



Aislamiento del agente causal de la mancha bacteriana de chile en las regiones productoras de Jalisco, Zacatecas y Michoacán

Consuelo López-Vielma | Alejandro Solís-Sánchez | Evangelina Quiñones-Aguilar
| Joaquín Qui-Zapata | Gabriel Rincón-Enríquez

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

correo-e: grincon@ciatej.mx

Resumen

El cultivo de chile es importante en México desde los puntos de vista de diversidad biológica, económico, cultural, nutricional y como fuente generador de riqueza. Sin embargo, esto último se encuentra amenazado por diversos problemas entre los que destacan los fitosanitarios. En particular, la mancha bacteriana de chile es un problema que afecta diversas regiones importantes de México. Con el fin de iniciar un programa de control biológico de dicha enfermedad el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar el agente causal de la mancha bacteriana en tres regiones productoras de chile. Los aislamientos se realizaron sobre medio semi-selectivos (YCDA) y su caracterización fue realizada mediante crecimiento en medio xan-D, ITS y amplificación del gen *esta*. Se realizaron un total de 110 aislamientos bacterianos sobre medio YCDA. 22 de esos aislamientos crecieron sobre medio con Tween-80, lo cual sugirió que se trataba de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Mediante la caracterización de ITS, el gen *esta* y un análisis estadístico de conglomerados, se determinó que seis aislamientos pertenecen a Xcv, potencialmente implicados en la enfermedad mancha bacteriana del chile.

Palabras clave: mancha bacteriana, *Xanthomonas* sp, ITS, gen hidrólisis *esta*, Tween-80.

Introducción

La mancha bacteriana provocada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (Chew, 2008) afecta a cultivos de chile a lo largo de todas las regiones productoras de México. La enfermedad se manifiesta con manchas necróticas y halos cloróticos alrededor de la necrosis. Igualmente, la presencia de la bacteria ocasiona la defoliación de las plantas, lo cual implica que los frutos sean expuestos al sol y por tanto son quemados, lo que provoca enormes pérdidas económicas.

Jalisco, Michoacán y Zacatecas son algunos estados importantes en la producción de chile y que han presentado la enfermedad de mancha bacteriana. El aislamiento del agente causal en estas zonas donde se presenta la enfermedad ayudaría a estudiar la diversidad bacteriana de esas regiones para posteriormente implementar estrategias de control biológico mediante el empleo de virus (bacteriófagos) que ataquen a las bacterias implicadas en la enfermedad. El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar el agente causal de la mancha bacteriana mediante técnicas de ITS, gen *estA* y medios selectivos para Xcv.

Metodología

Se colectaron muestras de tejido en seis sitios de la localidad de La Plata, en el municipio de Mascota, Jalisco; tres sitios de las localidades de Luis Jaramillo y El Pozo (1 y 2), del municipio de Trancoso, Zacatecas y un sitio del municipio de Yurécuaro, Michoacán. Las muestras se tomaron de plantas enfermas por mancha bacteriana, se muestrearon un total de diez sitios.

Los aislamientos se realizaron tomando partes afectadas de tejido y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril (121 °C durante 20 min). La muestra de tejido fue macerada en un mortero estéril, al cual previamente se agregaron 2 mL de agua destilada

estéril. Se recuperó 1 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo con 9 mL de agua estéril. Luego se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} , después se tomaron 100 μ L de cada dilución para sembrarse sobre medio de cultivo extracto de levadura-dextrosa (YCDA). Las cajas con las diluciones bacterianas fueron incubadas durante 48 h a 28 °C. La purificación de las colonias se realizó con base a la coloración amarilla y se resembraron en YCDA por estriado.

Para la caracterización de los aislamientos se empleó medio selectivo Xan-D propuesto por Lee *et al.* (2009), el cual contiene Tween-80 y el género *Xanthomonas* que es capaz de crecer por poseer el gen *estA* que codifica por la proteína EstA, capaz de hidrolizar al Tween-80; las colonias que presentan coloración verde amarillenta y un halo de hidrólisis después de cuatro días a 28 °C fueron consideradas como cepas potencialmente relacionadas a Xcv.

Los diferentes aislamientos bacterianos positivos a Xan-D fueron inoculados en medio de cultivo NB (Nutrient Broth) y se incuban a 28 °C y 200 rpm durante 48 h. De cada aislamiento se tomaron 1.5 mL de medio de cultivo líquido y se realizó la extracción de ADN mediante la metodología descrita por Chen y Kuo (1993). La concentración de ADN se cuantificó por espectrofotometría mediante un nanoespectro GenovaNano (JENWAY). Con el fin de analizar los ITS en el genoma de *Xanthomonas*, se realizó un análisis *in silico* para determinar el tamaño de fragmento esperado de la amplificación de la región intergénica de los genes ribosomales 16S y 23S (ITS) de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cepa 85-10.

La caracterización molecular de los aislamientos se realizó mediante PCR, amplificando la región ITS 16S y 23S (Jensen *et al.*, 1993), a través de los oligonucleótidos G1 (GAAGTCGTAACAA GG) y L1 (CAAGGCATCCACCGT); y la región del gen *estA* con el empleo de los oligonucleótidos Xc-lip-F2 (TATGTGATG GTGCCGACCATTC) y Xc-lip-R2 (GGA CTTCGCGGTCCACGT-CGTAGC) (Lee *et al.*, 2009). Se usaron 20 ng de ADN en reacciones de 12.5 μ L. Las muestras se migraron en un gel de agarosa a 0.8% a 85 V durante 1 h y al

1% con GelRed®. Como control positivo se utilizó a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cepa BV5-4a (861) (Canteros *et al.*, 1989; 1995).

Resultados y discusión

Se realizaron un total de 110 aislamientos de las muestras de tejido colectadas en los sitios de muestreo las tres zonas productoras de Chile de Jalisco, Michoacán y Zacatecas. Mediante la prueba en medio Xan-D se determinó que sólo 22 aislamientos presentaron halo de hidrólisis y coloración verde amarillenta, típica de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (figura 1).

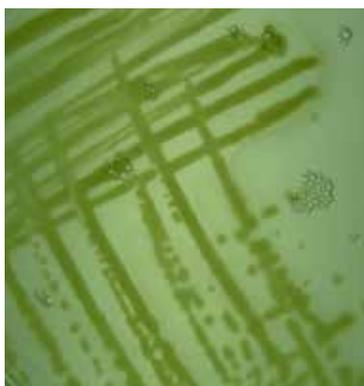


Figura 1. Crecimiento de aislamientos bacterianos creciendo sobre medio Xan-D. Nótese el color amarillo verdoso de las colonias bacterianas y sus halos de inhibición.

Mediante el análisis con ITS se determinó a diez aislamientos capaces de hidrolizar el Tween-80 como potenciales cepas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (figura 2). Mediante el análisis *in silico* del genoma de la cepa de *X. campestris* pv. *vesicatoria* cepa 85-10 se determinó que sólo tenía dos operones de genes ribosomales, los cuales poseen un espacio intergénico de 583 pb. La amplificación de los ITS en los aislamientos capaces de hidrolizar el Tween-80 mostró aislamientos con fragmentos similares en longitud a los esperados de acuerdo al análisis *in silico* y a los presentados en la cepa BV5-4a de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (figura 2).

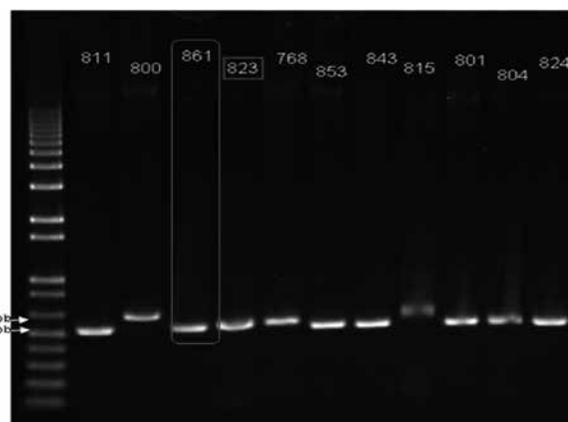


Figura 2. Amplificación del fragmento ITS (583 pb), típico de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Carril 861 corresponde a la cepa BV5-4a de Xcv. El marcador corresponde a 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Se muestran ocho aislamientos que amplificaron la región ITS, correspondiente a la región de Xcv: 801, 804, 811, 823, 824, 843, 853 y 768 (figura 2). El fragmento amplificado por Lee *et al.* (2009) para el gen *estA* fue de 777 pb, sin embargo, el tamaño del fragmento no corresponde a cepas aisladas en México, lo cual pudiera ser explicado por divergencia del gen *estA*.

Por otro lado, al comparar la longitud del fragmento amplificado Xcv cepa BV5-4a (cepa de referencia 861), mostró también divergencia respecto a lo reportado por Lee *et al.* (2009), lo cual sugiere también una posible divergencia de este gen, dado que la cepa de referencia tiene como origen Argentina, mientras las evaluadas por Lee *et al.* (2009) son originarias de Taiwán y Europa. Los aislamientos 811 y 801 corresponden al mismo sitio de muestreo, mientras que el 824 fue de un sitio distinto, sin embargo, todos los amplificados son similares a la cepa de referencia BV5-4a (figura 3).

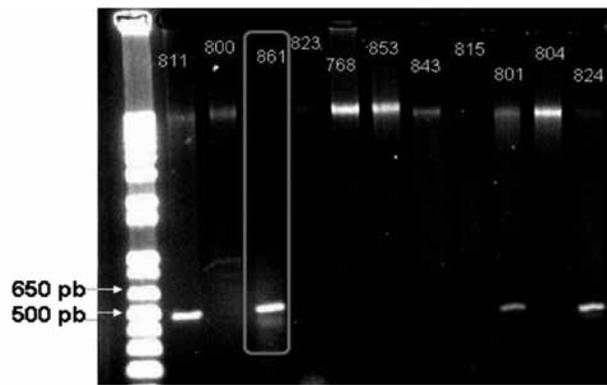


Figura 3. Amplificación del gen *estA* (777 pb) típico de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Carril 861 corresponde a la cepa BV5-4a de Xcv. El marcador de peso molecular empleado fue 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Finalmente, la figura 4 muestra un análisis de conglomerados de los ITS e indica que seis aislamientos son similares a Xcv. Las cepas identificadas como positivas serán analizadas mediante ITS-RFLP y posteriormente enviadas a secuenciar su gen 16S. Esta identificación es la primera etapa de un trabajo mayor en el que se pretende aislar bacteriófagos para ser utilizados como medida de control en cultivos de chile que presenten mancha bacteriana.

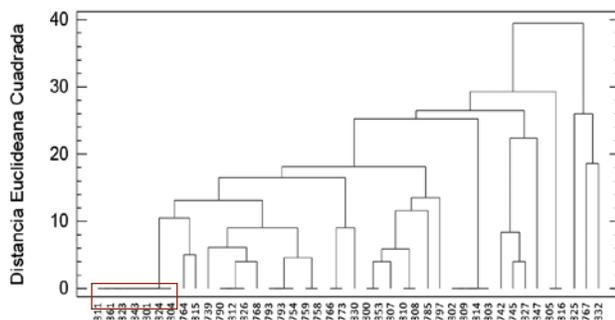


Figura 4. Relaciones de 42 aislamientos bacterianos implicados en la mancha bacteriana de Chile provenientes de tres regiones productoras de Chile de los estados de Jalisco, Zacatecas y Michoacán, a partir de datos ITS-PCR, mediante el método jerárquico aglomerativo de agrupación promedio (UPGMA). En el círculo se señalan los aislamientos similares a la cepa de referencia BV5-4a de Xcv (861).

Conclusiones

Los aislamientos 801, 804, 811, 823, 824 y 843 mostraron características similares a la cepa de referencia Xcv cepa BV5-4a (861): colonias verde amarillentas

en medio Xan-D con halos de hidrólisis, amplificaron la región de ITS aproximada de 583 pb y amplificaron el gen *estA* similar a BV5-4a, por lo cual estos aislamientos pueden ser considerados como cepas de Xcv.

Agradecimientos

A la doctora Blanca Isabel Canteros del INTA-Argentina por la donación de la cepa BV5-4a de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Igualmente al doctor Saúl Fraire Velázquez de la UAZ por el apoyo en el muestreo de Zacatecas. Consuelo López-Vielma agradece al Conacyt por la beca para cursar estudios de maestría en el PICyT del CIATEJ.

Referencias

- Canteros, B.I., Minsavage, G.V., Pring, D.R., Stall, R.E. (1989). Plasmid encoded copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (pp. 351-356). In Z. Klement (Ed.), *A Report on the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (ICPPB)*, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.
- Canteros, B.I., Minsavage, G.V., Jones, J.B., Stall, R.E. (1995). Diversity of plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 85:1482-1486.
- Chen, W., Kuo, T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acid Research*, 21(9):2260.
- Chew, M. (2008). *Principales enfermedades del Chile* (Capsicum annum L.). Matamoros: SAGARPA.
- Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 945-952.
- Lee, Y., Sung, A., Liu, T., Lee, Y. (2009). Combination of Chromogenic Differential Medium and *estA*-Specific PCR for Isolation and Detection of Phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24): 6831-6838.