraron los siguientes aspectos: a) se familiarizó plenamente con la sintomatología de la enfermedad verificando que el patógeno estuviera en estrecha relación con la planta hospedera susceptible; b) se aisló, cultivó y purificó al patógeno; c) se inoculó una planta de la misma especie pero que estuviera sana para reproducir los síntomas iniciales y comparar; d) se comparó al organismo que se inoculó en la planta sana con el organismo aislado inicialmente y se identificó.

3.3.1. Pruebas de patogenicidad

Se han descrito las pruebas de patogenicidad como la infiltración de la bacteria cultivada y purificada dentro del tejido de la planta para la determinación subsecuente de la bacteria fitopatógena responsable.

Éstas pruebas de patogenicidad permitieron determinar dos aspectos relativos a la identificación de bacterias fitopatógenas. En primer lugar, determinar el rango de la bacteria como patógeno de plantas en general, ya que el desarrollo de una necrosis localizada en plantas no específicas demostró una interacción incompatible traducéndose en una actividad fitopatogénica general. En segundo término, la identificación de la bacteria como agente causal de la enfermedad específica, debiendo tener entonces la habilidad el poder aislar una bacteria que causa la enfermedad en particular a especies de plantas, lo cual provee los criterios necesarios para la determinación de especies y categorías de patovares.

Una vez obtenido el cultivo bacteriano purificado se procedió a la inoculación de las colonias en plantas sanas de crisantemo y alcatraz para determinar la naturaleza de los síntomas por medio de los postulados de Koch en las plantas. Esto se llevó a cabo inoculando colonias de bacterias a una concentración de 10^6 a 10^7 por ml, introduciendo palillos que es lo recomendado en este caso dado el tipo de síntoma que es una pudrición en la base del tallo presente en ambos tipos de plantas. Se utilizaron colonias de 24 horas de crecimiento. Por otro lado, también se dejaron plantas sin inocular para ser utilizadas como testigos. Si la bacteria fuera patogénica, después de varios días de incubación bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, la planta inoculada tendrá una lesión similar al síntoma original.

Después de inocular a las plantas, éstas se depositaron en el invernadero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura para de ésta manera proporcionar las condiciones más favorables para el desarrollo de la enfermedad.

3.3.2. Reacción de hipersensibilidad en tabaco

Dentro de la fitobacteriología la reacción de hipersensibilidad en tabaco es muy importante, ya que permite conocer en 24 horas o menos si se está trabajando con una bacteria fitopatógena, aún con las excepciones que contempla la prueba.

Para la realización de la prueba se debe preparar una suspensión bacteriana en agua estéril a una concentración de 3×10^7 , 3×10^8 y 3×10^9 bacterias/ml e infiltrarla en el tejido vegetal. Si la bacteria es de naturaleza fitopatógena, entonces se observará una flacidez y después una consistencia apergaminada de color café claro, en donde se realizó la inoculación. Se recomienda usar las tres concentraciones porque se desconoce con cuál de ellas se tendrán resultados positivos.

Para llevar a cabo esta prueba el primer paso fue preparar una suspensión bacteriana compuesta por las colonias purificadas que ya se tenían diluyéndolas en agua estéril a una concentración de 3×10^7 , 3×10^8 y 3×10^9 bacterias/ml. Posteriormente, se inyectó dicha suspensión entre los espacios intercelulares de las hojas de una planta de tabaco tratando de abarcar toda el área comprendida entre las venas secundarias. Se colocó a la planta en el invernadero. Se observó si hubo inducción de la reacción de hipersensibilidad en el área inoculada después de 24 horas y se registraron los resultados.

3.3.3. Pudrición en tubérculos de papa

Esta prueba se utiliza para la identificación de géneros de bacterias fitopatógenas y su empleo permite diferenciar parcialmente las especies del género *Erwinia* tales como *E. carotovora*, *E. atroseptica*, *E. chrysanthemi* y el género *Pseudomonas*. Por lo que se utilizó en éste caso para descartar a otras

bacterias que no causan pudrición en papa y así disminuir el espectro de especies que se pudiesen tener.

La metodología para la realización de dicha prueba se describe a continuación: los tubérculos de papa se esterilizaron superficialmente flameándolos con etanol al 96%. En cajas petri con papel filtro se colocaron dos rebanadas de papa, haciendo esta operación a la flama. Se hizo una incisión en ambos pedazos de papa. Con la ayuda del asa bacteriológica en una de las rebanadas se inoculó la bacteria problema y la otra rebanada se usó como testigo. Se humedeció con agua estéril el papel filtro, donde se colocaron las rebanadas y se incubó a 28°C. En 24 horas se presentaron los resultados.

3.4. Pruebas bioquímicas

En el Cuadro 3 se indican las pruebas bioquímicas que se realizaron para identificar los especímenes homólogos de los aislamientos hechos en plantas de alcatraz y crisantemo.

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas para identificar los especímenes homólogos encontrados en plantas de alcatraz y crisantemo.

PRUEBA BIOQUÍMICA	<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
Pruebas de patogenicidad	+	+
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	+	+
Pudrición del tubérculo de papa	+	+
Tinción de Gram	Gram (-)	Gram (-)
Degradación de pectatos	+	+
Licuefacción de gelatina	+	-
Crecimiento a 36 - 37 °C	+	+
Producción de ácido de la lactosa	+	-
Producción de ácido de la trehalosa	+	-
Sensitividad a la eritromicina	-	+
Fosfatasa	-	+
Utilización de malonato	-	+
Utilización de galacturonato	+	+

3.5 Serología

El acceso de la serología con la tecnología de anticuerpos monoclonales combinado con la realización de procedimientos inmunológicos se está aplicando efectivamente hoy día en varios campos de la bacteriología vegetal, por ejemplo, en la identificación y diagnóstico de bacterias, detección de bacterias desde hábitats naturales y en interacciones hospedero-parasito (Goto, 1990).

El mismo autor elaboró los siguientes conceptos acerca de los componentes del antisuero, considerando como antígeno una sustancia que puede estimular a un animal con un sistema inmune en funcionamiento para producir ciertas proteínas (anticuerpos) que reaccionan específicamente con la sustancia *in vitro* o *in vivo*. Aquellas sustancias que son extrañas al animal que se va a inmunizar pueden servir como antígeno.

El anticuerpo es una proteína específica que es producida en un animal como respuesta a la inyección de un antígeno. Esto causa la especificidad y la reacción visible *in vitro* con el antígeno. El suero que contiene a los anticuerpos es llamado antisuero. Los anticuerpos son inmunoglobulinas que están divididas en varias clases con designaciones abreviadas como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE. El rango del peso molecular de estas inmunoglobulinas varía de 160,000 (IgG) hasta 90,000 (IgM).

Puesto que los anticuerpos son bivalentes y las moléculas de inmunoglobulina son monoespecíficas, éstas poseen dos sitios de reacción con los anticuerpos en ambas terminales amino de la molécula y unidas al mismo antígeno. En contraste, las células bacterianas tienen múltiples sitios de determinantes antigénicos (epitopes) en su superficie, así que ellas son multivalentes y usualmente antígenos multiespecíficos como se puede observar

en la Figura 8. La relación entre los sitios de reacción del antígeno y el anticuerpo es altamente específica y frecuentemente se expresa como una relación de llave y cerradura (Goto, 1990).

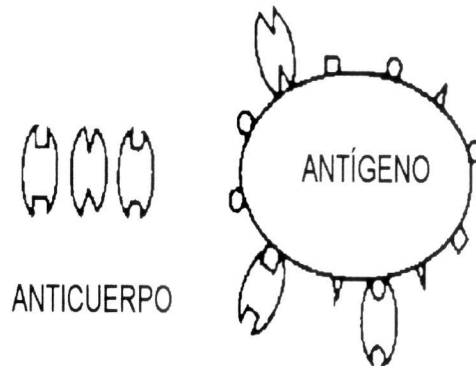


Figura 8. Determinantes multiespecíficos (epitopes) del antígeno y sitios de reacción monoespecífica del anticuerpo (Goto, 1990).

Para la preparación de anticuerpos policlonales se procedió de acuerdo a Goto (1990), que recomendó que las células bacterianas que se inyectaran fueran separadas del medio de cultivo del agar y se suspendieran en una sustancia salina a una concentración aproximada de 1×10^9 células/ml.

3.5.1. Inmunización en el conejo

De colonias obtenidas también de 24 horas de crecimiento se realizó la inmunización en el conejo. Previamente se diluyeron las colonias bacterianas en solución salina. La inoculación fue mediante la inyección de la solución en el torrente sanguíneo del conejo vía intramuscular.

3.5.2. Obtención del antisuero

Se obtuvo el antisuero siguiendo el método registrado por Lelliott y Stead (1987). Ellos mencionaron que el antisuero se puede obtener en conejos, ya

que son animales de tamaño pequeño y fáciles de criar; por lo que en éste caso se utilizó un conejo mediano de aproximadamente dos meses de edad de raza albina.

Se tuvo cuidado de no provocar un shock debido a que las bacterias objeto de nuestro estudio son tóxicas al conejo si se inyectan de manera intravenosa, por lo que en ese caso se recomienda utilizar el método de inmunización intramuscular o subcutánea.

Para obtener un antisuero con el más alto título (con grandes cantidades de anticuerpos específicos) se deben tomar en cuenta principalmente el administrar continuamente el antígeno en la sangre del conejo por varias semanas, ya sea por múltiples inyecciones intravenosas o introduciendo al antígeno dentro del músculo o en el tejido de la piel (Lelliott y Stead, 1987).

En el Cuadro 4 se presenta el método que se utilizó para la producción de antisuero en el laboratorio, con el que la mayoría de las bacterias fitopatógenas Gram negativas pueden producir un título de 1:1600.

Cuadro 4. Horarios de inmunización para la producción de antisuero contra bacterias fitopatógenas (Lelliott y Stead, 1987).

MÉTODO	RUTA	VOLUMEN	ANTÍGENO
DÍA 0	intramuscular	1.0 ml en cada pierna trasera	para ambos 18-24 horas de cultivo en declive en 4 ml de amortiguador fosfatado alcalino
14	intramuscular	1.0 ml en cada pierna trasera	
21	prueba de sangrado		

3.5.3. Purificación del antisuero

Cuando hubieron transcurrido aproximadamente dos meses que es el tiempo óptimo para lograr una buena concentración de anticuerpos en la sangre del conejo dando así una titulación adecuada, se procedió a recuperar el antisuero de la sangre del conejo.

Para obtener la sangre se anesteció al conejo con cloroformo sin llegar a matarlo para de ésta manera colectar la mayor cantidad de sangre bombeada por el corazón del conejo y obtener una cantidad mas grande de antisuero.

Una vez obtenida la sangre, se sometió a un procedimiento para la separación de todos los componentes de la misma y entonces obtener el antisuero purificado y libre de cualquier contaminante que pudiera alterar los resultados posteriormente.

El procedimiento se llevó a cabo primeramente llenando los tubos de ensayo con la sangre en donde se mezcló 0.5 gr de NaCL para acelerar la precipitación de todos los componentes de la misma. Posteriormente se pusieron los tubos en la centrifugadora a 30,000 r.p.m. por 10 minutos. Transcurrido el tiempo necesario, entonces se separó el sobrenadante de las demás sustancias, el cual se vertió en otros tubos de ensayo. De esta manera se obtuvieron los anticuerpos específicos y necesarios para la realización de la técnica de inmunofluorescencia.

3.5.4. Preparación del fluorocromo conjugado

El fluorocromo conjugado se preparó de acuerdo con Klement *et al.* (1990) que indicaron que el antisuero producido en conejos puede ser usado en forma directa en combinación con un fluorocromo comercial. Pueden prepararse diluciones para determinar la dosis óptima siendo para el antisuero

de 1:100 a 1:24,300 y para el conjugado de 1:100 a: 2,700. Los anticuerpos específicos contra la bacteria blanco pueden ser conjugados directamente con fluoresceína (FICT) u otros fluorocromos.

En la tinción de los anticuerpos se mezcló el sobrenadante que también denominado antisuero con la solución fluorescente preparada al mismo tiempo que la obtención del sobrenadante. De esta forma se obtuvo la solución lista para llevar a cabo la prueba de inmunofluorescencia.

La solución fluorescente o indicadora se preparó con HNaPO (fosfato de sodio), púrpura de bromocresol indicador (un gramo), 2,7-diclorfluoresceína indicador fluorescente $M=401.21$ g/mol., tris HCl 1.5 g., precipitador prim80 1 ml. y 5 gr de NaCl de acuerdo a los protocolos consultados en la bibliografía.

Como lo han señalado numerosos autores, la sustancia que se utilizó para la inmunofluorescencia es la fluoresceína (Figura 9) debido principalmente a que emite una fluorescencia observándose un color verde brillante, siendo más fácil la detección de la misma al microscopio.

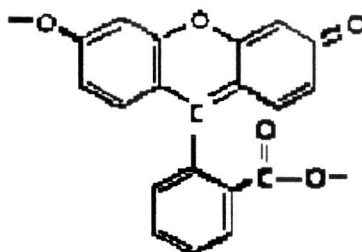


Figura 9. Estructura de la fluoresceína (Mc Kinney, 1990).

3.6. Inmunofluorescencia

Para llevar a cabo la prueba definitiva fue necesario que previamente se hiciera un macerado de una parte de la planta donde no se observaba síntoma alguno de bacterias fitopatógenas.

La prueba de inmunofluorescencia se realizó siguiendo el protocolo del método directo basado en descripciones estándar del Instituto Pasteur de París, Francia y usado para investigación fitopatológica en INRA Angers, en el Government Seed Testing Station (RPVZ) y en el IPO en Wageningen.

Protocolo para el método directo

1. Preparar una gota del macerado de la planta aparentemente sana. Dejar secar una hora aproximadamente.
2. Fijación de la gota secada al aire (etanol al 96% por 10 min.).
3. Lavado con agua destilada (2 - 5 min.).
4. Incubación con el antisuero conjugado y fluoresceína (FICT). La dilución con el antisuero se hace con amortiguador fosfatado, incubación en cámara húmeda.
5. Lavado con amortiguador fosfatado (2 - 5 minutos).
6. Lavado con agua destilada (1 min.).
7. Montado con amortiguador fosfato de glicerina, pH=7.6.

Un microscopio compuesto se utilizó para la observación de la reacción con una fuente externa de luz ultravioleta, para observar la fluorescencia de la bacteria al encontrarse con el anticuerpo marcado con la solución fluorescente.

3.7. Control para la tinción inmunofluorescente

Se utilizaron los siguientes controles para la inmunofluorescencia directa simultáneamente con el ejemplar probado:

- a) bacterias homólogas (control positivo para confirmar el procedimiento correcto).
- b) bacterias con reacción cruzada únicamente a altas concentraciones del antisuero que la dilución con la que se está trabajando (control negativo). Se utilizaron bacterias del género *Erwinia* pero de especies diferentes a las aisladas de alcatraz y crisantemo.
- c) Replicación de las bacterias teñidas tratadas con el antisuero conjugado preparado contra una bacteria no presente en los ejemplares probados, por ejemplo, un patógeno de otro cultivo (control negativo en la reacción del ejemplar probado).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Prueba de hipersensibilidad en tabaco

En la prueba de hipersensibilidad en tabaco se obtuvo una inducción observándose una zona necrótica apergaminada donde las células vegetales aislaron a las bacterias con lo que se demuestra que las bacterias infiltradas son de tipo fitopatógeno.

4.2. Pruebas de patogenicidad

En la prueba de patogenicidad que se llevó a cabo para observar la sintomatología de la enfermedad para ambos tipos de plantas, se encontró que dichas plantas presentaron las mismas lesiones en la base del tallo semejantes a las encontradas en las plantas colectadas y enfermas, demostrándose que el aislamiento original con el cual se inocularon a dichas plantas, es el mismo que inicialmente tenían las plantas colectadas.

4.3. Pruebas bioquímicas

En el Cuadro 5 se presentan en forma resumida las pruebas bioquímicas que se realizaron para identificar a las bacterias homólogas para el control encontradas en los aislamientos de plantas de crisantemo y alcatraz, llegando a

concluir que se trataba de *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* para el caso de alcatraz y *Erwinia chrysanthemi* en crisantemo. Al realizar dichas pruebas bioquímicas se constató la tardanza en el diagnóstico de las fitobacterias, ya que transcurrieron alrededor de tres meses en la consecución de las pruebas para poder emitir un diagnóstico certero.

Cuadro 5. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la obtención de los especímenes homólogos aislados de plantas de alcatraz y crisantemo. Chapingo, México. 1998.

PRUEBA BIOQUÍMICA	Especimen aislado de alcatraz	<i>Erwinia</i> <i>carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	Especimen aislado de crisantemo	<i>Erwinia</i> <i>chrysanthemi</i>
Pruebas de patogenicidad	+	+	+	+
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	+	+	+	+
Pudrición del tubérculo de papa	+	+	+	+
Tinción de Gram	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)
Degradación de pectatos	+	+	+	+
Licuefacción de gelatina	+	+	+	+
Crecimiento a 36 - 37 °C	+	+	+	+
Producción de ácido de la lactosa	+	+	+	+
Producción de ácido de la trehalosa	+	+	-	-
Sensitividad a la eritromicina	-	-	+	+
Fosfatasa	-	-	+	+
Utilización de malonato	-	-	+	+
Utilización de galacturonato	+	+	+	+

4.4. Producción del antisuero

Se encontró una obtención alta de anticuerpos extraídos del conejo lográndose en la titulación óptima del antisuero, debido a que se dejó la producción del mismo por ocho semanas, aunque la literatura indica que son suficientes dos semanas de incubación del antígeno dentro del conejo.

4.5. Inmunofluorescencia

Cuando se tomó tejido aparentemente sano en donde se detectaron a las bacterias fluorescentes y entrar en contacto con las bacterias aisladas de alcatraz y crisantemo con la sustancia fluorescente, se observaron las células bacterianas fluorescentes, debido a que los sitios de cada bacteria son específicos para el anticuerpo que se produjo dando como resultado una reacción de reconocimiento específico.

El reconocimiento antígeno-anticuerpo se llevó a cabo porque el anticuerpo reconoce sitios específicos del antígeno llamados epitopes, que finalmente son proteínas de la pared celular como lo mencionaron Lelliott y Stead (1987) con lo que se demuestra que dicha prueba tiene un alto grado de especificidad con un margen de error mínimo las bacterias aisladas de alcatraz y crisantemo.

Mediante la realización de la prueba de inmunofluorescencia en tejido aparentemente sano en plantas de alcatraz y crisantemo, se pudo detectar e identificar a las bacterias *Erwinia carotovora* supsp. *carotovora* y *Erwinia chrysanthemi*, respectivamente, como se puede observar en la Figura 10.



A



B

Figura 10. Inmunofluorescencia. A: *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* en alcastraz. B. *Erwinia chrysanthemi* en crisantemo.

De todo lo anteriormente expuesto, se puede decir que es posible la producción de sustancias inmunofluorescentes para la detección de bacterias fitopatógenas en plantas de alcatraz y crisantemo, sin tener que recurrir al aislamiento previo de las mismas, sino la realización de la detección en tejido aparentemente sano; pero siempre y cuando se tengan disponibles los antisueros específicos para cada bacteria a probar.

El bacteriólogo que desee preparar el antisuero inmunofluorescente deberá previamente realizar la caracterización de la bacteria mediante las pruebas adecuadas y pruebas de patogenicidad, del tal forma podrá preparar y conservar el mismo por un largo tiempo y el número que desee para que al momento que se requieran pueda hacer un diagnóstico en 10 minutos con un 90 % de seguridad, la cual dependerá del desarrollo óptimo de la técnica.

5. CONCLUSIONES

1. Es factible la implementación de la técnica de inmunofluorescencia en México para detectar e identificar bacteria fitopatógenas en plantas de alcatraz y crisantemo porque ya están disponibles sueros inmunofluorescentes y con la aportación de esta investigación se pueden elaborar los requeridos. Dicha técnica exceptúa a las bacterias fluorescentes.
2. La técnica de inmunofluorescencia conlleva un margen de error mínimo dado el alto nivel de especificidad del anticuerpo, pues es alrededor del 90%.
3. El margen de error está marcado en los casos de bacterias fluorescentes, por la toxicidad de la bacteria y por la generación insuficiente (título) del antisuero.
4. La sensibilidad de la prueba de inmunofluorescencia es alta comparada con otras pruebas de detección e identificación de fitobacterias, debido a que el anticuerpo reconoce todos los epitopes de la pared celular bacteriana y no solamente una parte como en ELISA (enzyme lynked immunosorbent assay).
5. La especificidad de la técnica de inmunofluorescencia es mayor en relación con otras técnicas de detección e identificación de bacterias fitopatógenas, tales como las pruebas bioquímicas o ELISA, dado que la secuencia de las proteínas de la pared celular bacteriana es específica para cada especie, e incluso para cada biotipo.

6. El tiempo requerido para la realización de la prueba de inmunofluorescencia es muy corto, comparado con el requerido para las demás pruebas convencionales en la detección e identificación de bacterias fitopatógenas, utilizándose para ello solamente 10 minutos si se cuenta con el antisuero específico para la bacteria a probar.
7. Uno de los errores que la prueba conlleva es la presencia de bacterias fluorescentes como las diversas *Pseudomonas fluorescens*.
8. En la identificación sin aislamiento se debe pasar por una investigación donde todas las técnicas son comparadas con aquellas del diagnóstico con aislamiento.
9. La más específica de las pruebas puede variar según las enfermedades estudiadas.
10. En la inmunofluorescencia todavía hay problemas de especificidad no resueltos a nivel de patovares, como en el caso de *Pseudomonas syringae* ya que la presencia de varias *Pseudomonas* causa reacciones no específicas.

6. LITERATURA CITADA

- Ávila, F. J.; G. Y. Yuen and N. B. Klopfenstein. 1995. Characterization of a *Phythium ultimum*-specific antigen and factors that affect its detection using a monoclonal antibody. *Phytopathology* 85:1378-1387.
- Akerman, A.; D. Zutra; Z. Volcani and Y. Henis. 1973. Application of an immunofluorescence technique for detecting *Corynebacterium michiganense* and estimating its extent in tomato seed lots. *Phytoparasitica* 1:128.
- Baginska, H. 1996. *Erwinia amylovora*. Sampling and test methods. Quarantine inspection procedure No. 40. *Ochrona-Roslin*. 40:7, 10-11.
- Baginska, H. 1996. *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*. Sampling and test methods. Quarantine inspection procedure No. 44. *Ochrona-Roslin*. 40:6, 16-17.
- Bossi, R. and F. M. Dewey. 1992. Development of a monoclonal antibody-based immunodetection assay for *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 41:472-482.
- Chittaranjan, S. and S. H. De Boer. 1997. Detection of *Xantomonas campestris* pv. *pelargonii* in geranium and greenhouse nutrient solution by serological and PCR techniques. *European Journal of Plant Pathology* 103(6):555-563.
- Coléno, A. 1968. Utilisation de la technique d'immunofluorescence pour le dépistage de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh) Dowson dans les lots de semences contaminées. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 54:1016-1020.

- Cruz A., M. y A. Fernández. 1976. La inmunofluorescencia en el diagnóstico de semillas y de hojas de plantas enfermas con bacterias. Ciencias serie 11:9. Centro de Información científica y técnica. La Habana, Cuba.
- De Boer, S. H. 1990. Immunofluorescence. *In* Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. Hampton, R., E. Ball, and S. De Boer (ed.). APS Press, St. Paul, Minn. pp: 295-298.
- De Boer, S. H. and A. Wiecezorek. 1984. Production of monoclonal antibodies to *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology* 74:1431-1434.
- De Polli, H.; B. Bohlool and J. Dobereiner. 1980. Serological differentiation of *Spirillum* species belonging to different host-plant specificity groups. *Arch. Microbiol.* 126:217-222.
- Duveiller, E. and C. Bragard. 1992. Comparison of immunofluorescence and two assays for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in seeds of small grains. *Plant Dis.* 76:999-1003.
- Duveiller, E.; C. Bragard; K. Rudolph and L. Fucikovsky. 1997. General concepts and methods for the identification of pathogenic bacteria of wheat. The bacterial diseases of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT. pp: 5-23.
- Fos, A.; J. L. Danet; L. Zreik; M. Garnier and J. M. Bove. 1992. Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Dis.* 76:1092-1096.
- Fraaije, B. A.; Y. Birnbaum and R. W. Van den Bulk. 1996. Comparison of methods for detection of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in progeny tubers derived from inoculated tubers of *Solanum tuberosum* L. *Journal of Phytopathology* 144:(11-12) 551-557.
- Gorris, M. T.; B. Alarcon; M. M. Lopez and M. Cambra. 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia carotovora* subsp.

- atroseptica* and comparison of serological methods for its sensitive detection on potato tubers. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2076-2085.
- Gorris, M. T.; E. Camarasa; M. M. López and M. Cambra. 1996. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. *Acta Horticulturae* 411:47-51.
- Goto, M. 1990. *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Academic Press Inc. Shizuoka, Japan. pp:128-141.
- Hernández, A.; A. N. Hernández y M. Calzadilla. 1997. Identificación de cepas de *Azospirillum* sp. aisladas de la rizosfera del maíz. *Cultivos Tropicales* 18(2):5-7.
- Klement, Z.; K. Rudolph and D. C. Sands .1990. *Methods in phytobacteriology*. Akadémiai kiadó, Budapest. pp:172-177.
- Knox, R. B.; H. I. M. V. Vithanage and B. J. Howlett. 1980. Botanical immunocytochemistry: a review with special reference to pollen antigens and allergens. *Histochem. J.* 12:247-272.
- Kooslak, R. M. and B. Bohlool. 1983. *Prevalence of Azospirillum* spp. in the rizosfere of tropical plants. *Canadian J. Microbiol.* 29:649-652.
- Lelliott, R. A. and D. E. Stead. 1987. Recent developments in techniques for rapid diagnosis. *In* *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. *Methods in plant pathologic*. Preece T. F. (ed.). Volume 2. pp:132-151.
- López F., M. C. 1994. *Los caminos de la fitobacteriología*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 216 p.
- López F., M. C. 1997. *Manual de prácticas de bacterias fitopatógenas*. Departamento de parasitología agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 56 p.
- Malin, E. M., D. A. Roth and E. L. Belden. 1983. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris*

- pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. Plant Disease 67:645-647.
- McKinney M. R. 1990. Immunofluorescence microscopy: reagents and technique. In: Kholer, R. B. (ed.). Antigen detection to diagnose bacterial infections. Volumen 1. Methodology. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp:35-49.
- Pfender, W. F.; L. G. King and J. R. Rabe. 1991. Use of dual-stain fluorescence microscopy to observe antagonism of *Pyrenophora tritici-repentis* by *Limonomyces roseipellis* in wheat straw. Phytopathology 81:109-112.
- Rat, B. 1982. *Corynebacterium michiganense*: Technique de detection dans les semences de tomate. Report on the 1st International Workshop on Seed Bacteriology. pp:35-37.
- Saettler, A. W. 1971. Seedling injection as an aid in identifying bean blight bacteria. Plant Dis. Rep. 55:703-706.
- Salinas, J. and A. Schots. 1994. Monoclonal antibodies-based immunofluorescence test for detection of conidia of *Botrytis cinerea* on cut flowers. Phytopathology 84:351-356.
- Schaad, N. W. 1982. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. Plant Disease 66:885-890.
- Schaad N. W., and R. C. Donaldson. 1980. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in infected crucifers seeds. Seed Sci. and Technol. 8:383-391.
- Schober, B. M. and J. W. L. Van Vuurde. 1997. Detection and enumeration of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* using spiral plating and immunofluorescence colony staining. Canadian Journal of Microbiology 43(9):847-853.
- Schuster, M. L. 1955. A method for testing resistance of beans to bacterial blight. Phytopathology 45:519-520.
- Sherman, T. D. and K. C. Vaughn. 1991. Immunology in weed science. Weed Science 39:514-520.

- Tian, G. Z.; X. J. Zhang; S. F. Zhu; C. L. Zang; F. Luo and W. S. Huang. 1996. Detection of mycoplasma-like organisms in the infected paulownia by indirect immunofluorescence microscopy. *Forest Research* 9(1):1-6.
- Trigalet, A. and P. Bidaud. 1978. Some aspects of epidemiology of bean halo blight. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact., Angers*. pp. 895-902.
- Van Vuurde, J. W. L. 1985. Detecting seedborne bacteria by immunofluorescence. *In* Civerolo, E. L.; A. Collmer; R. E. Davis and A. G. Gillaspie (ed.). *Plant pathogenic bacteria*. Martinus Nijhoff Publishers. pp:799-807.
- Van Vuurde, J. W. L. 1990. Immunofluorescence colony staining. *In* Hampton, R.; E. Ball and S. De Boer (ed.). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. APS Press, St. Paul, Minn. pp:299-305.
- Van Vuurde, J. W. L.; P. Kastelein and J. M. Van der Wolf. 1995. Immunofluorescence colony-staining (IFC) as a concept for bacterial detection in quality testing of plant materials and ecological research. *Bulletin OEPP* 25(1-2):157-162.
- Van Vuurde, J. W., M. A. Ruissen., and H. Vrugink. 1985. Principles and prospects of new serological techniques including immunosorbent immunofluorescence, immunoaffinity isolation and immunosorbent enrichment for sensitive detection of phytopathogenic bacteria. *In* Civerolo, E. L.; A. Collmer; R. E. Davis and A. G. Gillaspie (ed.). *Plant pathogenic bacteria*. Martinus Nijhoff Publishers. pp:835-842.
- Wick, S. M.; R. W. Seagull; M. Osborn; K. Weber and B. E. S. Gunning. 1981. Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells. *J. Cell Biol.* 89:605-609.