

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

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Bacteriología**

Protocolo de Diagnóstico:
***Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Gabriel *et al.*, 1989) Schaad *et al.*, 2007**
(Cancro bacteriano de los cítricos)

Tecámac, Estado de México, diciembre 2018

SENASICA nos protege a todos



SADER
SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
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 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* . 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	3
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Información sobre la plaga.....	3
2.2. Información taxonómica	6
2.3. Flujo de trabajo	7
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	8
3.1. Aislamiento y purificación de la bacteria.....	8
3.1.1. Pruebas de patogenicidad en hojas de limón	10
3.1.2. Pruebas bioquímicas.....	11
3.1.3. Sistema de identificación BIOLOG®	12
3.2. Técnica de ELISA.....	13
3.2.1. Interpretación de resultados de ELISA.....	13
3.3. Técnicas moleculares	14
3.3.1. Extracción de DNA total con el método de CTAB 2%	14
3.3.2. Extracción de DNA con kit Plant DNAzol®.....	15
3.3.3. Verificación de la calidad del DNA mediante espectrofotometría	15
3.3.4. Verificación de la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa.....	15
3.3.5. PCR punto final para la detección de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	16
3.3.6. PCR tiempo real para la detección de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	19
3.3.7. Controles para las pruebas moleculares.....	20
3.3.8. Interpretación de resultados de PCR punto final	20
3.3.9. Interpretación de resultados de qPCR	22
3.4. Identificación de plaga.....	22
4. REGISTROS.....	23
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL	23
6. RECONOCIMIENTO.....	23
7. REFERENCIAS.....	23
8. ANEXO.....	26
8.1 Medios de cultivo.....	26
8.2 Soluciones amortiguadoras	28

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas ocasionados por <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> en limón.....	5
Figura 2. Colonias de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> en medio de cultivo B de King.....	9
Figura 3. Colonias de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> en medio YDC.	10
Figura 4. Pruebas de patogenicidad en hojas de limón.....	11
Figura 5. Placa GEN III del sistema BIOLOG®.....	13
Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR con los primers XACF y XACR.	21
Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR con los primers J-pth1/J-pth2 y J-Rxg/J-RXc2.	21
Figura 8. Curva de cuantificación para la detección de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> en PCR tiempo real.	22



III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	11
Cuadro 2. Primers utilizados para la identificación de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	16
Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final.	17
Cuadro 4. Secuencias de los primers para la detección de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	17
Cuadro 5. Programa de termociclaje para los primers XACF/XACR.....	17
Cuadro 6. Programa de termociclaje para los primers J-Rxg/J-RXc2 y J-pth1/J-pth2.....	18
Cuadro 7. Primers para el gen de la gyrasa de <i>Xanthomonas</i> sp.....	18
Cuadro 8. Programa de termociclaje para los primers XgyrBF/XgyrBR.....	19
Cuadro 9. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tiempo real.....	19
Cuadro 10. Primers J-pth3 / J-pth4 para tiempo real.....	20
Cuadro 11. Programa de termociclaje para los primers J-pth3 / J-pth4.	20

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

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

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Información sobre la plaga

El cancro se encuentra presente en Asia, África, Norte América, Sudamérica y Oceanía. “De acuerdo a lo dispuesto en la ISPM 8 *Determination of pest status in an area* (IPPC, 2018b), *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, en México es Transitoria: accionable, ya que la plaga ha sido detectada como una población aislada que podría sobrevivir en el futuro inmediato, cuyo establecimiento está previsto por lo tanto cumple con la definición de plaga cuarentenaria establecida en la ISPM 5 *Glossary of phytosanitary terms* (IPPC, 2018a)” (DGSV-CNRF. 2017).

La mayoría de los cítricos cultivados son susceptibles a esta enfermedad, genera daños en muchas especies de la familia *Rutaceae*, principalmente en *Citrus* spp., *Fortunella* spp. y *Poncirus* spp., las cuales se cultivan en entornos tropicales y subtropicales predominantes en muchos países de Asia, América del Sur, Oceanía y África (IPPC, 2014).

La toronja, la lima mexicana y algunas naranjas tempranas son las más susceptibles. Las naranjas de la variedad “Valencia”, tangerinas y otros híbridos de naranja son menos susceptibles, mientras que las mandarinas son tolerantes (Zerki, *et al.*, s f.).

X. citri subsp. *citri* puede causar defoliación severa, muerte regresiva de las ramas y caída prematura de frutos. Los síntomas muestran características muy particulares, lo que favorece la identificación de la bacteria en campo. Las lesiones son de color marrón, circulares elevadas, acorchadas con bordes húmedos y halo amarillo, con apariencia de cráter (Gottwald, *et al.*, 2002; Dewdney y Graham, 2012).

Síntomas en hojas: las lesiones aparecen entre 5 y 7 días después de la infección con temperaturas cálidas, entre 27 °C y 30 °C y en condiciones de humedad. Los primeros síntomas se observan como lesiones pequeñas en forma de ampolla levantada, cuando son jóvenes, el halo amarillo es más prominente y a medida que las lesiones envejecen, estas se vuelven bronceadas de un color marrón y el margen acuoso luce rodeado por un anillo o halo amarillo (Figura 1, a, b, c y d). El centro de la lesión se levanta y se observa de consistencia similar al corcho. Normalmente las lesiones son visibles en ambos lados de las hojas (Zekri *et al.*, 2015).

Lesiones en tallo y ramas: normalmente estas lesiones indican que se ha presentado una lesión durante al menos, un año. Estas sirven como un depósito de inóculo persistente y son capaces de producir inóculo hasta por cuatro años. Cuando las lesiones se producen en los tejidos leñosos, éstos tienen el mismo color que la rama pero con una elevación similar a una verruga. Los síntomas en ramas y en frutos son similares y consisten en lesiones corchosas elevadas, de color marrón o negro, rodeadas por un margen aceitoso o acuoso (Figura 1, e y f). A medida que las lesiones maduran adquieren un aspecto de costra o de corcho (Zekri *et al.*, 2015).

Síntomas en fruto: las lesiones jóvenes son elevadas similares a una ampolla, bronceadas y pueden estar rodeadas de un halo amarillo en función de la madurez del fruto. Con el envejecimiento de las lesiones, estas se vuelven de color marrón oscuro a negro, hundidas y corchosas y pueden presentar un halo amarillo (Figura 1, g y h). Las lesiones viejas suelen tener una apariencia gris y pueden causar la caída prematura del fruto, reduciendo así el rendimiento de la producción de fruta. La calidad interna de la fruta no se ve afectada (Zekri *et al.*, 2015).

La bacteria sobrevive en lesiones ubicadas en brotes vegetativos, los cuales conforman la principal fuente de inóculo para ciclos de cultivo de años posteriores. La bacteria invernante causa nuevas infecciones a la llegada de la primavera, que generan grandes cantidades de bacterias que son dispersadas por diferentes medios. La bacteria también puede sobrevivir largos periodos de tiempo en la corteza de los troncos y las ramas laterales, también es diseminada por el agua libre presente en la superficie del follaje, que al gotear salpica nuevos brotes (Gottwald, *et al.*, 2002).

Las tormentas ocasionadas por los huracanes incrementan gravemente la dispersión de la enfermedad, debido a que los vientos causan heridas en las hojas y ramas de los árboles. La bacteria se desplaza a distancias mayores a 100 m en las gotas pequeñas de agua y así causa infecciones en árboles vecinos. El riego por aspersión favorece el desarrollo de la enfermedad debido al salpique de agua que puede contener a la bacteria (SENASICA, 2016).

Durante las estaciones de primavera y verano cuando ocurren las lluvias y los vientos superan los 8 m/s se favorece la dispersión de la enfermedad (Graham *et al.*, 1992; SENASICA, 2016). La bacteria penetra a la planta principalmente a través de los estomas y aberturas naturales. La presencia del minador de la hoja *Phyllocnistis citrella* puede favorecer el incremento de la incidencia y severidad de la enfermedad (Gottwald, *et al.*, 2002).



Figura 1. Síntomas ocasionados por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en limón. a-d) Lesiones en hojas, manchas color marrón de aspecto corchoso, rodeadas de un halo amarillo. Créditos: Hilda D. Gómez-USDA y Laboratorio de Bacteriología-CNRF. e y f) Lesiones corchosas elevadas con márgenes aceitosos, en ramas. Créditos: Hilda D. Gómez-USDA. g y h) Lesiones hundidas color marrón, rodeadas de un halo clorótico, en fruto Créditos: Hilda D. Gómez-USDA.

2.2. Información taxonómica

Nombre: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Gabriel *et al.*, 1989) Schaad *et al.*, (2007)

Sinónimos: *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* Gabriel *et al.*, 1989, Schaad *et al.*, 2007

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Hasse) Vauterin *et al.*, 1995

Xanthomonas citri (ex Hasse, 1915) Gabriel *et al.*, 1989

Xanthomonas campestris pv. *aurantifolii* Gabriel *et al.*, 1989

Xanthomonas campestris pv. *citri* (Hasse) Dye, 1978

Xanthomonas citri f.sp. *aurantifoliae* Namekata y Oliveira, 1972

Pseudomonas citri Hasse, 1915

Nombre Común: Cancro de los cítricos

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Género: *Xanthomonas*

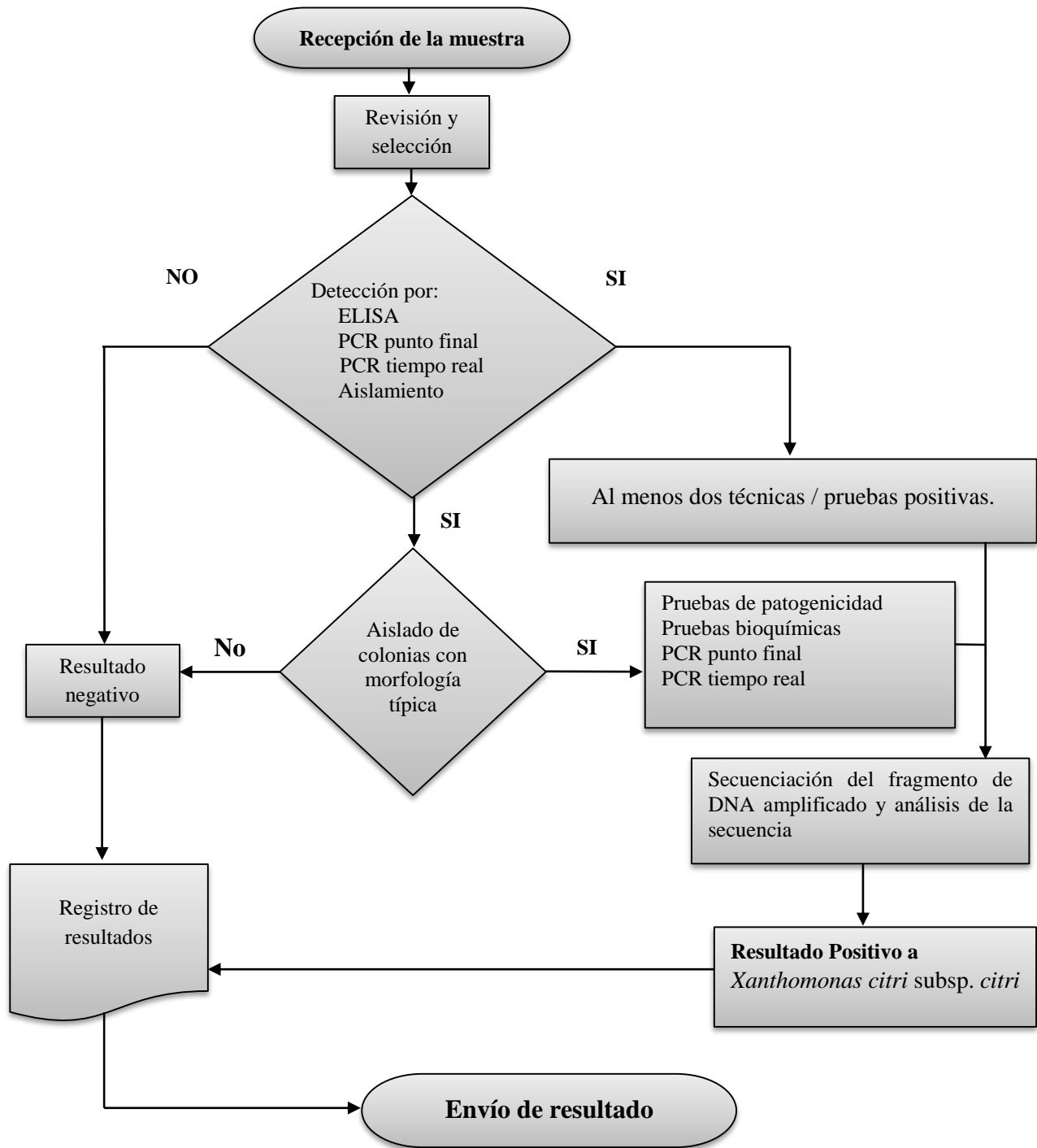
Especie: *citri*

Subespecie: *citri*

(Bergey's, 2017).

La bacteria se clasificaba en diferentes aislamientos (A, A*, A^w) de acuerdo al rango de hospedantes y análisis por PCR (Sun X., *et al.*, 2004).

2.3. Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

La detección de esta enfermedad implica el reconocimiento de los síntomas característicos, el aislamiento, la caracterización morfológica y bioquímica de las cepas, el empleo de técnicas serológicas y moleculares, y la determinación patogénica de los aislamientos. El diagnóstico debe basarse en un método integrado para dar mayor confiabilidad.

La emisión de un resultado positivo debe estar sustentado en al menos dos técnicas de detección con diferentes principios. En este caso, es indispensable realizar el aislamiento de la bacteria. Todas las técnicas deben realizarse por personal capacitado.

Se deberán tomar y enviar hojas (5 hojas), frutos (1 a 3 frutos) y tallos (1 a 2 tallos de 20 cm de longitud) con síntomas de la enfermedad; colocarlos cuidadosamente en toallas de papel secante e introducirlos en bolsas de plástico con cierre hermético. Identificar correctamente las muestras y enviarlas en hielera con geles refrigerantes a fin de evitar la oxidación de las mismas. El envío deberá realizarse el mismo día de la colecta, de no ser posible, las muestras deben resguardarse a 4°C y enviarse al día siguiente.

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 presencia de fenolización u oxidación excesiva, tampoco debe tener la presencia de organismos saprofitos.

Se observa si el material vegetal presenta síntomas característicos, el tejido vegetal óptimo para realizar la detección son las zonas en donde se confina y se concentra la bacteria.

3.1. Aislamiento y purificación de la bacteria

La obtención de cultivos puros de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* requiere de varios días y permite la verificación de patogenicidad, además de que es la prueba definitiva para confirmar la presencia de tan importante patógeno.

Para el aislamiento de la bacteria 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 y desinfectarlo 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 ensaye con 2 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 un asa bacteriológica estéril sembrar por estría cruzada en los medios de cultivo B de King, Agar Nutritivo (Anexo) o bien en los medios semiselectivos YDC, NGA o YPGA (Anexo). Incubar las cajas de 25-28 °C y examinarlas después de 2-5 días. Se aconseja el uso de por lo menos dos medios de cultivo a la vez.

Es importante utilizar extractos de muestras recién preparadas. El material vegetal debe analizarse lo antes posible, después de su obtención. Cuando los síntomas están muy avanzados, el tejido puede contener muy pocas células cultivables de *X. citri* subsp. *citri* y en el aislamiento pueden obtenerse placas saturadas de bacterias competidoras saprófitas o antagonistas.

Debe ponerse especial atención en evitar confundir las colonias de *X. citri* subsp. *citri* con colonias de *Pantoea agglomerans*, que también suele aislarse a partir de las lesiones de cancro y genera colonias morfológicamente similares. Por lo general *P. agglomerans* crece más rápido y sus colonias son de un amarillo más intenso que las de *X. citri* subsp. *citri* (IPPC, 2014).

Después de 2 a 3 días de incubación en el medio de cultivo B de King y Agar Nutritivo se presentan colonias circulares, con bordes regulares y lisos, de color amarillo pálido y de consistencia húmeda (Figura 2).



Figura 2. Colonias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en medio de cultivo B de King. Créditos: Laboratorio de Bacteriología.

Las colonias en medio YDC presentan un crecimiento mucho más mucoso y abundante, además de la típica pigmentación amarilla (Figura 3). Dichas características morfológicas corresponden a las del género *Xanthomonas* citadas por Goszczynska (2000).



Figura 3. Colonias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en medio YDC. Créditos: Laboratorio de Bacteriología.

3.1.1. Pruebas de patogenicidad en hojas de limón

Esta prueba consiste en la inoculación de una suspensión bacteriana de la cepa, o bien de extractos de muestras vegetales enfermas en tejido foliar de cítricos vulnerables, bajo condiciones adecuadas, con la finalidad de observar el desarrollo de pústulas incipientes de la enfermedad.

A partir de una cepa pura o sospechosa a *X. citri* subsp. *citri*, preparar una suspensión bacteriana en un tubo de ensaye con agua destilada estéril, en condiciones asépticas, a una concentración de 1×10^5 UFC/mL (comparar el patrón de turbidez con escala de McFarland).

Desinfectar 5 hojas de limón con hipoclorito de sodio al 1% durante 90 segundos, posteriormente enjuagar tres veces con agua destilada estéril y colocar cada hoja en cajas Petri con papel filtro estéril, dejar secar la superficie de las hojas en la campana de flujo laminar a temperatura ambiente. Inocular por inyección la suspensión bacteriana o macerado de tejido infectado en 4 hojas de limón; una de las hojas servirá como testigo y debe ser inoculada con agua destilada estéril. Mantener las hojas en incubación, a una temperatura de 28°C durante 12 días y con luz constante.

A partir del tercer día estudiar la formación de pústulas incipientes de aspecto blanquecino en las hojas con la ayuda de un microscopio. Después de 10 a 12 días si hay presencia de *X. citri* subsp. *citri* las células bacterianas se habrán multiplicado en el tejido vegetal y podrán ser observadas a simple vista (Figura 4), además de que podrán ser aisladas nuevamente para comprobar la patogenicidad (IPPC, 2014).

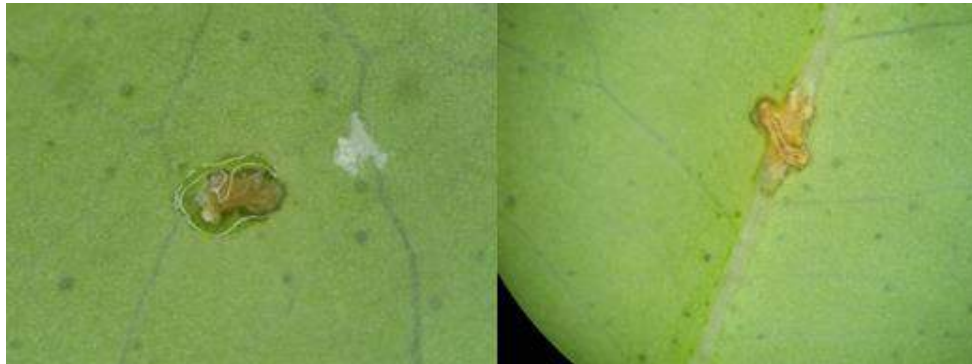


Figura 4. Pruebas de patogenicidad en hojas de limón. Después de 10 a 12 días se observan pustulas en hojas. Laboratorio de Bacteriología.

3.1.2. Pruebas bioquímicas

Para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, la cepa bacteriana pura se debe hacer crecer en presencia de determinadas sustancias nutritivas específicas y pasado cierto tiempo, se deben examinar los cambios químicos que se llevan a cabo. El siguiente cuadro muestra las pruebas que deben realizarse a los aislamientos obtenidos.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Prueba	Resultado
Tinción de Gram y/o Reacción de KOH	Gram negativa / KOH (-)
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	-
Reacción de O/F	+/-
Oxidasa	- o débil
Crecimiento mucóide en medio YDC	+
Reducción de nitratos	-
Licuefacción de gelatina	+
Licuefacción del gel pectato	+
Hidrólisis de:	
Almidón	+
Caseína	+
Tween 20*	+
Tween 80	+
Esculina	+
Producción de ácido a partir de:	
L-arabinosa*	+
L-rhamnosa*	+
Celobiosa*	+
Sacarosa*	+

(+)= Reacción positiva
 (-)= Reacción negativa
 (V)= Resultado variable

Fuentes: IPPC, 2014
 *Mohammed, *et. al.*, 2014

3.1.3. 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.

La base de datos MicroLog™ contiene aproximadamente 50 especies de bacterias fitopatógenas y realiza la identificación mediante el sistema GEN III, de bacterias Gram negativas y Gram positivas.

El sistema manual ofrece una capacidad de identificación básica, los resultados se evalúan de manera visual y son comparados en la base de datos MicroLog™ para el análisis del microorganismo. Este sistema requiere las placas Gen III (Cat. 1030), el fluido de inoculación IF-A (Cat. 72401) y el turbidímetro para medir la densidad del inoculo. A continuación, se describe el proceso de trabajo:

1. Sembrar las cepas bacterianas en medio de cultivo B de King o Agar Nutritivo, es importante que las cepas tengan máximo 48 horas de crecimiento, en el caso de géneros como *Xanthomonas* y *Clavibacter* donde su crecimiento es más lento, pueden inocularse con máximo 5 días de desarrollo. Es indispensable que las cepas se encuentren totalmente puras.
2. Antes de comenzar es necesario calibrar el turbidímetro, para ello se utiliza el testigo incluido 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 o asa bacteriológica y en condiciones asépticas, inocular la bacteria en el fluido IF-A. 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.
4. Una vez listo el fluido, verterlo en un reservorio estéril e inocular las placas GEN III, colocando 100 µL 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 tomarán como pruebas positivas, pozos con una coloración morado tenue se denominarán como borderline y pozos sin cambio de coloración son pruebas negativas (Figura 5). Los resultados deberán ser comparados en la base de datos MicroLog™ para conocer el género y especie de la bacteria.

6. Todos los materiales (hisopos, reservorios) y fluidos restantes deberán ser inactivados.

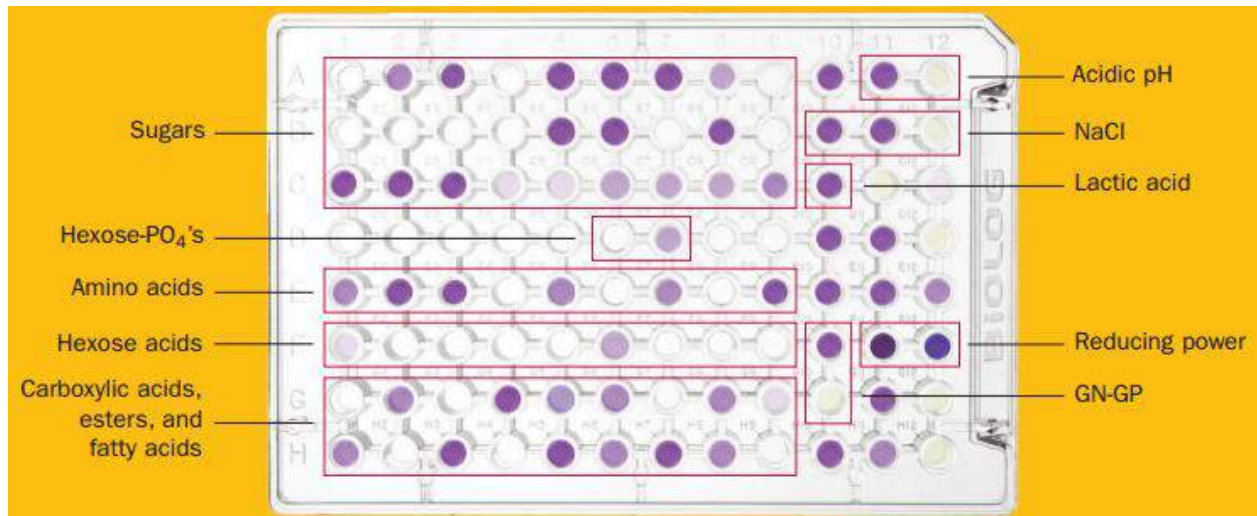


Figura 5. Placa GEN III del sistema BIOLOG®. Los resultados de las pruebas bioquímicas que se observarán (cambio de coloración en los pozos) en la placa. (https://biolog.com/wp-content/uploads/2018/10/Gen3_RevB52018.pdf).

3.2. Técnica de ELISA

Para la detección de *Xanthomonas citri* se utiliza la técnica serológica ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) que está basada en la relación inmunológica, entre anticuerpos que reconocen y se unen a un antígeno específico.

Para esta técnica se utiliza el Kit comercial de la marca Agdia® con número de catálogo BRA 92200/0500. Seguir el protocolo e instrucciones del fabricante.

3.2.1. 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.

3.3. Técnicas moleculares

3.3.1. Extracción de DNA total con el método de 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 µl 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 µl de etanol al 70 %. Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos.
- 11) Dejar secar la pastilla y resuspender en 50-100 µL de agua libre de nucleasas.

3.3.2. Extracción de DNA con kit Plant DNAzol®

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.

3.3.3. Verificación de la calidad del DNA mediante espectrofotometría

El DNA tiene una absorbancia máxima de 260nm, 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 adecuada para trabajar. Una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas.

- 1) Analizar la calidad y cantidad de DNA extraído en el espectrofotómetro (Nanodrop).
- 2) Realizar las diluciones correspondientes llevando la concentración del DNA de 20-50 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.

3.3.4. 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, 5µL 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 0.5µL por cada 100 mL de buffer TAE 1X. El manejo de este reactivo debe ser muy cuidadoso, 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 realizar una nueva extracción de DNA.

3.3.5. PCR punto final para la detección de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Debido a que se trata de una bacteria de importancia cuarentenaria a nivel mundial, existen varios juegos de primers utilizados para su diagnóstico.

Los primers 2 y 3 de Hartung *et al.* (1993) amplifican un fragmento de DNA polimórfico en la longitud de los fragmentos de restricción *Bam*HI que es específico para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; son los de uso más común debido a su buena especificidad y sensibilidad.

Los primers *J-pth1* y *J-pth2* amplifican un fragmento del gen de virulencia *pthA* en las cepas de *Xanthomonas* que producen los síntomas del cancro. Entre estas cepas se encuentran *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* y las cepas atípicas A* y A^W de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, detectadas en Florida (Cubero y Graham, 2002; IPPC, 2014). Se trata de primers universales, pero con menor sensibilidad que los de Hartung *et al.* (1993).

En los casos en que se sospeche la presencia de cepas atípicas A* y A^W de *X. citri* subsp. *citri* deben utilizarse ambos pares de primers (IPPC, 2014). Es recomendable también analizar las cepas sospechosas aisladas de material vegetal o en su caso la confirmación de las mismas, utilizando por lo menos dos juegos de primers (Cuadro 2).

Cuadro 2. Primers utilizados para la identificación de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Juego de primers	Referencia	Tamaño del amplicón (pb)	Detección de cepas de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Detección no específica (%)*	Límites de detección en material vegetal
J-pth1/J-pth2	Cubero y Graham (2002)	198	Todas las cepas	51	10 ⁴ ufc/ml
J-Rxg/J-Rxc2	Cubero y Graham (2002)	179	Todas la cepas	30	10 ⁴ ufc/ml
XACF/XACR	Park <i>et al.</i> (2006)	561	Todas las cepas	6**	No hay datos

Los datos de especificidad se toman de Delcourt *et al.*, (2013). *La detección no específica se refiere al porcentaje de *Xanthomonas* y saprofitos patógenos cuyas pruebas dieron positivo. **No dieron positivo con cepas saprófitas. Fuente: IPPC, 2014

Una confirmación adicional de la identificación puede obtenerse secuenciando los amplicones resultantes de la PCR y comparando sus secuencias con las de las cepas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, depositadas en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) (IPPC, 2014).

- 1) Descongelar los reactivos que se enlistan a continuación y preparar la mezcla de reacción con las cantidades indicadas en el Cuadro 3 empleando los primers correspondientes en el Cuadro 4.

Cuadro 3. 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	50 μM	0.5
Iniciador F	10 pmol/ μL	0.4 μM	1
Iniciador 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

Cuadro 4. Secuencias de los primers para la detección de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	J-Rxg	5-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3	179
Antisentido	J-RXc2	5-CAAGTTGCCTCGGAGCTATC-3	
Sentido	J-pth1	5-CTTCAACTCAAACGCCGGA-3	198
Antisentido	J-pth2	5-CATCGCGCTGTTCTGGGAG-3	
Sentido	XACF	5-CGTGCAATACGATTGGAAC-3	461
Antisentido	XACR	5-CGGAGGCATTGTGGAAGGAA-3	

Fuente: IPPC, 2014

- 2) Programar el termociclador de acuerdo a las condiciones establecidas para cada juego de primers empleados (Cuadros 5 y 6). En el presente protocolo se estandarizaron las condiciones solo para los primers: XAFC/XACR, J-Rxg/JRXc2 y J-pth1/J-pth2, sin embargo, los demás juegos de primers se muestran de manera informativa.

Cuadro 5. Programa de termociclaje para los primers XACF/XACR.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5:00	1
94	0:15	30
60	0:30	
72	0:30	
72	7:00	1

Cuadro 6. Programa de termociclaje para los primers J-Rxg/J-RXc2 y J-pth1/J-pth2.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5:00	1
93	0:30	40
58	0:30	
72	0:45	
72	10:00	1

Fuente: IPPC, 2014

Nota: el protocolo fue estandarizado en un equipo BIO-RAD modelo T 100™ Thermal Cycler.

- Al concluir el programa, tomar 10µL 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 10µL 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.

Una prueba más puede ser utilizada para la identificación de esta bacteria, tanto en tejido vegetal como cuando se tienen aislamientos de cepas sospechosas. Se trata de la utilización del juego de primers XgyrBF/XgyrBR, que amplifica el gen de la girasa del genero *Xanthomonas*. Del mismo modo los amplicones resultantes deben enviarse a secuenciar para constatar la presencia de la bacteria.

Cuadro 7. Primers para el gen de la girasa de *Xanthomonas* sp.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	XgyrBF	5'- AAGCAGGGCAAGAGCGAGCTGTA - 3'	500-600
Antisentido	XgyrBR	5'- CAAGGTGGCTGAAGATCTGGTC - 3'	

Fuente: Parkinson *et al.*, 2007

Cuadro 8. Programa de termociclaje para los primers XgyrBF/XgyrBR.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	4:00	1
95	0:30	35
50	0:30	
72	0:45	
72	7:00	1

3.3.6. PCR tiempo real para la detección de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

La qPCR (quantitative polymerase chain reaction) es una variante de la PCR empleada para amplificar y cuantificar simultáneamente de forma absoluta el producto de la amplificación del DNA, cuantifica la fluorescencia de una molécula reportera (sonda), la cual es medida a lo largo del tiempo de reacción. Los primers para la técnica de PCR en tiempo real están diseñados a partir de secuencias del gen *pth*, un importante gen de virulencia utilizado en otros estudios para detectar específicamente cepas de *X. citri* subsp. *citri* (Cubero y Graham, 2005; IPCC, 2014).

Con esta técnica se consigue una especificidad similar a las de los primers del gen *pth* utilizados en la PCR convencional; asimismo, permite la detección fidedigna de aproximadamente 10 UFC de *X. citri* subsp. *citri* a partir de lesiones de hojas enfermas y de una dilución de células cultivadas (Mavrodieva *et al.*, 2004; IPCC, 2014).

- 1) Descongelar los reactivos que se enlistan a continuación y preparar la mezcla de reacción con las cantidades indicadas en el Cuadro 9, empleando los primers y sonda correspondientes (Cuadro 10).

Cuadro 9. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tiempo real.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer de PCR	10X	1X	2.2
MgCl ₂	50 mM	4 mM	1.76
Mezcla de dNTP's	10 mM	0.30 µM	0.6
Iniciador F	10 pmol/ µL	0.30 µM	0.6
Iniciador R	10 pmol/ µL	0.30 µM	0.6
Taq DNA polimerasa	5 U/µL	0.09 U/µL	0.4
Sonda	10 pmol/ µL	0.04 µM	0.1
DNA	20 ng/µL	80 ng/ µL	4
Agua grado PCR			11.64
		Volumen final	22

Cuadro 10. Primers J-pth3 / J-pth4 para tiempo real.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')
Sentido	J-pth3	5' - ACC GTC CCC TAC TTC AAC TCA A -3'
Antisentido	J-pth4	5' - CGC ACC TCG AAC GAT TGC -3'
Sonda	J-Taq pth2	6FAM- 5' ATG CGC CCA GCC CAA CGC -3'-TAMRA

Nota: utilizar tubos o placas ópticas para qPCR de acuerdo al tipo/marca de termociclador utilizado. Las condiciones de este ensayo se estandarizaron en el termociclador marca Bio-Rad CFX-96 real-time thermocycler (Bio-rad Laboratories1).

2) Programar el termociclador de acuerdo con los primers del Cuadro 11.

Cuadro 11. Programa de termociclaje para los primers J-pth3 / J-pth4.

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
95	15:00	1
95	0:15	40
60	1:00	

3.3.7. 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 tejido de cítricos 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.

3.3.8. Interpretación de resultados de PCR punto final

Primers XACF y XACR propuestos por Park *et al.*, 2006.

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

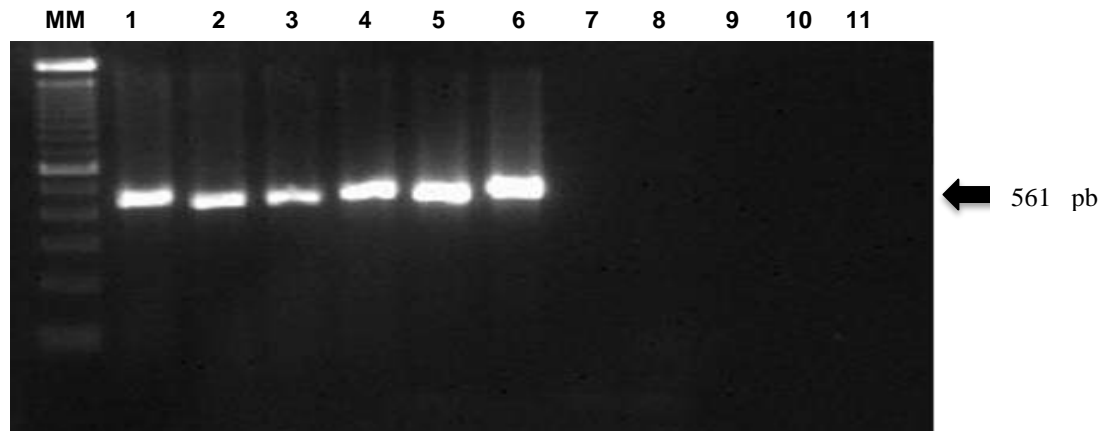


Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR con los primers XACF y XACR. MM: Marcador Molecular 100pb (Invitrogen); Carril 1 control positivo; Carriles 2-6 muestras vegetales positivas; Carril 7-9 muestras vegetales negativas; Carril 10 -11 control negativo.

Primers J-pth1/J-pth2 y J-Rxg/J-RXc2 propuestos por Cubero y Graham 2002.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE (Tris-acetate-EDTA) 1x, a 100 Volts por 60 minutos (Figura 7).

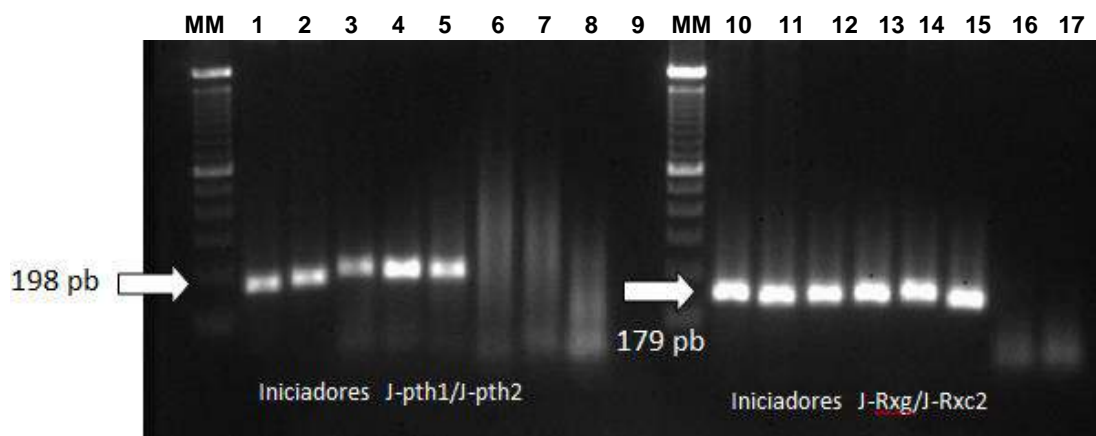


Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR con los primers J-pth1/J-pth2 y J-Rxg/J-RXc2. MM: Marcador Molecular 100pb (Invitrogen); Carril 1 control positivo; Carriles 2-5 muestras vegetales positivas; Carril 6-8 muestras vegetales negativas; Carril 9 control negativo. Carril 10 control positivo; Carriles 11-15 muestras vegetales positivas; Carril 16 muestra vegetal negativa; Carril 17 control negativo.

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo genera una banda de 461 pb, 198 pb y 179 pb, para los primers XACF/XACF, J-pth1/J-pth2 y J-Rxg/J-RXc2 respectivamente.

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

3.3.9. Interpretación de resultados de qPCR

El análisis y cuantificación de los datos se realiza en la Fase Exponencial de la reacción.

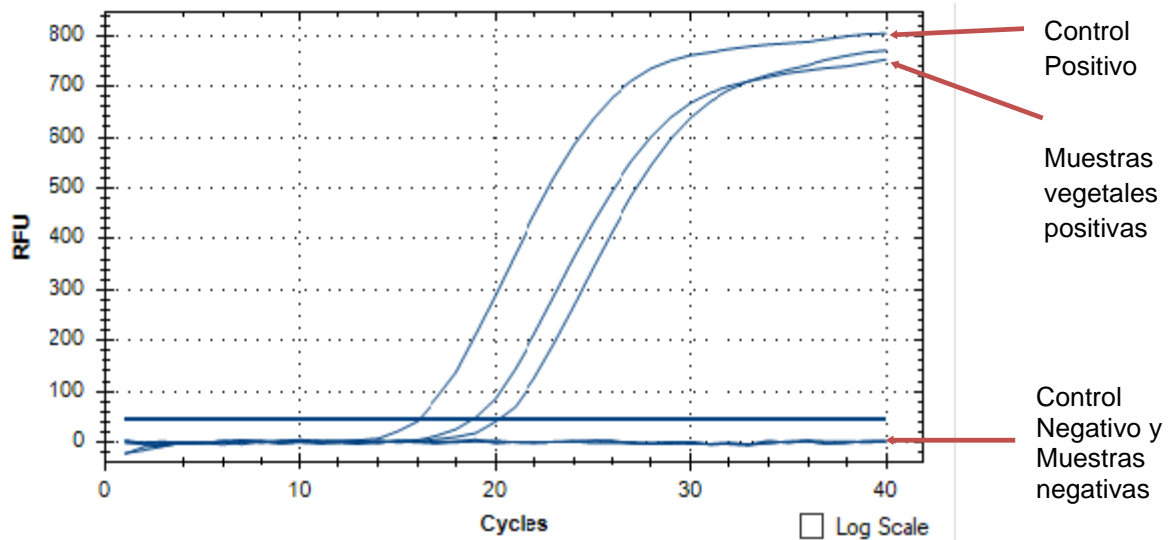


Figura 8. Curva de cuantificación para la detección de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en PCR tiempo real.

Resultado negativo: Muestras con valores de FAM Cq=0.00 o >35.00

Resultado positivo: Muestras con valores de FAM Cq <35.00

Muestras con valores de FAM Cq en el rango de 32.0 a 35 necesitan confirmación, mediante una segunda corrida.

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

El control positivo y las muestras positivas generan una curva de amplificación con los primers J-pth3 / J-pth4 específicos a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, así como se presenta en la figura 8.

El control negativo de matriz y el control negativo de reactivos no deben de generar una curva de amplificación con los primers J-pth3 / J-pth4.

3.4. Identificación de plaga

El requisito mínimo de identificación de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, es que al menos dos pruebas deben ser positivas, con sus controles correspondientes. Esto debido a que la bacteria muestra una alta variabilidad genética.

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 original debe ser resguardada a 4°C hasta que el proceso de diagnóstico finalice.
- 2) El DNA obtenido de material vegetal y cepas bacterianas debe ser almacenado a -20°C o bien a -80°C, debidamente identificado.
- 3) Cuando aplique las cepas bacterianas deberán 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, deberán ser inactivados en autoclave a 121°C y 15lb durante 40 minutos.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.bacteriologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 01 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).

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
- Coletta-Filho, H. D., Takita, M. A., Souza, A. A., Neto, J. R., Destefano, S. A. L., Hartung, J. S. & Machado, M. A. 2006. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2): 279–285.
- Cubero, J. & Graham, J. H. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1257–1264.

- Delcourt S. *et.al.*, (2013). Revisiting the Specificity of PCR Primers for Diagnostics of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by Experimental and Silico Analyses. *Plant Disease* 97: 373-378. American Phytopathological Society.
- Dewdney M. M., and Graham, J. H. 2012. Florida citrus pest management guide: citrus canker. University of Florida. IFAS Extension. 4p.
- DGSV-CNRF. 2017. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Ficha de categorización. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF), SAGARPA-SENASICA. 9 p.
- Graham, J, Gottwald, T, Riley, T, Brice, M. 1992. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology* 82:452- 457.
- Goszczyńska T. 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology. SAFRINET. Switzerland.
- Gottwald T R., Graham J H, and Schubert, T S. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. Disponible en [http:// www.plantmanagementnetwork .org/pub/php/review/citruscanker/](http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/) (consulta 19 diciembre 2017).
- Hartung, J. S., Daniel, J. F., Pruvost, O. P. y Civerolo, E. L. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 1143–1148.
- Mavrodieva, V., Levy, L. & Gabriel, D. W. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, 94: 61–68.
- Mohammed A., Widyawan A., Saleh A., Ibrahim Y. 2014. Distribution and pathotype of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* recovered from south-western region of Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 8(7), pp. 673-679, 12 February, 2014.
- Park, D., Hyun, J., Park, Y., Kim, J., Kang, H., Hahn, J. & Go, S. 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiological Research*, 161(2): 145–149.
- Parkinson N., Aritua V., Heeney J., Cowie C., Bew J. and Stead D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2007), 57, 2881-2887.
- SENASICA, 2016. Cancro de los cítricos (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) Dirección General de Sanidad Vegetal – Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Ficha Técnica No. 33 28 p.
- Sun, X., Stall, R. E., Jones, J. B., Cubero, J., Gottwald, T. R., Graham, J. H., Dixon, W. D., Schubert, T. S., Chaloux, P. H., Stromberg, V. K., Lacy, G. H. & Sutton, B. D. 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. *Plant Disease*, 88(11): 1179–1188.
- IPPC. 2014. NIMF 27. Annex 6 to ISPM 27:2006- PD: 6 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* IPPC (International Plant Protection Convention).

Zerki M., Dewdney M., Burrow J., Roberts P. 2015. Identificación en campo de síntomas de cancro de los cítricos y los procedimientos de descontaminación. Departamento de Plant Pathology, UF/IFAS Extensión. Universidad de Florida, 5 p.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Gabriel *et al.*, 1989) Schaad *et al.*, 2007 (Cancro bacteriano de los cítricos) [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
Sulfato de Magnesio heptahidratado	1.5 g
Fosfato de Potasio dibásico	1.5 g
Agar	15.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio YDC

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Carbonato de Calcio	1.0 g
Agar	1.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio NGA

Reactivo	Cantidad
Agar Nutritivo	16.0 g
Glucosa	0.1 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio YPGA

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	10.0 g
Bacto-Peptona	5.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	1.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio de almidón

Reactivo	Cantidad
Almidón soluble	10.0 g
Agar	16.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio para hidrólisis de esculina

Reactivo	Cantidad
Bacto-peptona	10.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato Férrico	0.5 g
Citrato sódico	1.0 g

Esterilizar durante 20 minutos a 115 lb de presión.

Medio de Hugh y Leifson

Reactivo	Cantidad
Peptona	2.0 g
Cloruro de Sodio	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 se encuentre a una temperatura aproximada de 50 °C. Vaciar el medio en tubos de ensaye estériles.

Medio de para la producción de ácido a partir de carbohidratos

Reactivo	Cantidad
Peptona	10.0 g
Hidrato de Carbono	10.0 g
Azul de Bromotimol	0.03 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.

8.2 Soluciones amortiguadoras

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 1L.

Buffer de corrida naranja G 6X

Reactivo	Cantidad
Naranja G (O3756 Sigma-Aldrich)	60 mg
Glicerol (G9012 Sigma-Aldrich)	18 mL
Agua	40 mL

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