

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

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Bacteriología**

Protocolo de Diagnóstico:

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* (Smith 1898) Mergaert *et al.* 1993, comb. Nov
(Marchitez de Stewart)

Tecámac, Estado de México, julio 2018

SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y SALUD
AGROALIMENTARIA

Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

I. ÍNDICE GENERAL

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Información sobre la plaga.....	1
2.2. Información taxonómica	3
2.3. Flujo de trabajo	4
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	5
3.1. Aislamiento a partir de tejido vegetal	5
3.2. Aislamiento a partir de semilla	6
3.3. Pruebas de patogenicidad.....	7
3.4. Pruebas bioquímicas diferenciales de caracterización	7
3.5. Sistema de identificación Biolog®	8
3.6. Detección mediante la técnica de ELISA.....	10
3.6.1. Interpretación de resultados de ELISA	10
3.7. Detección mediante técnicas moleculares.....	10
3.7.1. Extracción de DNA total con el método CTAB 2%	10
3.7.2. Extracción de DNA con kit PlantDNAzol®	12
3.7.3. Verificación de la calidad del DNA mediante espectrofotometría.....	12
3.7.4. Verificación de la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa	12
3.7.5. PCR punto final para la detección de <i>Pantoea stewartii</i>	13
3.7.6. PCR stepdown para la diferenciación entre <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> y <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	15
3.7.7. Controles para las pruebas moleculares	16
3.7.8 Interpretación de resultados de PCR punto final.....	17
Primers ES16 y ESIG2c propuestos por Coplin & Majerczak, 2002; EPPO, 2016.	17
3.8. Identificación del patógeno.....	19
4. REGISTROS	19
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL	19
6. RECONOCIMIENTO	19
7. REFERENCIAS	20
8. ANEXO	21
8.1 Medios de cultivo.....	21
8.2 Soluciones amortiguadoras	23

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas ocasionados por <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	2
Figura 2. Aislamiento de <i>Pantoea stewartii</i>	7
Figura 3. Perfil bioquímico de <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	10
Figura 4. Electroforesis de los productos de PCR con los primers ES16 y ESIG2c.	17
Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR con los primers HRP1d y HRP3c.	17
Figura 6. Electroforesis de productos de PCR con los primers DC283galE y DC283galEC.....	18
Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR con los primers 3614galE y 3614galEc	18

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	8
Cuadro 2. Primers ES16 y ESIG2c propuestos por Coplin & Majerczak, 2002; EPPO, 2016.	13
Cuadro 3. Primers HRP1d y HRP3c propuestos por Coplin & Majerczak, 2002.	13
Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final.	13
Cuadro 5. Programa del termociclador para los primers ES16/ESIG2c.	14
Cuadro 6. Programa del termociclador para los primers HRP1d/HRP3c.....	14
Cuadro 7. Primers DC283galE/DC283galEC y 3614galE/3614galEc.	15
Cuadro 8. Programa del termociclador para los primers DC283galE/DC283galEC y 3614galE/3614galEc.	16

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia para la detección de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, mediante el aislamiento y la caracterización de la bacteria por pruebas bioquímicas, de patogenicidad, así como con las técnicas de ELISA y PCR punto final.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Información sobre la plaga

Pantoea stewartii (*Pstw*) fue observada por primera vez a finales de 1800 en Long Island, Nueva York por Fred Carlton Stewart, quién en febrero de 1897 aisló a la bacteria a partir de maíz dulce y describió la enfermedad (Kado, 2010) que es conocida como “Marchitez de Stewart” (Pepper, 1967). Su presencia es frecuente en el este de América del Norte; siendo endémica de algunas zonas de la franja maicera de Estados Unidos y se tienen registros de que también se encuentra presente en Canadá y México. En Asia se encuentra en los países de China, India, Malasia, Tailandia y Vietnam; en Centroamérica se reporta en Costa Rica, Puerto Rico y Trinidad y Tobago. También se le ha reportado en Europa Oriental, en los países de Italia, Rusia y China, según The Cooperative Extension Service, University of Illinois (CABI, 2012).

Pstw puede encontrarse en raíces, tallos, láminas foliares, vainas, panojas, mazorcas y granos de la planta. La bacteria es transmitida por coleópteros y semilla; y se propaga a través del sistema vascular llegando incluso hasta los granos. Los síntomas pueden aparecer en cualquier etapa fenológica de la planta; al inicio las lesiones son alargadas y acuosas y adquieren un color amarillo claro, con márgenes irregulares a lo largo de las hojas. La enfermedad se caracteriza por provocar lesiones acuosas y marchitez vascular en plántulas, así como necrosis linear en hojas de plantas maduras. Las hojas muestran líneas de color verde pálido a amarillo y gradualmente la planta se marchita (CABI, 2012). Además, las hojas presentan estriados cloróticos que corren a lo largo de las hojas y nervaduras (Figura 1).

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* es transmitida por el escarabajo del maíz *Chaetocnema pulicaria* Melsh (familia Chrysomelidae). En Estados Unidos la marchitez bacteriana es considerada como una enfermedad endémica, debido a que en ese país es común el insecto vector, el cual, también se encuentra presente en México (CABI, 2012). El insecto vector, debido a su forma de alimentación, introduce la bacteria al xilema de la planta y en los espacios intercelulares, tanto de plantas adultas como de plántulas de maíz. La bacteria hiberna en el insecto vector y éste es capaz de transmitirla durante todo su ciclo de vida (Kado, 2011).

Además, del escarabajo dentado (*Chaetocnema denticulata* Barb.), la vaquita del pepino con doce manchas tanto en forma adulta como de larva (*Diabrotica undecempunctata* Barb.), el gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica longicornis*), la larva de la mosca de la semilla del maíz (*Delia platura*), el gusano de alambre (*Agriotes mancus* Say.) y varias especies de *Phyllophaga* pueden transmitir la enfermedad, pero de manera menos eficiente (Kado, 2011).



Figura 1. Síntomas ocasionados por *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* en plantas adultas de maíz. Créditos: G. P. Munkvold.

El maíz (*Zea mays* L.) es el principal cultivo afectado por *Pstw*, las razas de maíces dentados, harinosos y palomeros también son atacados por la bacteria. El maíz dulce y sus híbridos son los más susceptibles ya que al ser infectados por la bacteria se marchitan rápidamente y manifiestan síntomas semejantes a plantas que han sufrido daño por sequía o deficiencia nutricional (Kado, 2010). La bacteria también puede afectar a otras gramíneas (trigo y pastos) (CABI, 2012).

Algunos estudios indican el riesgo de que *Pstw* pueda ser introducida a otros países debido a que puede ser transmitida y transportada por semilla. La bacteria ha sido detectada dentro de la semilla en la capa de la aleurona del endospermo así como entre las células que componen esta región, los estudios realizados no la han detectado en el embrión ni dentro de la testa o cáscara (Rand y Cash, 1933).

La marchitez bacteriana es considerada como una de las enfermedades más graves del maíz, ya que provoca reducción en el rendimiento. Aunque la enfermedad ya había sido conocida desde 1800, no fue sino hasta 1930-1931 que se empezaron a registrar fuertes pérdidas del cultivo (Kado, 2010). La Organización Europea de Protección a las Plantas (EPPO) considera a *Pstw* como una plaga cuarentenaria tipo A2, (FAO, 2006). En México *Pantoea stewartii* es una plaga cuarentenaria presente sólo en algunas áreas (Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Veracruz (Valencia *et al*, 2004) y se encuentra reglamentada en el módulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancías de origen vegetal.

2.2. Información taxonómica

Nombre: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Smith 1898) Mergaert *et al.* 1993, comb. nov.

Sinónimos: *Erwinia stewartii* (Smith 1898) Dye 1963 (Approved Lists 1980).

Pseudomonas stewartii (*sic*) Smith 1898.

Bacterium stewartii (Smith 1898) Smith 1911.

Aplanobacter stewartii (Smith 1898) McCulloch 1918.

Phytomonas stewartii (Smith 1898) Bergey *et al.* 1923.

Xanthomonas stewartii (Smith 1898) Dowson 1939.

Pseudobacterium stewartii (Smith 1898) Krasil'nikov 1949.

Nombre Común: Marchitez de Stewart.

Posición taxonómica:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

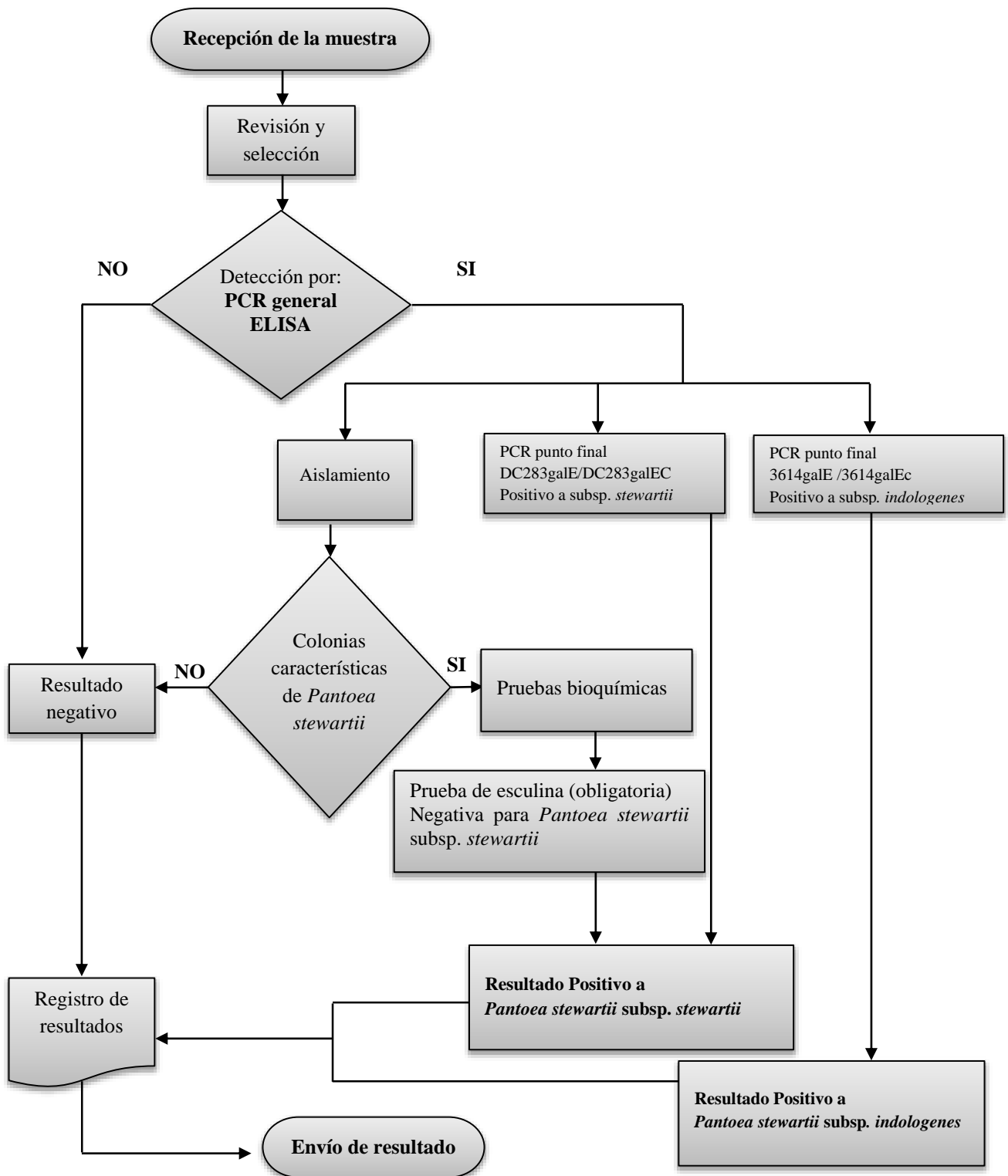
Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Pantoea*

Especie: *Pantoea stewartii*

(Bergey's, 2017).

2.3. Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

La detección de la marchitez bacteriana implica el reconocimiento de los síntomas característicos, el aislamiento de la bacteria, su identificación mediante características morfológicas, bioquímicas, serológicas, moleculares y de poder patogénico. El diagnóstico preferentemente debe basarse en un método integrado para mayor confiabilidad. Para la emisión de un resultado positivo será indispensable contar con el aislamiento de la bacteria del material vegetal, especialmente de semillas. Lo anterior, debido a que las técnicas moleculares y serológicas han demostrado no ser específicas para la determinación de la subespecie, lo cual puede derivar en controversias internacionales. No pueden emitirse resultados positivos sin contar con la cepa bacteriana.

Se deben coleccionar y enviar 20 hojas o 10 plantas con síntomas de la enfermedad, envolverlas cuidadosamente en toallas de papel secante e introducir las en bolsas de plástico con cierre hermético. Anotar sobre la bolsa el número de identificación de la muestra (cuidar que los datos no se borren) y enviarla en hielera con geles refrigerantes a fin de evitar la oxidación de las hojas. El envío debe realizarse el mismo día de la colecta, de no ser posible, las muestras se tienen que resguardar a 4°C y enviar al día siguiente. En caso de trabajar con semillas se recomienda enviar 400 semillas en bolsa de papel o plástico con cierre hermético.

El material vegetal recibido en el laboratorio debe ser inspeccionado para admitir o no su recepción y comenzar con el proceso de diagnóstico. El tejido debe estar en buen estado, es decir, fresco y sin fenolización u oxidación excesiva; tampoco debe tener crecimiento de organismos saprofitos (hongos) debido al mal almacenamiento o excesivo tiempo de envío.

El tejido vegetal con síntomas, debe ser seleccionado y separado en 3 porciones para realizar las diferentes técnicas de detección mencionadas más adelante. La muestra original debe almacenarse a 4°C hasta la emisión de los resultados. En caso de recibir semillas, éstas se mantienen a temperatura ambiente (23 - 25°C) y también deben ser divididas en tres partes: una porción dirigida para el aislamiento, otra para la técnica de ELISA y la porción restante para la técnica de PCR. Si la cantidad de semilla lo permite, es recomendable inducir la germinación en cámara húmeda. El germinado resultante se usa para realizar el diagnóstico también mediante las metodologías ya mencionadas.

3.1. Aislamiento a partir de tejido vegetal

La obtención de cultivos puros de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, aunque requiere de varios días, permite la verificación de patogenicidad; además de que es la prueba definitiva para confirmar la presencia, viabilidad y subespecie de la bacteria. Para el aislamiento es importante la selección del tejido vegetal, el cual, debe contener una alta población bacteriana, esto se logra tomando tejido de las zonas de avance de la enfermedad, es decir, tejido sano y enfermo.

Con un bisturí, previamente desinfectado con etanol al 70%, tomar porciones de tejido con las características mencionadas anteriormente. Desinfectar las porciones de tejido con hipoclorito de sodio al 1% durante 90 segundos, posteriormente enjuagar tres veces con agua destilada estéril. Este procedimiento debe realizarse en condiciones asépticas. Seccionar nuevamente el tejido en trozos más pequeños con la ayuda de un bisturí estéril y colocarlo en tubos de ensayo con 3 ml de agua destilada estéril durante 20 minutos, en agitación constante y a temperatura ambiente para facilitar la salida de la bacteria del tejido. Con una asa bacteriológica, sembrar por estría cruzada en los medios de cultivo B de King, NBY, YPGA (Anexo 8.1); o bien en el medio selectivo Nigrosina (CABI, 2012). Incubar las cajas a 28 °C y examinarlas después de 2-5 días. Se aconseja el uso de por lo menos dos medios de cultivo a la vez.

3.2. Aislamiento a partir de semilla

La transmisión de *P. stewartii* subsp. *stewartii* puede ocurrir a tasas muy bajas en lotes de semilla (<1% de infección). Para el aislamiento, usualmente se recomienda una muestra de mínimo 400 semillas (EPPO, 2016).

Antes de ser procesadas, las semillas deben ser lavadas con agua destilada estéril para eliminar en lo posible los agroquímicos con los que viene tratada, posteriormente dejar secar en papel absorbente. La muestra de 400 semillas debe ser dividida en submuestras de 100 semillas; cada submuestra debe ser pesada, desinfectada con hipoclorito de sodio al 1% y posteriormente colocada en matraces estériles. Añadir medio B de King líquido en un volumen equivalente al doble del peso de la semilla. Incubar las muestras a 28 °C durante 48 horas. Después de la incubación, realizar diluciones seriadas en tubos con medio de cultivo líquido (BK) o agua destilada estéril y dispersar 60 µL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en los medios de cultivo (sólidos) mencionados anteriormente. Dejar incubar las cajas sembradas por 48 horas.

Si la cantidad lo permite, se recomienda sembrar la semilla directamente en medio de cultivo (previa desinfección con hipoclorito de sodio al 1%). También es recomendable colocar las semillas en cámara húmeda para inducir la germinación y observar la posible manifestación de síntomas. En caso de observar síntomas, debe realizarse el aislamiento a partir de las plántulas infectadas.

Las colonias de *P. stewartii* subsp. *stewartii* en medio B de King son circulares de color amarillo pálido, bordes lisos y definidos, además tienen un crecimiento rápido que va de las 48 a las 72 horas. (Figura 2a). En el medio de Nigrosina (CABI, 2012), las colonias crecen en un periodo de 5 a 7 días de incubación a 30°C y son lisas y brillantes, con la característica particular de presentar el centro pigmentado de color negro y los márgenes transparentes (Figura 2b) (CABI, 2012).

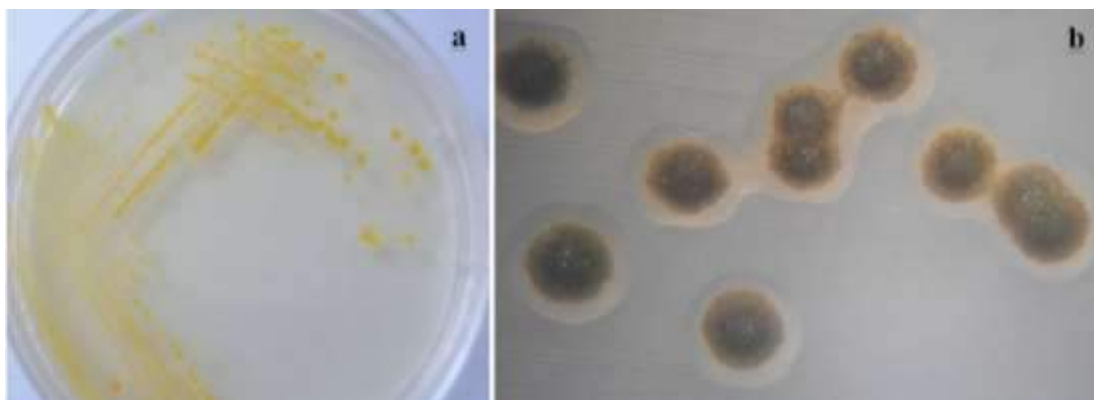


Figura 2. Aislamiento de *Pantoea stewartii*. a) Colonias de *Pstw* en medio B de King. b) Colonias con centro negro y márgenes transparentes características de *Pstw* en medio de Nigrosina. (Créditos: Laboratorio de Bacteriología-CNRF).

3.3. Pruebas de patogenicidad

Cuando se obtengan aislamientos sospechosos a *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, a partir de tejido vegetal o semilla, es indispensable realizar las pruebas de patogenicidad. La bacteria requiere de un tratamiento previo a la inoculación en plantas de tabaco o maíz. Las colonias bacterianas deben ser transferidas (con un tiempo de crecimiento máximo de 72 horas) del medio CPG sólido al medio IM líquido (Anexo 8.1).

Preparar una suspensión bacteriana (con colonias totalmente puras) a una concentración de 10^7 UFC/mL (comparar el patrón de turbidez con escala de McFarland) en el medio IM líquido.

Incubar la suspensión durante 6 horas a temperatura ambiente y realizar la infiltración en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) o maíz con la ayuda de una jeringa hipodérmica. Las plantas testigo deben inocularse con agua destilada estéril; mantener éstas a una temperatura de 28-30°C.

Las plántulas de maíz deben tener de 15-20 días de crecimiento para la inoculación y los síntomas característicos de la bacteria pueden ser observados transcurridos 10-14 días de la inoculación (Kado, 2010).

La reacción de hipersensibilidad en tabaco se observa después de 24-48 horas y se caracteriza por la pérdida de turgencia o necrosis del tejido de la planta.

3.4 Pruebas bioquímicas diferenciales de caracterización

Para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, la cepa bacteriana pura se debe hacer crecer en presencia de determinadas sustancias nutritivas. En el Cuadro 1 se muestran las principales pruebas que deben realizarse a los aislamientos obtenidos.

La prueba de esculina es indispensable ya que permite la confirmación de la subespecie; aunque han sido desarrollados varios juegos de primers para la detección de la bacteria mediante PCR, ninguno de ellos ha mostrado un 100% de especificidad, por ello, para la confirmación de aislamientos sospechosos se debe recurrir a dicha prueba.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram y/o Reacción de KOH	Gram negativa (-) / KOH (+)
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	+
Reacción de Oxidación/Fermentación	+/+
Oxidasa	-
Crecimiento a 37°C*	-
Catalasa	+
Reducción de nitratos	-
Hidrólisis de gelatina	-
Producción de indol	-
Hidrólisis de esculina (Prueba diferencial de otras subespecies de la bacteria)	-
Producción de ácido a partir de:	
Arabinosa*	+
Celobiosa	-
Fructosa*	+
Galactosa*	+
Glucosa*	+
Glicerol	-
Lactosa	-
Maltosa	-
Manitol*	+
Manosa*	+
Melibiosa	+
Raffinosa	+
Sacarosa	+
Sorbitol	V

(+)= Reacción positiva

(-)= Reacción negativa

(V)= Resultado variable

Schaad *et al.*, 2001

* CABI, 2012

3.5. Sistema de identificación Biolog®

La caracterización bioquímica por medio de este sistema representa una alternativa a las pruebas bioquímicas tradicionales, esta metodología reduce el tiempo de diagnóstico pues proporciona resultados en un plazo de 24 a 48 horas.

- 1) Sembrar las cepas bacterianas en medio de cultivo B de King, es importante que las cepas tengan máximo 48 horas de crecimiento e indispensable que se encuentren totalmente puras.

- 2) Antes de comenzar es necesario calibrar el turbidímetro, utilizando el fluido-testigo proporcionado por el fabricante. Con un papel secante (kleenex, kimwipes) limpiar perfectamente el tubo testigo, para evitar interferencias en la medición, encender el equipo y colocar el tubo, ajustar con la perilla hasta colocar la aguja de medición en 85 % de transmitancia o 0.07% de absorbancia.
- 3) Con un hisopo estéril y en condiciones asépticas, inocular la bacteria en el fluido IF-A (Catalogo 72401). Posteriormente medir la absorbancia en el turbidímetro, previamente calibrado. La absorbancia requerida es de 0.1-0.07% o bien de 80-85% de transmitancia, ésta debe ajustarse las veces que sea necesario.
- 4) Una vez listo el fluido, verterlo en un reservorio estéril e inocular las placas GEN III (Cat. 1030) colocando 100 μ L a cada pozo, marcar la placa con los datos de la muestra o cepa e incubar de 24 a 48 horas. En bacterias de lento crecimiento la placa puede incubarse hasta 4 días.
- 5) Transcurrido el tiempo de incubación, analizar la placa. Los pozos que presenten una coloración morado intensa se toman como pruebas positivas; pozos con una coloración morado tenue se denominan como borderline y pozos sin cambio de coloración son pruebas negativas (Figura 3). Los resultados deben ser comparados en la base de datos MicroLogTM para conocer el género y especie de la bacteria.
- 6) Todos los materiales (hisopos, reservorios) y fluido restantes deben ser inactivados.

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-Raffinose	B2 α-D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β-Methyl- D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl- D-Glucosamine	B7 N-Acetyl-β- D-Mannosamine	B8 N-Acetyl- D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α-D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Arabitol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-PO4	D7 D-Fructose- 6-PO4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomycin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L- Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyroglytamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Niaproof 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Gluconic Acid	F5 D- Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Mucic Acid	F8 Quinic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazolium Violet	F12 Tetrazolium Blue
G1 p-Hydroxy- Phenylacetic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α-Keto- Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo- Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 LithiumChloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ-Amino- Butyric Acid	H3 α-Hydroxy- Butyric Acid	H4 β-Hydroxy- D,L-Butyric Acid	H5 α-Keto- Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 SodiumButyrate	H12 SodiumBromate

Figura 3. Perfil bioquímico de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* en el sistema de identificación BIOLOG®. Los recuadros coloreados representan pruebas positivas. (Placa utilizada GEN III).

3.6. 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 el Kit detecta solo género y especie: *Pantoea stewartii*.

3.6.1. Interpretación de resultados de ELISA

Las lecturas se realizan cada 15 minutos después de adicionar el sustrato y los resultados se interpretan de acuerdo a los siguientes criterios:

La reacción se considera positiva (presencia de la fitobacteria) si la lectura de la densidad óptica es mayor o igual a 3 veces el valor de la media del testigo negativo (muestra sana o solución amortiguadora). Si el testigo negativo presenta en promedio valores de densidad óptica menores de 0.03, solo se consideran positivas aquellas muestras con densidades ópticas mayores a 0.100.

Cuando solo uno de los pozos de las muestras es positivo y/o si la diferencia con su repetición es mayor o igual al 50% de su valor, la muestra debe procesarse nuevamente para determinar la presencia de la bacteria.

3.7. Detección mediante técnicas moleculares

3.7.1. Extracción de DNA total con el método CTAB 2%

- 1) Revisar la muestra para localizar el daño en cualquiera de los órganos disponibles de la planta. Seleccionar la zona de avance de la enfermedad y pesar en 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. Para el caso de semillas, primero deben ser lavadas con agua destilada estéril para quitar el exceso de agroquímicos, una vez lavadas, colocarlas en papel secante para quitar el exceso de agua. Cuando las semillas estén perfectamente secas, triturarlas o macerarlas hasta obtener un polvo fino.
- 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. Incubar los tubos con las muestras a 80°C durante 15 minutos en baño María.
- 4) Transcurrido el tiempo dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente por 3 minutos y agregar 100 µL de SDS 10%, homogenizar las muestras e incubar nuevamente en baño María a 80 °C por 15 minutos.
- 5) Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente por 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).
- 6) Centrifugar a 13 000 g por 15 minutos y transferir de 500 a 700 µL del sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 mL.
- 7) 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.
- 8) Decantar el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla y lavarla con 500 µL de etanol: agua: metanol: acetato de sodio 3M (30:9:5:1). Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos.
- 9) Decantar el sobrenadante, sin perder la pastilla y lavarla con 500 µL de etanol al 70 %. Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos.
- 10) Dejar secar la pastilla y resuspender en 50-100 µL de agua libre de nucleasas.

Nota: protocolo proporcionado por el Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios (CISEF) y modificado por el Laboratorio de Bacteriología del CNRF.

3.7.2. Extracción de DNA con kit PlantDNAzol®

La extracción de DNA también puede realizarse con el kit comercial PlantDNAzol™ Reagent (Invitrogen®, catalogo 10978021) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota: se puede emplear algún otro protocolo de extracción de DNA, siempre y cuando el DNA extraído cumpla con los parámetros de calidad e integridad.

3.7.3. Verificación de la calidad del DNA mediante espectrofotometría

El DNA tiene una absorbancia máxima de 260 nm, mientras que las proteínas, las cuales son las impurezas más comunes en el DNA, tienen una absorbancia máxima de 280 nm. Es por ello que esas dos longitudes de onda son utilizadas para verificar la pureza del DNA. Si la relación 260/280 está entre 1.7 y 2.0, la muestra de DNA se considera pura. Una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas (Larios-Sarabia, 2005).

- 1) Analizar la calidad y cantidad de DNA extraído en el espectrofotómetro.
- 2) Realizar las diluciones correspondientes llevando la concentración del DNA de 20-30 ng/mL y verificar que la calidad se encuentre entre 1.7 y 2.0 de absorbancia.
- 3) En caso de que la muestra no se encuentre en el rango óptimo de pureza, se recomienda realizar una nueva extracción de DNA o comprobar mediante amplificación del gen endógeno que el DNA es amplificable.

3.7.4. Verificación de la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa

- 1) Preparar un gel de agarosa al 1.5% y cargar en cada uno de los pozos, 5 µL de DNA mezclado con 3µL de buffer de corrida (naranja G 6X) previamente teñido con el colorante GelRed™.
- 2) Si no se cuenta con GelRed™, el gel debe ser teñido con bromuro de etidio, añadiendo 0.5 µL por cada 100 mL de buffer TAE 1X. El manejo de este reactivo debe ser muy cuidadoso, para lo cual, se debe destinar un área del laboratorio específica y así evitar contaminaciones con este reactivo.
- 3) Correr la electroforesis a 95 volts durante 30 minutos.
- 4) Finalmente observar el gel bajo luz UV.
- 5) Si se observan bandas bien definidas, sin impurezas y sin degradación puede procederse a realizar la reacción de la PCR; de lo contrario se recomienda hacer una nueva extracción de DNA o comprobar mediante amplificación del gen endógeno que el DNA es amplificable.

3.7.5. PCR punto final para la detección de *Pantoea stewartii*

Los primers estandarizados en este protocolo se encuentran diseñados a partir de la región ITS 16S-23S rRNA del genoma de la bacteria y cuentan con una sensibilidad de detección de ≤ 10 UFC mL⁻¹ (EPPO, 2016). Solo son útiles para la identificación a nivel de género y especie (Cuadro 2).

Cuadro 2. Primers ES16 y ESIG2c propuestos por Coplin & Majerczak, 2002; EPPO, 2016.

Tipo	Nombre del Primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	ES16	5-GCG AAC TTGGCA GAG AT-3	920 pb
Antisentido	ESIG2c	5-GCG CTT GCGTGT TAT GAG-3	

El siguiente juego de primers (Cuadro 3) está diseñado a partir del gen *hrp*, que codifica para un sistema de secreción tipo III, necesario para la patogenicidad general y la producción de lesiones en las hojas; además, también es necesario para provocar respuesta hipersensible en hospederos incompatibles y en no hospederos (Pérez, 2008). La utilización ambos juegos de primers se recomienda, con base en las posibilidades y alcance del laboratorio.

Cuadro 3. Primers HRP1d y HRP3c propuestos por Coplin & Majerczak, 2002.

Tipo	Nombre del Primers	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	HRP1d	5- GCACTCATTCCGACCAC -3	900 pb
Antisentido	HRP3c	5-GCGGCATACCTAACTCC -3	

Nota: cada juego de primers debe trabajarse en reacciones separadas.

- 1) Descongelar sobre hielo los reactivos y calcular las cantidades necesarias para cada reacción, de acuerdo al Cuadro 4 (emplear los primers correspondientes, Cuadros 2 y 3).

Nota: utilizar la misma cantidad de reactivos para los diferentes primers.

Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final.

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

- 2) Después de haberse descongelado los reactivos, preparar la mezcla (mix) de PCR, sobre hielo y en la campana de PCR. Alicuotar 20 µl 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.

- 3) Colocar las muestras en el termociclador, utilizando los programas correspondientes (Cuadro 5 y 6):

Cuadro 5. Programa del termociclador para los primers ES16/ESIG2c.

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
94	5:00	1
94	0:30	35
54	0:30	
72	0:45	
72	10:00	1

Nota: la estandarización se realizó en un equipo BIO-RAD modelo T100 Thermal Cycler.

Cuadro 6. Programa del termociclador para los primers HRP1d/HRP3c.

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
94	2:00	1
94	0:20	35
54	0:15	
72	1:30	
72	5:00	1

Nota: la estandarización se realizó en un equipo BIO-RAD modelo T100 Thermal Cycler.

- 4) 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 GelRedTM, adicionando 10 μ L del colorante a 2 mL de buffer de corrida (naranja G 6X), mezclar perfectamente para su utilización. Almacenar a 4 $^{\circ}$ C.

- 5) Depositar el producto de PCR en los pozos de un gel de agarosa al 1 o 1.5%.
- 6) 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.

3.7.6. PCR stepdown para la diferenciación entre *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* y *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes*

La diferenciación entre las subespecies *Pantoea stewartii* es muy importante ya que una identificación errónea puede ocasionar la imposición de restricciones comerciales. Actualmente, se han desarrollado varios juegos de primers que permiten la diferenciación a nivel de subespecies con alto grado de especificidad.

Los juegos de primers estandarizados en este protocolo, están diseñados a partir del gen *galE* que permite la separación de las subespecies *stewartii* e *indologenes*. Se trata de los juegos de primers DC283galE/DC283galEC y 3614galE/3614galEc (Cuadro 7). Éstos deben ser utilizados cuando se tengan amplificaciones con los juegos de primers ES16/ESIG2c y HRP1d/HRP3c.

Los primers DC283galE/DC283galEC únicamente amplifican a la subespecie *stewartii*; mientras que los 3614galE/3614galEc amplifican a la subespecie *indologenes*. De esta manera es posible separar ambas subespecies para obtener un diagnóstico específico y confiable.

Cuadro 7. Primers DC283galE/DC283galEC y 3614galE/3614galEc para la diferenciación de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* y *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* propuestos por Gehring A., et al. 2014.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	Especificidad
Sentido	DC283galE	5- CGACCTGTTTGCCTCTCACT -3	280 pb	Para subsp. <i>stewartii</i>
Antisentido	DC283galEc	5-CATCAGCTTGGAGGTGCCA -3		
Sentido	3614galE	5-CGACCTGTTTGCCTCTCACC -3	240 pb	Para subsp. <i>indologenes</i>
Antisentido	3614galEc	5-CATCAGCTTGGAGGTGCCG-3		

Nota: cada juego de primers debe trabajarse en reacciones separadas; sin embargo, el programa de termociclaje es el mismo para ambos.

- 1) Descongelar sobre hielo los reactivos y calcular las cantidades necesarias para cada reacción, de acuerdo al Cuadro 4.
- 2) Preparar la mezcla (mix) de PCR, sobre hielo y en la campana de PCR. Alicuotar 20 µL de la mezcla de reactivos en tubos de 0.2 mL estériles y posteriormente adicionar 5 µL de DNA de cada muestra, así como los controles positivos y negativos de la reacción, finalmente etiquetar cada tubo.
- 3) Colocar las muestras en el termociclador, utilizando el siguiente programa de termociclaje (Cuadro 8).

Cuadro 8. Programa del termociclador para los primers DC283galE/DC283galEC y 3614galE/3614galEc.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	0:20	10
68	0:30	
72	0:30	
94	0:20	20
63	0:30	
72	0:30	

Nota: la estandarización se realizó en un equipo BIO-RAD modelo T100 Thermal Cycler.

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

Nota: el buffer de corrida debe ser teñido previamente con GelRed™, adicionando 10 μL del colorante a 2 mL 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.

Nota: cuando se obtengan amplificaciones que indiquen que se trata de la subespecie *stewartii*, será necesario contar con el aislamiento de la bacteria y realizar las pruebas bioquímicas diferenciales mencionadas anteriormente.

3.7.7. Controles para las pruebas moleculares

Se deben 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 debe 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.

3.7.8 Interpretación de resultados de PCR punto final

Primers ES16 y ESIG2c propuestos por Coplin & Majerczak, 2002; Eppo, 2016.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE (Tris-acetate-EDTA) 1x, a 100 Volts por 60 minutos (Figura 4).

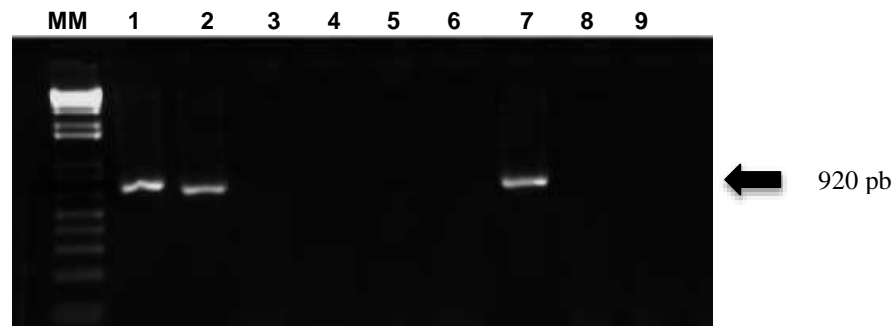


Figura 4. Electroforesis de los productos de PCR con los primers ES16 y ESIG2c. MM: Marcador Molecular 1 Kb. 1 y 2: controles positivos; 3-7: muestras vegetales; 8-9: control negativo.

Primers HRP1d y HRP3c propuestos por Coplin & Majerczak, 2002.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TAE (Tris-acetate-EDTA) 1x, a 100 Volts por 60 minutos (Figura 5).

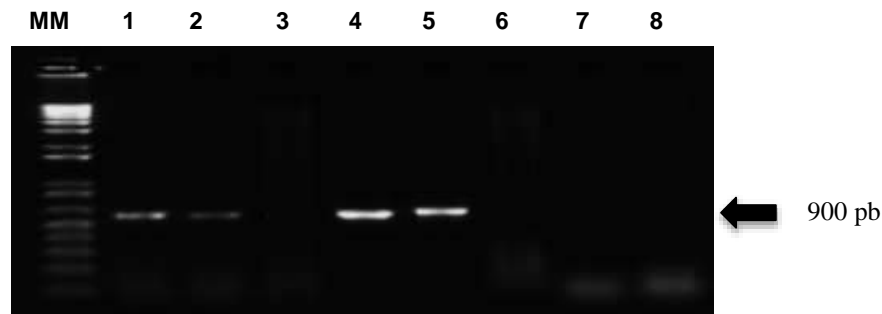


Figura 5. Electroforesis de los productos de PCR con los primers HRP1d y HRP3c. MM; Marcador Molecular 1 Kb; 1 y 2: controles positivos; 3-6: muestras vegetales; 7-8: controles negativos.

Primers DC283galE y DC283galEC para la diferenciación de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* propuestos por Gehring A., et al. 2014.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TAE (Tris-acetate-EDTA) 1x, a 100 Volts por 60 minutos (Figura 6).

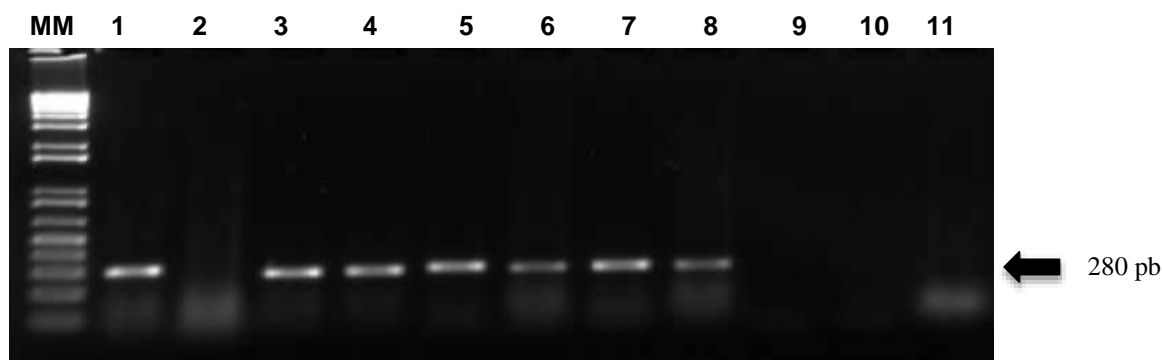


Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR con los primers DC283galE y DC283galEC. MM: Marcador Molecular 1 Kb; 1: *Pstw* subsp. *stewartii* (cepa); 2 – 8: muestras vegetales; 9 y 10: controles negativos; 11: *Pstw* subsp. *indologenes* (cepa).

Primers 3614galE y 3614galEc para la diferenciación de *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* propuestos por Gehring A., et al., 2014.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TAE (Tris-acetate-EDTA) 1x, a 100 Volts por 60 minutos (Figura7).

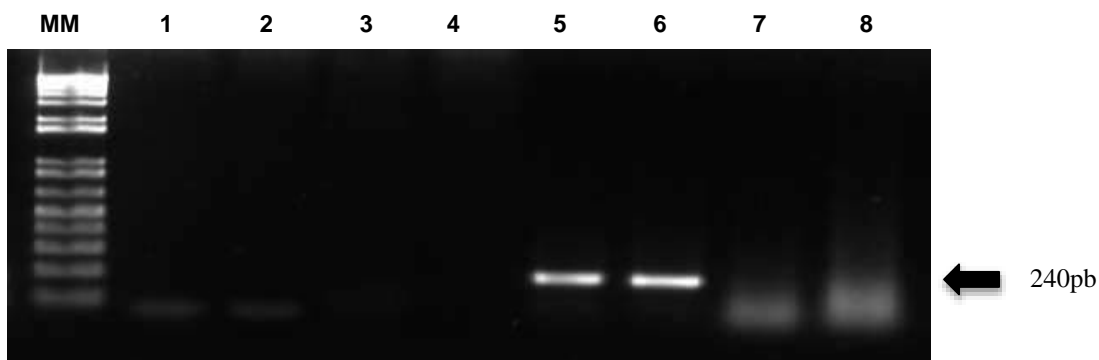


Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR con los primers 3614galE y 3614galEc. MM: Marcador Molecular; 1 y 2: muestras vegetales; 3 y 4: controles negativos; 5 y 6: *Pstw* subsp. *indologenes* (cepa); 7 y 8: *Pstw* subsp. *stewartii*.

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo y las muestras positivas generan una banda de 920 pb, 900 pb, 280 pb y 240 pb con los primers ES16/ESIG2c, HRP1d/HRP3c, DC283galE/DC283galEC y 3614galE/3614galEc respectivamente.

El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben de generar bandas.

3.8. Identificación del patógeno

El requisito mínimo de identificación de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, es que al menos dos pruebas deben ser positivas, con sus controles correspondientes.

Cuando se obtengan amplificaciones que indiquen se trata de la subsp. *stewartii*, es necesario contar con el aislamiento de la bacteria y realizar las pruebas bioquímicas diferenciales mencionadas anteriormente.

4. REGISTROS

Tener registros y evidencias de todo el proceso que implique el diagnóstico de la plaga conforme al Manual del Sistema de Gestión de Calidad.

- 1) La muestra de planta debe ser resguardada a 4°C hasta que el proceso de diagnóstico finalice.
- 2) Las semillas se conservan a temperatura ambiente (20 a 25°C).
- 3) El DNA obtenido de material vegetal y cepas bacterianas debe ser almacenado a -20°C o bien a -80°C, debidamente identificado.
- 4) Las cepas bacterianas deben ser conservadas en una mezcla de caldo nutritivo con glicerol (1 parte de caldo nutritivo por 2 partes de glicerol) a -80°C.

Una vez finalizado el diagnóstico, el tejido vegetal junto con las cepas bacterianas que no se utilizaron, deben ser inactivados en autoclave a 121°C y 15 lb durante 40 minutos.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.bacteriologia@senasica.gob.mx

Teléfono: (55) 59 05 1000 Ext. 51314 y 51333.

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Bacteriología (Ana Abigail Vega Aragón, Andrés Aguilar Granados, Bárbara Hernández Macías, Lidia Guadarrama Valencia y Sandra Lourdes Moya Hernández), revisado por el Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández) y editado por el Grupo DiaFi (Andrés Aguilar Granados y Ariana Guadalupe Robles Zárate).

7. REFERENCIAS

- Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Taxonomic Outline. (Octubre, 2017). Recuperado en Julio 2018 de https://wol-prod-cdn.literatumonline.com/pb-assets/assets/9781118960608/Taxonomic_Outline_October_2017-1507044705000.pdf
- CABI. (2012). Data sheet: *Pantoea stewartii*. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International. Recuperado de <http://www.cabi.org/cpc/?compid=1&dsid=15339&loadmodule=datasheet&page=868&site=161>
- Coplin D. y Majerczak D. (2002). Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* PCR and strain differentiation by PFGE. *Plant Disease*, 86, 304–311.
- EPPO. (2016). PM 7/60 (2) *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. ISSN 0250-8052. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 46, 226–236. Doi: 10.1111/epp.12303.
- FAO. (2006). NIMF n.º 19, Directrices sobre las listas de plagas reglamentadas (2003). FAO. Roma, Italia. 8 p.
- Gehring A., Wesing M., Gernold M., Wiedemann W., Coplin D. L. y Geider K. (2014). Molecular differentiation of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* from subspecies *stewartii* and identification of new isolates from maize seeds. *Journal of Applied Microbiology* 116(6):1553-62. doi: 10.1111/jam.12467.
- Kado C. 2010. Plant Bacteriology. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota U.S.A. pp. 79-87.
- Mergaert, J., Verdonck, L. y Kersters, L. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the Genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., Respectively, and Description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43(1), 162-173.
- Pepper E. 1967. Stewart's Bacterial Wilt of Corn. Monograph No. 4. APS Press. EUA.
- Rand F. and Cash L. 1933. Bacterial wilt of corn. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. 362, 31 pp.
- Schaad *et al.*, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third edition. APS PRESS.
- Valencia T., Mezzalama, Leyva G. y Jeffer D. 2004. Detección de la marchitez bacteriana del Maíz, *Pantoea stewartii* (Smith) Mergaert, Verdonck y Kersters, en el Valle Central de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 308-314.

Forma recomendada de citar:

- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Smith 1898) Mergaert *et al.* 1993, comb. Nov (Marchitez de Stewart) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXO

8.1 Medios de cultivo

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 de Nigrosina

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	1.0 g
Glycerol	30.0 mL
Nistatina	2.0 g
Taurocolato de Sodio	3.0 g
Cloruro de Sodio	15.0 g
Solución al 1% de Nigrosina	20.0 mL
Agar	17.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión, cuando el medio alcance una temperatura aproximada de 50 °C agregar la Nistatina por filtración Millipore.

Medio NBY

Reactivo	Cantidad
Caldo nutritivo	8.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Fosfato de potasio dibásico	2.0 g
Fosfato de potasio monobásico	0.5 g
Agar	15.0 g

Esterilizar por separado 50 mL de solución de glucosa al 10% y 1 mL de solución de Sulfato de Magnesio 1M. Cuando el medio alcance una temperatura aproximada de 50 °C adicionar las soluciones anteriores y vaciar en cajas.

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 YPGA

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	5.0 g
Bacto-peptona	5.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	15.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio IM

Reactivo	Cantidad
Sulfato de Sodio	0.26 g
Fosfato de potasio monobásico	0.14 g
Sulfato de Magnesio	0.24 g
Casaminoácidos	1.0 g
Sacarosa	10.0 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.

Medio de esculina

Reactivo	Cantidad
Peptona	10.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico	0.5 g
Citrato de sodio	1.0 g
Agar	17.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

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

8.2 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.