

Autores: Ana Abigail Vega Aragón*¹, Blanca Lorena Peña García, ¹ Bárbara Hernández Macías¹, Abel López Buenfil ¹Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. ana.vega.i@senasica.gob.mx

Introducción

El CNRF dentro de sus actividades realiza el diagnóstico de plagas vegetales y su referencia, por lo que el Laboratorio de Bacteriología ha conservado cepas bacterianas aisladas de diversos cultivos nacionales y de importación, estas cepas son de importancia biológica, agrícola y económica. La preservación de bacterias fitopatógenas es de suma importancia, ya que permite la óptima supervivencia del ejemplar por diferentes periodos de tiempo sin alterar sus características morfológicas y biológicas (Fahy, Persley y South, 1983), también no menos importante es toda la información correspondiente a sus características, a los cultivos y los sitios de donde fueron aisladas.

La Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO), interesada en tener información del área fitosanitaria dentro de su base de datos nacional Biótica^{5.0}, estableció un proyecto en convenio con el SENASICA, conformando el cepario y formalizando la información que servirá como material de referencia y de consulta.

OBJETIVO

- Conformar un cepario que servirá de apoyo y consulta para la referencia de bacterias fitopatógenas de importancia agrícola, así como también conocer sus características morfológicas y metabólicas, los cultivos que afectan y su distribución.
- Establecer una base de datos computarizada de todos los ejemplares depositados en la colección, capturar la información de cada cepa en la Base de datos de la CONABIO - Biótica^{5.0}.
- Digitalización de imágenes morfológicas, de los principales ejemplares

Materiales y Método

Procedimiento de diagnóstico de la muestra vegetal.

Aislamiento de la cepa bacteriana, caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica.

Identificación

Siembra, Activación de cepas previamente almacenadas, siembra y purificación de las cepas en medios de cultivo de aislamiento, semiselectivos y selectivos



La caracterización de las colonias se realizó mediante pruebas fisiológicas, bioquímicas tradicionales (Rodríguez 2006, Schaad et al. 2001 y T. Gosczyńska et al. 2000) y el Sistema BIOLOG.

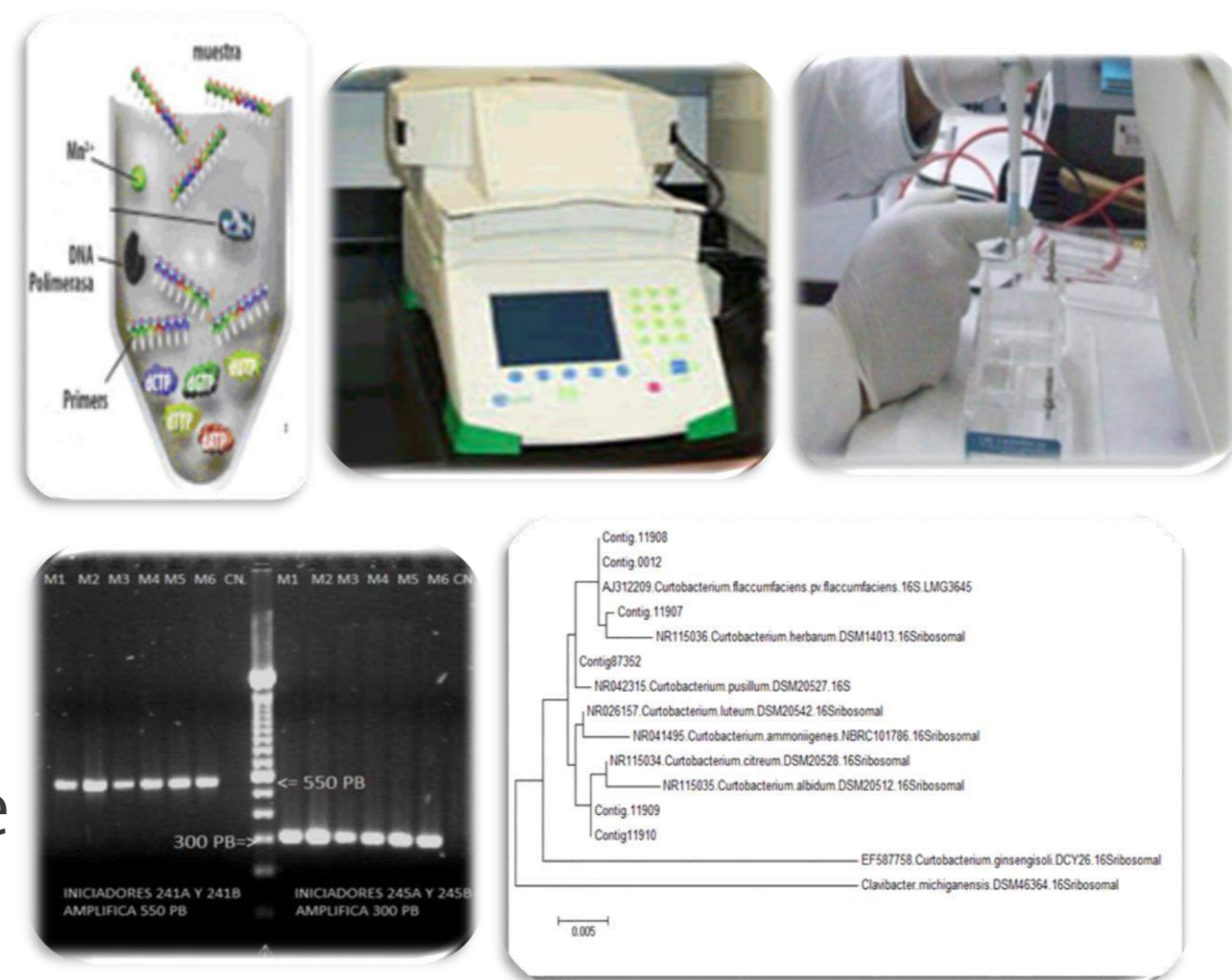


Placa de Elisa y antisueros

- La mayoría fueron analizadas mediante la **técnica serológica ELISA** (Ensayo de inmunoabsorción con anticuerpos ligados a una enzima), utilizando los antisueros y protocolos de las marcas comerciales Agdia® y Neogen®.

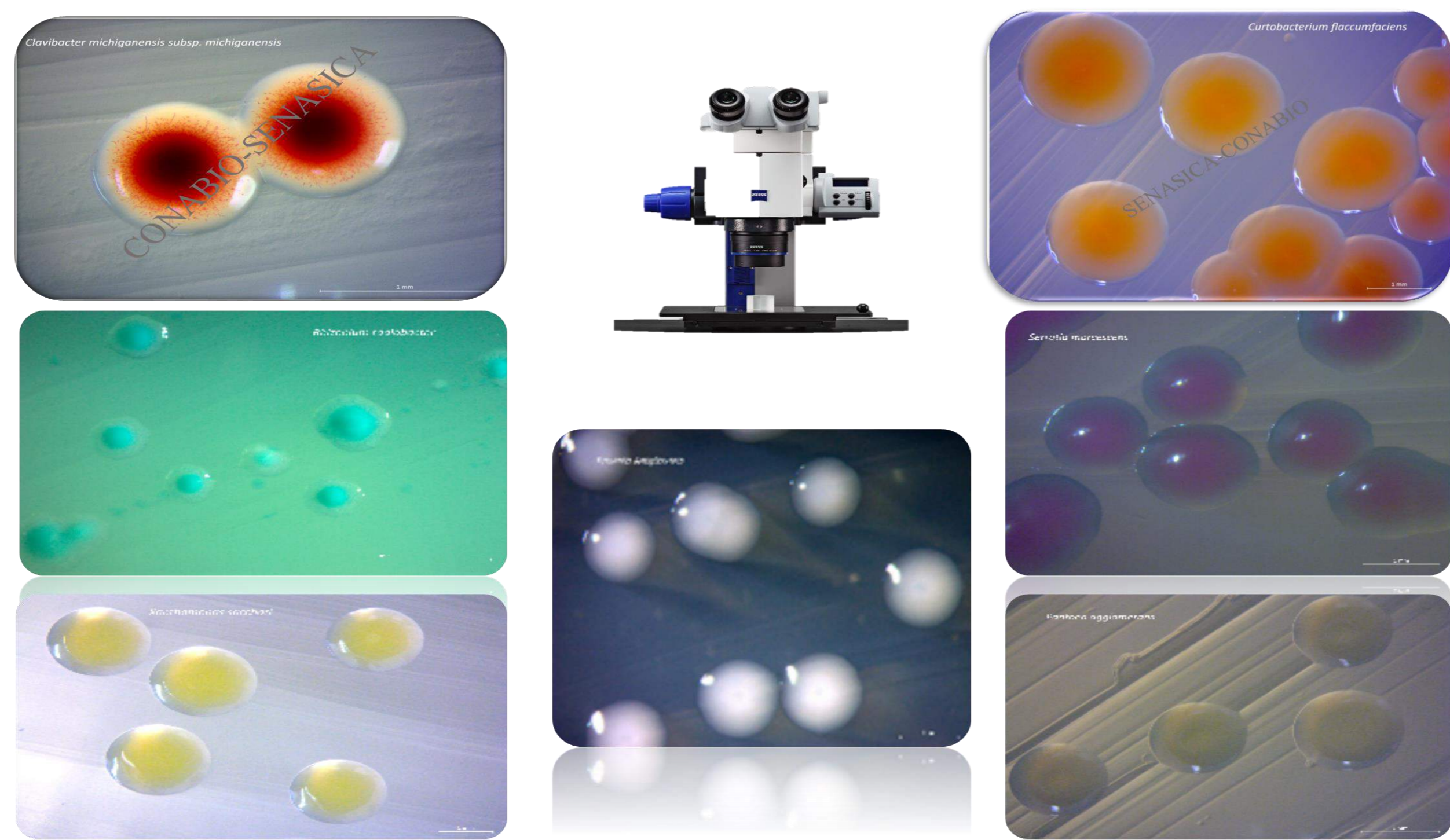
BIOLOGÍA MOLECULAR

- Cada cepa fue analizada mediante Bio – PCR:
 - Extracción de DNA (Doly & Doly 1987 y Tapia & Magaña, 2009).
 - Amplificación del gen 16S
 - Amplificación de genes específicos (uno o múltiples por género)
 - Visualización en geles de agarosa (especie)
 - Algunos casos de importancia se realizó: Análisis e inferencia filogenética de las secuencias.

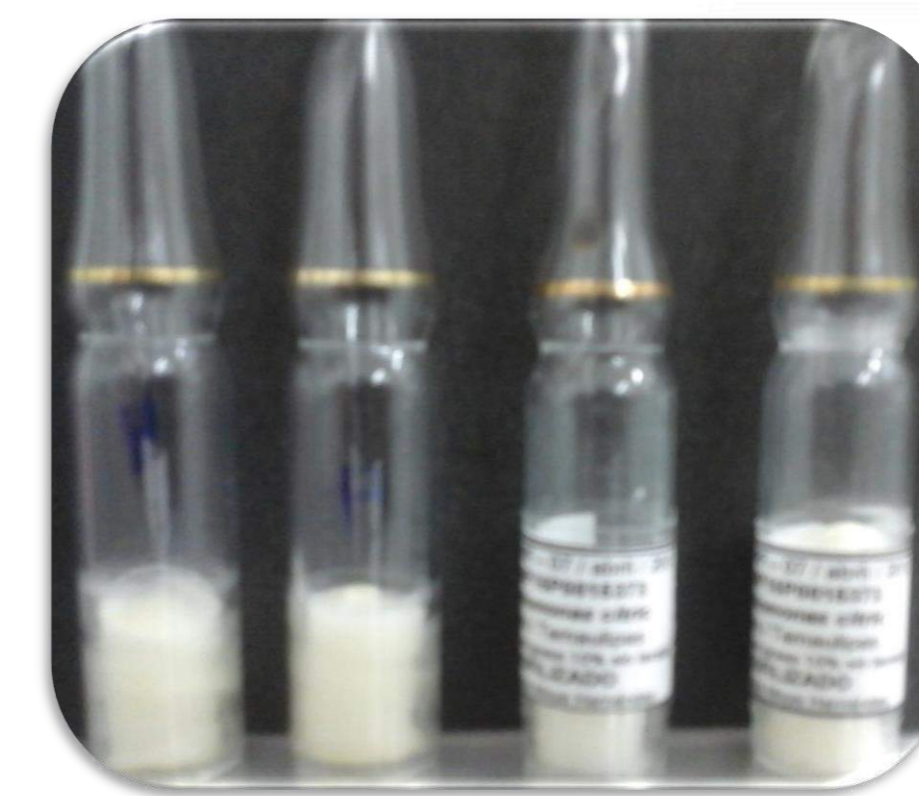


MICROSCOPIA

Se tomaron de 2 a 6 imágenes por cada cepa bacteriana y fueron rotuladas fueron rotuladas con su nombre científico (género y especie).



Conservación

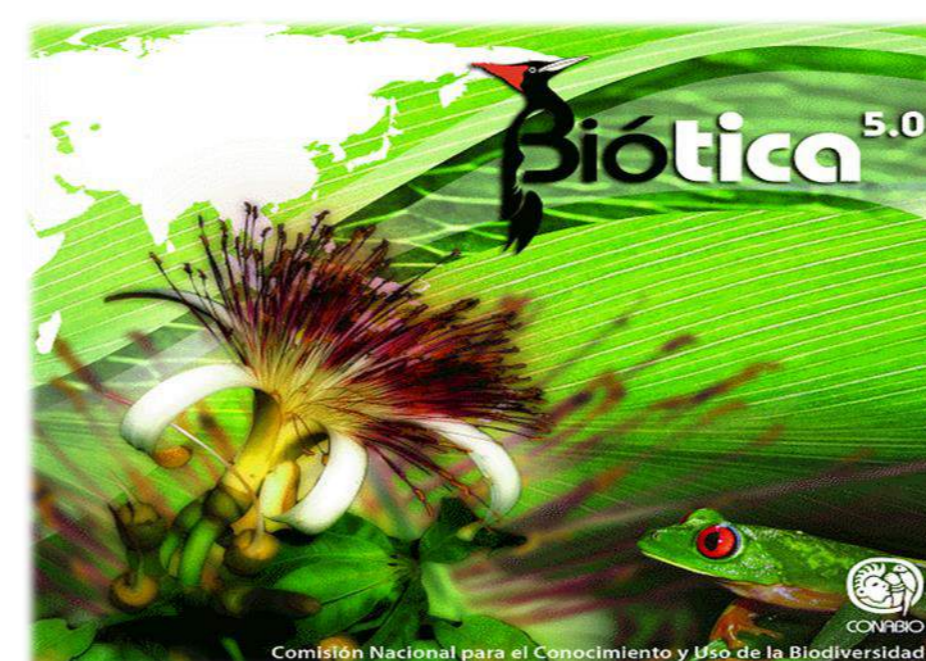


CONABIO
COMISIÓN NACIONAL PARA EL
CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD



Se llevo a cabo por diferentes métodos tradicionales en diversas condiciones (Agua, LB y Caldo nutritivo), a diferentes temperaturas (TA, 4°C, -20°C), así como también por el método de Liofilización

CAPTURA EN LA BASE DE DATOS



La información que fue capturada en la base de datos BIOTICA^{5.0} cumple con los parámetros establecidos donde se tomaron en cuenta los siguientes criterios.

- ✓ Clasificación taxonómica completa para cada especie
- ✓ Colector
- ✓ Fecha de la colecta
- ✓ Identificador
- ✓ Fecha de la determinación
- ✓ Coordenadas geográficas
- ✓ Tipo de preparación
- ✓ Condiciones de la preparación
- ✓ Ambiente en el que esta resguardado
- ✓ Características metabólicas
- ✓ Pared celular
- ✓ Características de la colonia (forma-color)
- ✓ Hospedante
- ✓ Material propagativo
- ✓ Motivo del diagnóstico
- ✓ Parte de la planta afectada
- ✓ Procedencia de la muestra
- ✓ Signos
- ✓ Síntomas

Resultados

Se conformó el cepario de Bacterias fitopatógenas del CNRF mediante la identificación taxonómica de todos los ejemplares, realizando la curación, preservación, estructuración, etiquetado y captura de información en la base de datos en el sistema BIOTICA^{5.0} de CONABIO.

I.- Base de datos

Se capturó la información de 154 ejemplares de 73 sitios, 18 géneros y 46 especies.

En cuanto a las imágenes se cuenta con un total de cincuenta y cuatro imágenes, las cuales ilustran las características morfológicas que desarrollan las cepas en los diferentes medios de cultivo generales y selectivos, importantes para el oportuno diagnóstico de especies fitopatógenas.

Bacteria (Género)	Especie	subsp./pv/Rz	Bacteria (Género)	Especie	Subsp./pv/Rz
Acidovorax	avenae	citrulli	Pectobacterium	carotovorum	
	sp.			argentiniensis	putida
Agrobacterium	tumefaciens		Pseudomonas	cichorii	reactans
Burkholderia	glumae			enthomophila	rizosphaera
Brenneria	rubrifaciens			viridiflava	syringae
Clavibacter	michiganensis	michiganensis	ludensis		taiwanensis
	michiganensis	nebraskensis			
Curtobacterium	flaccumfaciens	flaccumfaciens			
Dickeya	chrysanthemi		Ralstonia	solanacearum	
Erwinia	amylovora		Serratia	marcescens	
Gibsiella	sp.		Xanthomonas	arboricola	pv. fragariae
	agglomerans			axonopodis	pv. phaseoli
Pantoea	ananatis		campestris	pv. vesicatoria	
	stewartii	indologenes	fragariae	pv. fragariae	
	stewartii	stewartii			
	sp.		melonis	sacchari	
			translucens		

II.- Conservación del Cepario

Métodos tradicionales: Conservación en diferentes medios (Agua, LB y Caldo nutritivo) y diferentes temperaturas (° TA, 4°C, -20°C, -40°C y -80°C). Liofilización.

Bibliografía:

- Fahy, P., Persley, S. 1983. Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Academic Press. Sponsored. Australasian Plant Pathology Society.
- Rodríguez Mejía, M. D. L., 2006. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. & W., C., 2001. Plant pathogenic bacteria. 3 ed. St. Paul Minnesota: APS Press.
- Gosczyńska, T. S. J. . . s. s., 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology. South Africa : Bacterial disease Unit. ARC- Plant Protection. Research Institute Pretoria.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.