

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Bacteriología**

Ficha Técnica:

Acidovorax citrulli (Schaad *et al.* 1978) Schaad *et al.* 2009, comb. nov.
(Marchitez bacteriana del fruto de sandía)

Tecámac, Estado de México, diciembre 2018

SENASICA nos protege a todos



1. INTRODUCCIÓN

Acidovorax citrulli es la bacteria causante de la enfermedad conocida como “Marchitez bacteriana del fruto de sandía”, fue observada por primera vez en campos comerciales de Estados Unidos en el año 1989. Actualmente se encuentra reportada en países de Europa como Grecia, Israel, Italia, Turquía y Hungría. De igual manera ha sido reportada en Asia, principalmente en China, Japón y Taiwán.

La bacteria ataca todos los estados fenológicos de la planta, desde plántula hasta fruto. En hojas la bacteria causa manchas acuosas amarillentas, que conforme se desarrollan produce tejido necrótico en el centro de la lesión con un halo clorótico muy pronunciado. En fruto se inicia como pequeñas lesiones de apariencia grasosa sobre la superficie, las cuales crecen rápidamente y se tornan color verde oscuro con márgenes irregulares.

La semilla es el medio más importante de transmisión, pero también se transmite mecánicamente. *Acidovorax citrulli* es una bacteria Gram negativa, que forma colonias de color blanco a crema, de forma circular, bordes lisos y consistencia húmeda, además no producen el pigmento fluoresceína en medio B de King.

2. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Se recomienda que los métodos de diagnóstico incluyan el aislamiento de la bacteria, así como su detección por técnicas serológicas y moleculares.

2.1.1 Aislamiento

A partir de tejido vegetal infectado, realizar cortes finos en la zona de avance de las lesiones y desinfectar con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto. Posteriormente enjuagar 3 veces con agua destilada estéril y transferir el material vegetal a un tubo de ensaye con agua destilada estéril o solución salina estéril al 0.85%. Dejar agitar durante 20 minutos y sembrar con asa bacteriológica, por estría cruzada en medio de cultivo BK, CPG o Agar nutritivo.

Después de 2 a 3 días de incubación a 28 °C se obtendrán colonias color blanco a crema, de forma circular, bordes lisos y consistencia húmeda (Figura 1). Las cepas deben purificarse para realizar pruebas de patogenicidad, además de su identificación bioquímica y de igual manera pueden ser procesadas por la ELISA y PCR.

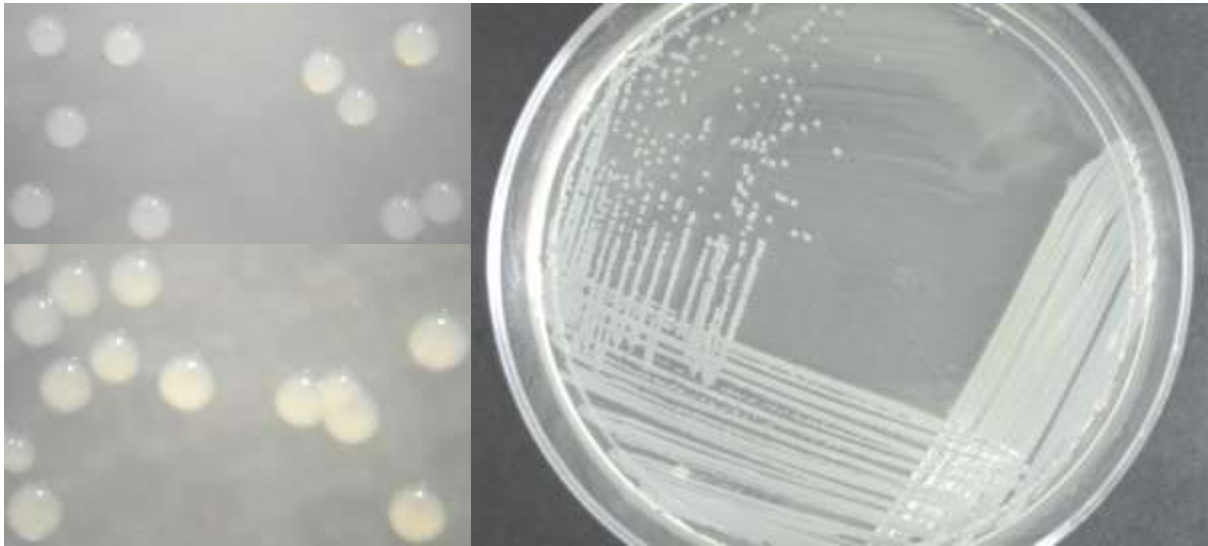


Figura 1. Morfología colonial de *Acidovorax citrulli* en medio B de King, sin producción de fluoresceína. (Créditos: CNRF, Laboratorio de Bacteriología).

2.1.2 Detección en muestras de semillas

Las semillas deben ser lavadas para quitar el exceso de agroquímicos con las que vienen tratadas. La muestra debe ser dividida, una porción para aislamiento, otra para la técnica de ELISA, la porción restante deberá ser colocada en cámara húmeda para inducir la germinación.

Para el aislamiento colocar 12 gramos de semilla en un matraz con 100 mL de buffer de fosfatos estéril. Agitar durante 2 horas y sembrar en cajas petri con medio de cultivo BK, colocando 100µL del buffer y distribuyéndolo con una varilla. Las colonias son de color blanco a crema, circulares, convexas, de bordes lisos, brillantes y de consistencia húmeda. (Figura 1).

2.1.3 Pruebas de patogenicidad

Preparar una suspensión bacteriana con agua destilada estéril a una concentración de 1×10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). Inocular por inyección en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) sandía o melón. Mantener las plantas de 20 a 30 °C.

Si dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación, la zona infiltrada presenta pérdida de turgencia o necrosis, la prueba se considera positiva (Figura 2).

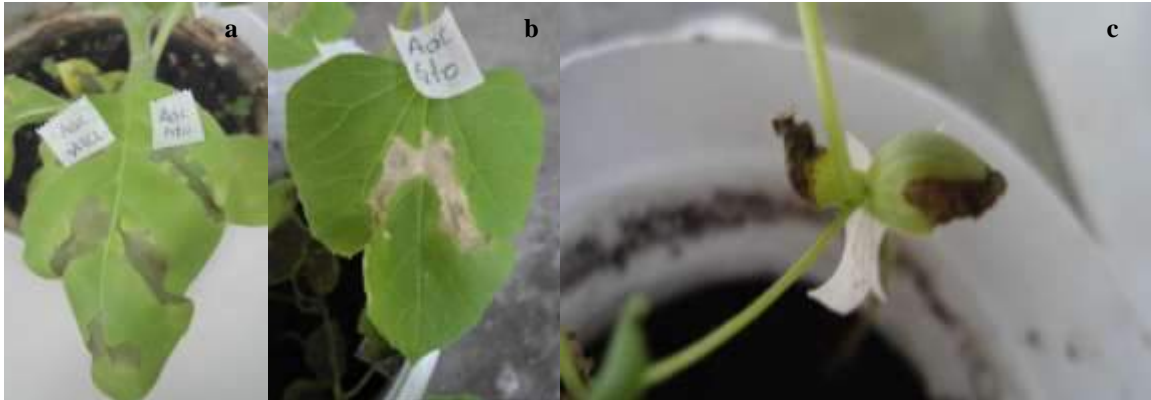


Figura 2. Pruebas de patogenicidad. Reacción de hipersensibilidad a) en tabaco y b) planta de melón. c) Plántula de sandía inoculada con *Acidovorax citrulli*. (Créditos: CNRF, Laboratorio de Bacteriología).

2.1.4 Pruebas bioquímicas diferenciales de caracterización

Para determinar las características bioquímicas de la cepa, esta debe hacerse crecer en determinadas sustancias nutritivas específicas. El Cuadro 1 muestra las principales pruebas que deben realizarse a los aislamientos obtenidos.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Acidovorax citrulli*.

Prueba	Resultado
Gram	Gram negativa
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	+
Pudrición de papa	-
Reacción de O/F	+/-
Crecimiento a 41 °C	+
Oxidasa	+
Arginina	-
Reducción de nitratos	-
Hidrólisis de almidón	-
Producción de ácido a partir de:	
D-xylosa	+
L-arabinosa	+
D-fucosa	-
D-manitol	-
Sorbitol	-
Sacarosa	-

2.1.5 Detección mediante la técnica de ELISA

Para esta técnica se utiliza el kit comercial de la marca Agdia con número de catálogo SRA 52000® y se siguen las instrucciones del fabricante. Cabe mencionar que en material de semillas debe analizarse también por PCR necesariamente.

2.1.6 Detección mediante técnicas moleculares

2.1.6.1 Extracción de DNA total con el método CTAB 2%

1. Revisar la muestra y seleccionar los tejidos de la zona de avance de la enfermedad, homogenizar el tejido y pesar en una balanza analítica de 300 a 500 mg de tejido. Si no se observa la zona de avance, tomar los tejidos que pudieran contener una infección latente.
2. Colocar el tejido vegetal en un mortero estéril y macerar con nitrógeno líquido hasta obtener una consistencia de polvo. En caso de no contar con nitrógeno, la muestra puede ser congelada a ultrabaja temperatura (-80 °C) y posteriormente macerarse.
3. Depositar el polvo en un tubo estéril de 2 mL y agregar 1.5 mL de buffer CTAB 2% previamente calentado a 80°C.
4. Incubar los tubos con las muestras a 80°C durante 15 minutos en baño María.
5. Transcurrido el tiempo dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente por 3 minutos y agregar 100 µL de SDS (Sodio Duodecil Sulfato) 10%, homogenizar las muestras e incubar nuevamente en baño María a 80 °C por 15 minutos.
6. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos y centrifugar 15 minutos a 13 000 g. Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril de 2 mL y agregar 500 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar por inversión para homogenizar la muestra (este paso puede realizarse dos veces).
7. Centrifugar a 13 000 g durante 15 minutos y transferir de 500 a 700 µL del sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 mL.
8. Agregar ½ volumen de etanol: metanol: ácido acético glacial (9:3:1), mezclar por inversión y (es posible dejar toda la noche a 4°C o bien 60 min a -20 °C) centrifugar a 13 000 g por 10 minutos.

9. Decantar el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla y lavarla con 500 μ l de etanol: agua: metanol: acetato de sodio 3M (30:9:5:1). Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos.
10. Decantar el sobrenadante, sin perder la pastilla y lavarla con 500 μ l de etanol al 70 %. Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos.
11. Dejar secar la pastilla y resuspender en 50-100 μ L de agua libre de nucleasas.

2.1.6.2 Verificación de la calidad del DNA

Medir la cantidad y calidad de DNA en un espectrofotómetro. Hacer la dilución pertinente llevando la concentración de DNA a 20 ng/ μ L en agua estéril libre de nucleasas y verificar que la calidad de la muestra se encuentre entre 1.8 y 2.0 de pureza.

2.1.6.3 PCR punto final para la detección de *Acidovorax citrulli*

Realizar la mezcla de la PCR con los siguientes reactivos a las concentraciones finales indicadas en el Cuadro 2 con los primers BX-L1 y BX-S-R2 (Cuadro 3).

Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μ L)
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
Mezcla de dNTP's	10 mM	200 μ M	0.5
Primer F	10 pmol/ μ L	0.4 μ M	1
primer R	10 pmol/ μ L	0.4 μ M	1
Taq DNA polimerasa	5 U/ μ L	0.06 U/ μ L	0.3
DNA	20 ng/ μ L	100 ng	5
Agua grado PCR	-----	-----	13.95
		Volumen final	25

Cuadro 3. Primers para la detección de *Acidovorax citrulli*.

Tipo	Nombre de los primers	Secuencia (5' \rightarrow 3')	Tamaño (pb)
Sentido	BX-L1	CAGCTGGGAGCGATCTTCAT	279 pb
Antisentido	BX-S-R2	GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA	

Después de haberse descongelado los reactivos, preparar la mezcla (mix) de PCR, sobre hielo y en la campana de PCR. Alicuotar 20 μ l de la mezcla de reactivos en tubos de 0.2 mL estériles y posteriormente adicionar 5 μ L de DNA de cada muestra, así como los controles positivos y negativos de la reacción, finalmente etiquetar cada tubo. Colocar las muestras en el termociclador, utilizando los programas correspondientes (Cuadro 4):

Cuadro 4. Programa del termociclador.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5:00	1
95	0:30	30
65	0:30	
72	0:30	
72	5:00	1

Al concluir el programa, tomar 7 μ L del producto de PCR y mezclarlo con 3 μ L de buffer de corrida (naranja G 6X).

Nota: el buffer de corrida debe ser teñido previamente con GelRed™, adicionando 10 μ L del colorante a 2mL de buffer de corrida (naranja G 6X), mezclar perfectamente para su utilización. Almacenar a 4°C.

Depositar el producto de PCR en los pozos de un gel de agarosa al 1 o 1.5%.

Correr la electroforesis a 95 volts durante 60 minutos. Finalmente observar el gel en un transiluminador de luz UV y tomar la fotografía, anotar los datos de la muestra y guardar la imagen.

2.1.6.4 Controles para las pruebas moleculares

De acuerdo con el manual de PCR se deberán incluir controles que permitan disminuir la incertidumbre de los resultados. Los controles corresponden a:

Control positivo: asegura la funcionalidad de los reactivos de PCR. Contiene DNA o clona de la plaga de interés y deberá estar confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de matriz: este control corresponde a un extracto de planta/semilla sin la plaga. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin DNA molde o clona. Descarta falsos positivos.

3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE (Tris-acetate-EDTA) 1x, a 100 Volts por 60 minutos (Figura 3).

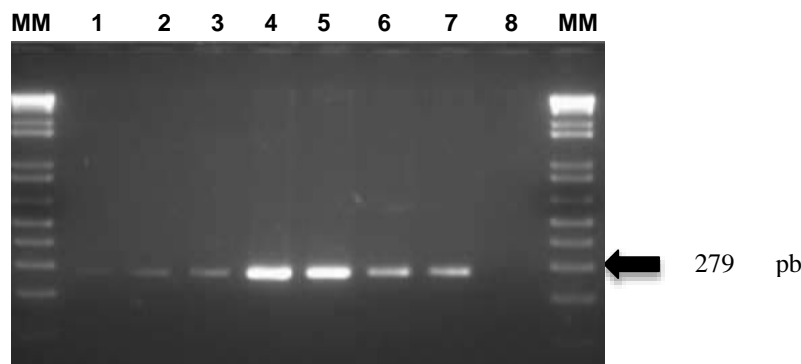


Figura 3. Electroforesis de los productos de PCR con los primers BX-L1 y BX-S-R2. MM: Marcador Molecular 1 Kb. 1 y 2: controles positivos; 3 -7: muestras vegetales; 8: control negativo.

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- El control positivo y las muestras positivas generarán una banda de 279 pb con los primers BX-L1 y BX-S-R2.
- El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben generar bandas.

4. REFERENCIAS

- Rodríguez M. M .L. (2006). Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. De México.
- Schaad et al., (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third edition. APS PRESS.
- Hopkins, D. y Thompson, C. (2002). Seed Transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Cucurbits. HortScience. 37(6):924-926.
- Elizalde A., Jimenez J., Leyva S. (2011). Evaluación del Riesgo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. asociada a semilla de Sandía de Importación a México. Revista Mexicana de Fitopatología. Volumen 29, Número 2.

5. ANEXO

5.1. Medios de cultivo

Medio Agar Nutritivo

Reactivo	Cantidad
Extracto de carne	2.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio B de King

Reactivo	Cantidad
Proteosa de Peptona	20.0 g
Glicerol	15.0 ml
Fosfato de Potasio dibásico	1.5 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	1.5 g
Agar	15.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio CPG

Reactivo	Cantidad
Peptona	10.0 g
Casaminoácidos	1.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	18.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio de Hugh y Leifson

Reactivo	Cantidad
Peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
Fosfato de Potasio dibásico	0.3 g
Agar	3.0 g
Azul de bromotimol	0.03 g
Glucosa	10.0 g

Disolver perfectamente todos los ingredientes y antes de adicionar el agar ajustar el pH a 7.1, el colorante también se puede adicionar como solución acuosa al 1%, es importante que la coloración azul no sea tan intensa, ya que puede interferir en la visualización de los resultados. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión. La glucosa se esteriliza por filtración Millipore cuando el medio tenga una temperatura aproximada de 50 °C. Vaciar el medio en tubos de ensaye estériles.

Medio para la producción de ácido a partir de carbohidratos

Reactivo	Cantidad
Peptona	10.0 g
Hidrato de carbono	10.0 g
Azul de bromotimol	0.0003 g

Ajustar el pH a 7.0 y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión. El carbohidrato (monosacárido, disacárido, polisacárido, alcohol) se disuelve en 5 mL de agua destilada y se adiciona al medio, ya esterilizado por filtración Millipore. Mezclar perfectamente y distribuir en tubos de ensaye previamente esterilizados.

Nota: en todos los medios la cantidad de los reactivos está calculada para 1L.

5.2 Soluciones amortiguadoras

Buffer de fosfatos

Reactivo	Cantidad
Fosfato de Sodio Monobásico NaH_2PO_4	4.26 g
Fosfato de Potasio monobásico KH_2PO_4	2.72 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Buffer CTAB 2%

Reactivo	Cantidad
CTAB	20.0 g
NaCl	82.0 g
Tris base	2.42 g
EDTA	1.46 g
Agua destilada	1000 mL

Mezclar bien los reactivos y agregar lentamente 750 ml de agua. Si permanecen grumos, calentar en microondas o en parrilla, hasta ebullición y seguir agitando. Aforar a un litro y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Acetato de sodio 3M

Reactivo	Cantidad
Acetato de sodio	180.55 g
Ácido acético glacial	45.7 mL
Agua destilada	1000 mL

Disolver el acetato de sodio en 500 mL de agua y posteriormente agregar lentamente el ácido acético glacial. Ajustar el pH a 5.2 y aforar a 1 l.

Buffer de corrida naranja G 6X

Reactivo	Cantidad
Naranja G	60 mg
Glicerol	18 mL
Agua	40 mL

Aforar la mezcla a 50 mL y almacenar a 4 °C.