

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Xanthomonas albilineans* (Ashby) DOWSON EN VENEZUELA, AGENTE CAUSAL DE LA ESCALDADURA FOLIAR DE LA CAÑA DE AZÚCAR¹

MOLECULAR DIAGNOSIS OF *Xanthomonas albilineans* (Ashby) DOWSON IN VENEZUELA, THE CAUSAL AGENT OF LEAF SCALD OF SUGARCANE¹

Beatriz Alvez*, Jeismar Carballo***, Guillermina Alonso** y Maira Oropeza**

¹Trabajo financiado por el proyecto de la Ley Orgánica de Ciencia Tecnología e Innovación (LOCTI), a través de la empresa GANBARO C.A y Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la UCV, otorgado a GA (03-7327).

*Estudiante de postgrado en Botánica y **Profesoras. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Ciencias. Instituto de Biología Experimental. Caracas. Venezuela. ***Investigadora. IDEA. Departamento de Ciencia y Tecnología para la Salud. Correo electrónico: maira.oropeza@ciens.ucv.ve

RESUMEN

La escaldadura foliar (EF) causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, es una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo de la caña de azúcar, *Saccharum* sp., ocasionando pérdidas estimadas entre 90-100% de la producción. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés PCR) como herramienta de diagnóstico de fitopatógenos se incrementó a nivel mundial dada su rapidez, sensibilidad y especificidad. Dada la importancia que tiene esta enfermedad en Venezuela, se llevó a cabo el diagnóstico de la bacteria a partir de plantas de caña de azúcar sintomáticas, empleando pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares. Utilizando diversos métodos de purificación se obtuvieron aislados bacterianos, los cuales se sometieron a análisis fenotípicos y bioquímicos, así como a ensayos de PCR con iniciadores específicos y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (siglas en inglés ERIC-PCR). Con el método de macerado de hojas se obtuvieron 50 aislados, de los cuales 14 se seleccionaron por pruebas microbiológicas y bioquímicas, de estos, sólo tres cepas fueron identificadas como *X. albilineans*. Este resultado se corroboró al obtener por PCR la banda esperada de 360 pb con los iniciadores específicos sólo en estos tres aislados. Finalmente, con la técnica de genotipificación ERIC-PCR se obtuvieron patrones de bandas para las bacterias identificadas como *X. albilineans* que no son similares a los descritos por otros autores en otras regiones del mundo. Este trabajo representa la primera genotipificación de aislados de *X. albilineans* en Venezuela.

Palabras Clave: *Saccharum* sp.; pruebas bioquímicas; PCR; genotipificación.

SUMMARY

Leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans*, is one of the most important diseases in sugarcane, *Saccharum* sp., which causes serious economical losses estimated between 90-100%. The use of PCR as a diagnostic tool for plant pathogens has increased because of its speed, sensitivity and specificity. Given the importance of leaf scald in Venezuela, in this work we carried out the diagnosis of *X. albilineans* from symptomatic sugarcane plants, using microbiological, biochemical and molecular methods. Bacterial isolates were obtained using different methods of purification. These isolates were then subjected to phenotypic and biochemical analysis, PCR with specific primers and ERIC PCR. With the method of macerated leaves 50 isolates were obtained, out of which 14 were selected for biochemical tests. From these 14 isolates only three strains were identified as *X. albilineans* by microbiological and biochemical tests. These results were confirmed by PCR by obtaining the expected band of 360 bp using specific primers. Finally, the ERIC-PCR banding patterns obtained for the isolates identified as *X. albilineans* were found to be different to those described by other authors in other regions. This work represents the first genotyping assay of isolates of *X. albilineans* in Venezuela.

Key Words: *Saccharum* sp.; genotipification; biochemical tests; PCR.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar, *Saccharum* sp., es uno de los principales rubros agrícolas que se cultivan en Venezuela, no solo por los volúmenes de producción, sino, por las áreas sembradas. Además, es importante fuente nutricional de carbohidratos (Cova *et al.*, 2006). La transcendencia de este cultivo puede ser atribuida a sus múltiples usos, principalmente como materia prima en la producción de azúcar y alcohol (Silva *et al.*, 2005).

En este cultivo, las enfermedades constituyen uno de los principales factores que afectan la producción azucarera nacional. En los últimos años aumentaron las poblaciones de nuevos patógenos que lo afectan, además, se diseminaron los que existían (Cova *et al.*, 2006). La escaldadura foliar (EF) causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, es una de las enfermedades de mayor relevancia para este cultivo, por sus efectos sobre el rendimiento, la calidad de los jugos y las elevadas pérdidas que ocasiona en su fase aguda, estimadas entre el 90-100% de la producción (Ricaud y Ryan, 1989; Hoy y Grisham, 1994).

En Venezuela, la enfermedad se detectó en el año 1968, en un material (variedad B60321) proveniente de la Estación Experimental de Barbados, con los síntomas característicos de la EF de la hoja. Posteriormente, en el año 1973 se advirtió por primera vez los síntomas de la enfermedad en plantaciones de los estados Portuguesa y Aragua. Con base en los síntomas observados en campo, en el comportamiento de la bacteria en medios de cultivos selectivos, observaciones al microscopio óptico y pruebas de patogenicidad (Ordosgoitti *et al.*, 1977) se determinó que el responsable de dicha sintomatología era *X. albilineans*.

La presencia de este patógeno en los cañaverales venezolanos fue confirmada por Jiménez y Contreras (2004) en los estados Lara y Yaracuy, cuando observaron plantas con estrías blanquecinas de bordes bien definidos a nivel foliar y haces fibrovasculares de coloración rojiza en los cortes longitudinales de tallos. Mediante estos síntomas, pruebas de patogenicidad, bioquímicas y morfológicas, los autores identificaron al agente casual como *X. albilineans*.

Por otro lado, Carballo *et al.* (2007) estudiaron el efecto de esta infección en la estructura anatómica de la hoja de la caña de azúcar, variedad R8 85-554b; encontrando una disminución notable en el número de cloroplastos de la vaina vascular y en las células del mesófilo, con respecto al control (hojas sanas). Estos resultados concuerdan

con el efecto celular inducido por la bacteria, ya que se reporta que inhibe la replicación del ácido desoxirribonucleico ribosómico (ADNr) plastídico y, por lo tanto, la diferenciación y maduración de cloroplastos; lo cual se refleja en una clorosis de la vaina vascular que origina un efecto macroscópico visto en forma de una línea clara a lo largo de la lámina foliar, del cual se deriva el nombre de la enfermedad (Birch, 2001).

En el 2008, Jiménez y Contreras detectaron *X. albilineans* mediante la técnica ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indirecta y medios selectivos. Para el 2009, los mismos autores evaluaron la respuesta de 11 variedades de plantas de caña de azúcar frente a la EF, empleando dos métodos de inoculación; uno por inyección de una suspensión bacteriana en el nudo del esqueje y el otro por colocación de un algodón impregnado en la suspensión bacteriana en uno de los extremos del esqueje. Este último método fue el que dio mejores resultados, logrando identificar cuatro variedades altamente susceptibles entre las evaluadas.

X. albilineans presenta forma de bastón de 0,25-0,30 x 0,60-1,00 μm , es móvil, con un flagelo polar, es Gram negativa, mucoide, aeróbica y exhibe un tiempo de generación de 3 a 7 d, a una temperatura óptima de crecimiento de 27 °C y máxima de 35 °C; posee resistencia intrínseca a diferentes antibióticos como la novobiocina y la cefalexina (Birch, 2001; Davis *et al.*, 1994; Schaad *et al.*, 2001). El aislamiento *in vitro* en medios de cultivo ha tenido limitaciones prácticas debido a la naturaleza mucoide del patógeno, su lento crecimiento y exigencias nutricionales (Davis *et al.*, 1994).

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés PCR) como herramienta de diagnóstico de *X. albilineans* se incrementó dada su rapidez, sensibilidad y especificidad, para lo cual se han utilizado iniciadores como los propuestos por Honeycutt *et al.* (1995) quienes diseñaron el iniciador ALA4, que en combinación con el iniciador ILE2 permiten amplificar un segmento de 70 pb, específico para el diagnóstico de *X. albilineans*, aplicado en plantas enfermas y con infecciones latentes. Además, Pan *et al.* (1997) propusieron el uso de los iniciadores ALA4 y L1 que permiten amplificar un fragmento de 360 pb de la región espaciadora interna transcrita (por sus siglas en inglés ITS) del ADN en aislamientos representativos de los diferentes serovares.

Las técnicas moleculares pueden ser empleadas para clasificar a los microorganismos en grupos taxonómicos o clonales estrechamente relacionados o divergentes.

Entre estas metodologías se encuentra ERIC-PCR (Consenso intergénico repetitivo de enterobacterias, por sus siglas en inglés), que utiliza iniciadores que reconocen las secuencias conservadas ERIC (secuencias extragénicas, cortas, repetidas y esparcidas en el genoma bacteriano), permitiendo amplificar regiones correspondientes a los segmentos que separan dichas secuencias. Así, el polimorfismo generado dependerá de la variedad en la distribución de las repeticiones y de la distancia entre las secuencias ERIC dentro del genoma (Vilchez y Alonso, 2009).

La combinación de ensayos bioquímicos con pruebas moleculares se utilizó con éxito en nuestro país para la caracterización de especímenes bacterianos, aplicados a muestras hospitalarias (Rivas *et al.*, 2006; Araque *et al.*, 2008); aunque para la identificación de este patógeno en específico se emplearon técnicas microbiológicas, pruebas de patogenicidad, microscopía electrónica y pruebas serológicas, entre otras; que están siendo desplazadas por las técnicas moleculares debido a las ventajas que estas últimas confieren.

Dada la importancia que tiene esta enfermedad en los cultivos de caña de azúcar en Venezuela, este estudio tuvo como objetivo llevar a cabo el diagnóstico molecular de *X. albilineans* a partir de plantas de caña de azúcar sintomáticas e identificar los aislados por características morfológicas, bioquímicas y pruebas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias a partir de plantas sintomáticas

Se emplearon seis plantas de caña de azúcar de las variedades “V 78-1” (variedad reportada como resistente), “C 266-70”, “CC 8592” y “RB 855546” suministradas por la Estación Experimental Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Yaritagua, que presentaron la sintomatología característica de la EF de la hoja. Las muestras para el aislamiento de la bacteria se tomaron de cuatro plantas por cada variedad.

Para el aislamiento y preservación de los cultivos puros de *X. albilineans* se utilizó el medio nutritivo y medio diferencial agar YSP (Schaad *et al.*, 2001) y el medio semiselectivo D5 (Kado y Heskett, 1970).

Se efectuaron diferentes procedimientos para el aislamiento de la bacteria patógena, a partir de muestras

foliares y de tallos infectados, los cuales se describen brevemente:

1. Se tomó un entrenudo de la parte media de los tallos, y los tejidos se desinfectaron con alcohol 70%. Efectuando cortes transversales, se impregnaron sellos de éstos, en el medio de cultivo semiselectivo D5 (Huerta *et al.*, 2003).
2. Usando un escarpelo estéril se extrajo un pequeño trozo de tejido de hoja que presentaba la lesión. Se lavó con agua destilada estéril (ADE) durante 3 min, después se cortó en trozos pequeños y se colocaron directamente en el medio de cultivo semiselectivo sólido D5 (Schaad *et al.*, 2001).
3. A partir de tejido foliar se produjeron cortes y desinfectaron con NaOCl al 2% durante 2 min, se lavó con ADE y se maceraron utilizando 3 ml de ADE. Se inoculó 0,1 ml del macerado en caldo de medio semiselectivo D5 por 3 d, para luego inocularlo en medio de cultivo semiselectivo sólido D5 por agotamiento (tomado y modificado de Jiménez y Contreras, 2004).

El patógeno fue aislado en el medio semiselectivo D5 y luego cultivado en medio nutritivo YSP para la realización de las pruebas bioquímicas.

En las pruebas microbiológicas y moleculares se emplearon como controles una cepa de *Escherichia coli* y una cepa de *X. campestris*, donadas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.

Pruebas microbiológicas y bioquímicas

Se realizaron las siguientes pruebas según lo descrito por Díaz (2003): tinción de Gram, actividad catalasa, actividad oxidasa, actividad ureasa, crecimiento en agar MacConkey, crecimiento en agar Kligler, producción de indol, hidrólisis de gelatina, hidrólisis de esculina, hidrólisis de almidón, fermentación de azúcares, descarboxilación de aminoácidos (lisina, ornitina, arginina) y utilización de citrato, glucosa y lactosa.

Pruebas moleculares

Para la extracción de ADN se empleó el método de Gomes *et al.* (2000). Los cultivos crecieron en 5 ml de caldo nutritivo con 10% de glicerol (Promega) a 27 °C. Después de 7 d, se tomaron 1,5 ml y fueron centrifugados

a 13 000 x g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 200 µl de solución Tris 0,1 M (Sigma-Aldrich), añadiendo 200 µl de solución de lisis NaOH 0,2 N (Riedel De Haën) y SDS 1% (Sigma-Aldrich), mezclado con 700 µl de fenol (Sigma-Aldrich)/cloroformo (Riedel De Haën)/alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich; 25:24:1 v/v/v).

El homogenizado se centrifugó 13 000 x g por 5 min. Al sobrenadante se añadieron 700 µl de etanol frío al 95% (Riedel De Haën) y se centrifugó a 13 000 x g durante 5 min, luego se lavó con etanol 70% (Riedel De Haën) y se centrifugó nuevamente. El precipitado de ADN fue secado y vuelto a suspender en 50 µl de ADE.

El ADN aislado fue sometido a electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (Sigma-Aldrich) y visualizado con Bromuro de Etidio 10 µg ml⁻¹ (Sigma-Aldrich), con un transiluminador (GelDoc 1 000, BIORAD). La estimación de la concentración y la pureza del ADN extraído se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro Genesys 10 Bio usando la relación de DO 260/280 (Sambrook y Russell, 2001).

Las reacciones de PCR para amplificar, tanto la región del ADN que codifica para el ARN ribosomal, como la región intergénica ribosomal, se realizó en un volumen final de 25 µl con Buffer de reacción 1 X (Promega), 2 mM MgCl₂ (Promega), 0,2 mM dNTP's (Promega), 2 µM Iniciadores (Promega), 10 ng ADN de la muestra bacteriana y 2,5 U de Taq Polimerasa (Promega). Las amplificaciones se ejecutaron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400. Los fragmentos amplificados fueron visualizados con electroforesis en geles de agarosa 1,8% (Sigma-Aldrich), en un transiluminador (GelDoc 1000, BIORAD) mediante el programa Multi-Analyst[®]/PC versión 1.1 (BIORAD).

La amplificación de la región del ADN que codifica el ARN ribosomal 16S se efectuó según el protocolo descrito por Lu *et al.* (2000). Los iniciadores universales para bacterias utilizados fueron: U1: 5'-CCAGCAGCCG CGGTAATACG-3' y U2: 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGT TACGACTTC-3', que generan productos de 996 pb y 100 pb, con las siguientes condiciones: desnaturalización 1 min a 94 °C, hibridación 1 min a 48 °C, y elongación 2 min a 72 °C (35 ciclos).

La identificación de la bacteria *X. albilineans* se realizó según Pan *et al.* (1997), utilizando los iniciadores ALA4: 5'-CCCGACTGGCTCCACCACTG-3' y L1: 5'-CAAG GCATCCACCGT-3'. Estos iniciadores amplifican la región del ADN-ITS ubicada entre los genes que codifican los ARN ribosomal 16S y 23S, y generan una banda

específica para *X. albilineans* de 360 pb, con las siguientes condiciones: desnaturalización 1 min a 95 °C, hibridación 1 min a 43 °C, elongación 30 seg a 72 °C (30 ciclos).

Para identificar posibles variaciones de *X. albilineans* se amplificaron las regiones repetidas (ERIC), según el protocolo descrito por Lopes *et al.* (2001). Los iniciadores que se utilizaron, los cuales hibridan en las regiones repetidas dispersas en el genoma bacteriano, fueron ERIC1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' y ERIC2: 5'-AGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3', con las siguientes condiciones: desnaturalización 1 min a 94 °C, hibridación 1 min a 50 °C, elongación 1 min a 65 °C (35 ciclos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias a partir de plantas sintomáticas

Al aislar la bacteria mediante la metodología descrita por Schaad *et al.* (2001); Huerta *et al.* (2003); Jiménez y Contreras (2004), se encontró en todos los casos una alta cantidad de otros microorganismos contaminantes, como hongos y bacterias saprófitas con morfologías diferentes, a pesar de haber empleado el medio semiselectivo D5 (Kado y Heskett, 1970).

Con el procedimiento de macerado de hojas (Jiménez y Contreras, 2004) no se encontró cantidades tan elevadas de contaminantes fúngicos por lo que se decidió utilizar este método para los aislamientos de bacterias. Además, el macerado, al causar la ruptura celular de los tejidos foliares, permitió la liberación de las células bacterianas con mayor eficiencia que al colocar los tallos o los trozos de hojas en contacto con el agar.

El medio semiselectivo D5 formulado por Kado y Heskett en 1970, impidió el crecimiento de bacterias de los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Corynebacterium*, porque el contenido de sulfato de amonio de este medio altera los componentes de la superficie y de la membrana celular de estas bacterias. Sin embargo, no inhibe el crecimiento de los hongos filamentosos, levaduras y bacterias del género *Agrobacterium*, percibiéndose éstos, al realizar los aislamientos a partir de las plantas de caña de azúcar infectadas.

Con los diferentes procedimientos de aislamiento, utilizando 12 plantas sintomáticas, se obtuvieron aproximadamente 50 colonias que pudieron ser clasificadas

como *X. albilineans*, de acuerdo a sus características fenotípicas: diámetro entre 1 y 2 mm, forma circular, elevación convexa, borde entero, color amarillo y tiempo de generación entre 3 y 7 d.

Pruebas microbiológicas y bioquímicas

Las colonias aisladas de cultivos puros de *X. albilineans*, se sometieron a tinción de Gram y tinción con rojo congo y a las demás pruebas bioquímicas señaladas en la sección de materiales y métodos. Se encontró que de los 50 aislados analizados, 14 resultaron ser bastones Gram negativos con morfología de bacilos cortos, presentaron la enzima catalasa con lo cual se protegen frente al peróxido de hidrógeno, tienen como aceptor final de electrones la enzima citocromo c-oxidasa, hidrolizan el almidón, no son fermentadores de lactosa, utilizan la

glucosa como fuente de carbono, características típicas de este género bacteriano.

En cuanto a la intensidad del pigmento xanthomonadina, la velocidad de crecimiento y la mucosidad de las colonias, variaron dependiendo del medio de cultivo; colorearon amarillas, crecieron entre 3 y 7 d y no fueron mucoides. Los resultados de estas pruebas indicaron que los 14 aislados pertenecen al género *Xanthomonas* (ver Cuadro).

Pruebas moleculares

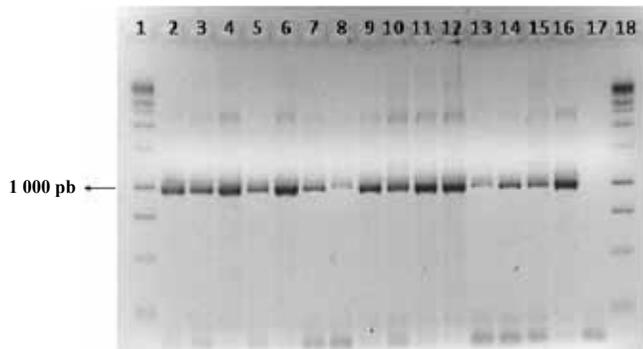
El método de Gomes *et al.* (2000) resultó apropiado para la extracción del ADN de las colonias que arrojaron resultados positivos para las pruebas microbiológicas, bioquímicas y las respectivas cepas controles.

CUADRO. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los aislados bacterianos obtenidos, para su identificación preliminar como *X. albilineans*.

Muestra	Gram	Ca	Ox	Ur	In	Klig	Al	Es	Ge	Cit	Lac	Glu	LDC	ODC	ADH
2	BGN	+	+	-	-	R/A	+	-	d	-	-	+	+	-	+
3	BGN	+	+	-	-	R/A	+	-	-	-	-	+	+	+	+
4	BGN	+	+	-	-	R/A	-	-	d	-	-	+	-	-	+
5	BGN	+	-	-	-	R/A	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	BGN	+	+	-	-	R/A	-	-	-	-	-	+	-	+	-
9	BGN	+	d	-	-	R/A	+	+	d	-	-	+	-	-	+
10	BGN	+	+	-	-	R/A	-	+	d	-	-	+	-	-	-
12	BGN	+	+	-	-	R/A	-	+	-	-	-	+	-	-	-
16	BGN	+	d	-	-	R/A	-	-	-	-	-	+	+	-	-
17	BGN	+	-	-	-	R/A	-	+	-	-	-	+	-	-	-
20	BGN	+	+	-	-	R/A	-	-	-	-	-	+	-	+	-
21	BGN	+	+	-	-	R/A	+	-	-	-	-	+	-	-	+
23	BGN	+	-	-	-	R/A	-	-	d	-	-	+	-	-	-
26	BGN	+	d	-	-	R/A	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>E. coli</i>	BGN	-	-	-	+	A/A	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>X. camp</i>	BGN	+	-	-	-	R/A	-	+	-	-	+	+	-	-	-

E. coli = *Escherichia coli*; *X. camp* = *Xanthomonas campestris*. + = positivo; - = negativo; d = débil; BGN = Bacilo Gram Negativo; A = Amarillo (ácido); R = Rojo (alcalino). Ca: Catalasa; Ox: Oxidasa; Ur: Ureasa; In: Indol; Klig: Kliger; Al: Almidón; Es: Esculina; Ge: Gelatina; Cit: Citrato; Lac: Lactosa; Glu: Glucosa; LDC: Lisina Descarboxilasa; ODC: Ornitina Descarboxilasa; ADH: Arginina Dihidrolasa.

Mediante la amplificación de la región del ADN que codifica la subunidad ribosomal, se verificó la calidad del aislamiento del mismo. La Figura 1 muestra los resultados, observándose un producto de PCR de 996 pb en todos los extractos de ADN bacteriano evaluados.



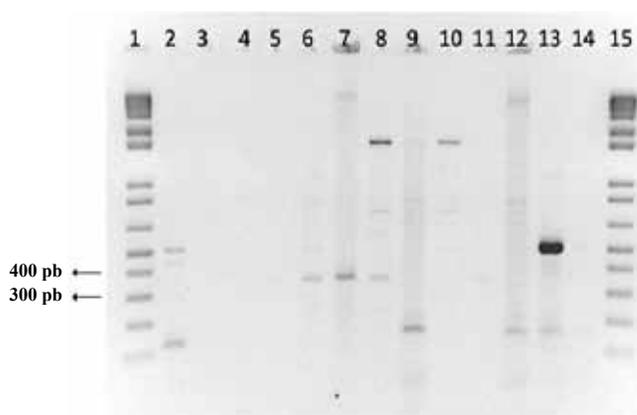
Carriles 1 y 18) marcador de peso molecular 1kb; 2) Muestra 11; 3) Muestra 20; 4) Muestra 21; 5) Muestra 23; 6) Muestra 26; 7) Muestra 3; 8) Muestra 4; 9) Muestra 1; 10) Muestra 16; 11) Muestra 2; 12) Muestra 5; 13) Muestra; 14) Muestra 8; 15) Muestra 12; 16) Muestra *E. coli*; 17) Control negativo.

FIGURA 1. Amplificación del gen 16S con los iniciadores U1 y U2.

Los iniciadores ALA4 y L1, permitieron la identificación de *X. albilineans* al amplificar una banda de 360 pb específica para esta bacteria, aunque también amplifican fragmentos de diferentes tamaños de otras bacterias saprófitas de caña de azúcar.

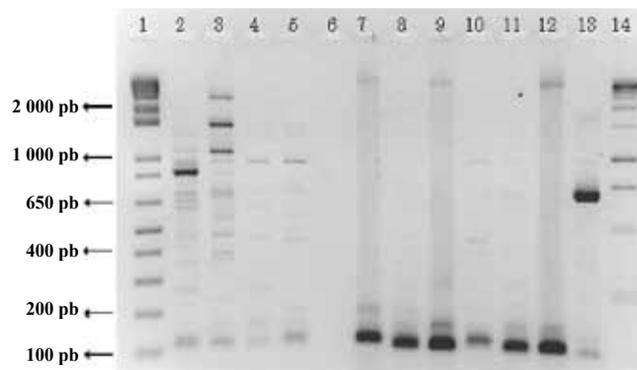
De las catorce bacterias Gram negativas aisladas de plantas de caña de azúcar, evaluadas por PCR con los iniciadores ALA4 y L1, solo tres fueron identificadas como *X. albilineans*, que corresponden a los aislados 9, 10 y 12. En la Figura 2 se muestra la banda amplificada de aproximadamente 360 pb (carriles 6, 7 y 8) que corresponde con lo descrito para *X. albilineans*. El ADN de los otros aislados bacterianos generó amplificadas de tamaño diferente.

La amplificación del ADN de la bacteria *X. albilineans* mediante la utilización de iniciadores ERIC permitió evaluar su relación con otros aislados de la misma especie, al comparar los patrones obtenidos en este trabajo, con los descritos por Lopes *et al.* (2001); Silva *et al.* (2005). La Figura 3 muestra los resultados obtenidos. Con el ADN proveniente de la muestra 9 no se obtuvo banda (carril 6), mientras que con las muestras 10 y 12 se observan 2 bandas entre 200 y 100 pb (carriles 7 y 8).



Carriles 1 y 15) marcador de peso molecular 1 kb plus; 2) *X. campestris*. 3) Muestra 6; 4) Muestra 7; 5) Muestra 8; 6) Muestra 9; 7) Muestra 10; 8) Muestra 12; 9) Muestra 13; 10) Muestra 14; 11) Muestra 17; 12) Muestra 18; 13) *E. coli*; 14) Control negativo.

FIGURA 2. Amplificación de la región conservada de *X. albilineans* con los iniciadores específicos ALA4 y L1.



Carriles: 1 y 14) marcador de peso molecular; 2) *X. campestris*; 3) Muestra 6; 4) Muestra 7; 5) Muestra 8; 6) Muestra 9; 7) Muestra 10; 8) Muestra 12; 9) Muestra 13; 10) Muestra 17; 11) Muestra 14; 12) Muestra 18; 13) *E. coli*.

FIGURA 3. Amplificación de regiones consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias con los iniciadores ERIC1 y ERIC2.

Dichos aislados, identificados en este trabajo como *X. albilineans* (ver Cuadro y Figura 2), generaron patrones de bandas diferentes a los descritos previamente por Lopes *et al.* (2001) y Silva *et al.* (2005), los cuales a su vez no mostraron similitud entre sí. El resto de los aislados bacterianos, pertenecientes a otros grupos taxonómicos, presentaron patrones diferentes, tal como se esperaba.

Los métodos moleculares, en conjunto con los métodos microbiológicos tradicionales, representan la mejor aproximación disponible hoy día para la correcta identificación de los patógenos de plantas que ocasionan grandes daños a los cultivos de importancia económica. En Venezuela no se han implementado estos estudios para determinar la presencia de *X. albilineans* en muestras de campo de plantas de caña de azúcar. En este trabajo se evaluaron diferentes metodologías para la extracción de ácidos nucleicos y posterior aplicación de diagnóstico molecular de la bacteria en 12 plantas sintomáticas tomadas del campo y mantenidas en vivero.

La elevada cantidad de contaminantes provenientes del aislamiento de la bacteria utilizando diversas estrategias, se debió a las condiciones del medio empleado, ya que se trata de un medio semiselectivo, en el cual el único factor que limita el crecimiento de las bacterias saprófitas es la fuente de carbono celobiosa (Kado y Heskett, 1970). Además, se debe considerar que en la superficie de las hojas, la presencia de microorganismos es muy elevada, siendo luego capaces de crecer en este medio.

En el interior de los tallos (método de los sellos) es más probable que sólo se encontrara *X. albilineans* por su carácter sistémico (Jiménez y Contreras, 2004), a pesar de esto, la presencia de hongos en los tallos resultó elevada. Otro inconveniente presentado por esta metodología fue la necesidad de sacrificar una planta completa para el aislamiento. También, se debe considerar que el alto contenido de contaminantes pudo ser debido al método de desinfección usado, el cual no puede ser muy acentuado, porque se podría eliminar la bacteria que se está intentando aislar.

Finalmente, la bacteria exhibe un tiempo de generación de 3 a 7 d, y esto promueve que sea desplazada por hongos y bacterias de crecimiento más rápido (Huerta *et al.*, 2003). A pesar de estos inconvenientes, en este trabajo se logró el aislamiento de bacterias que presentaban fenotipo similar a *X. albilineans*, realizando una desinfección superficial del material con NaOCl al 2% y/o utilizando mayor tiempo de exposición al desinfectante. Dado que los mejores resultados se obtuvo con la técnica del macerado de hojas, se seleccionó este método para el aislamiento de la bacteria en todas las plantas que presentaban síntomas.

Las bacterias aisladas fenotípicamente fueron similares a lo reportado para *X. albilineans* por diversos autores (Ordosgoitti *et al.*, 1977; Birch, 2001; Schaad *et al.*, 2001; Jiménez y Contreras, 2004). Sin embargo, se

observó diferencias en el crecimiento y algunas características de la bacteria en los medios D5, YSP y YDC, tales como, variaciones en la intensidad del pigmento amarillo, la velocidad de crecimiento y la mucosidad.

Con la aplicación de las pruebas bioquímicas se seleccionaron 14 aislados como posibles cepas de *X. albilineans* que presentaban características bioquímicas típicas para este género bacteriano (Davis *et al.*, 1994; Schaad *et al.*, 2001; Jiménez y Contreras, 2004). *Xanthomonas* es cosmopolita, debido a que infecta una amplia variedad de cultivos. Además, presenta una gran variabilidad genética entre especies, así como dentro de la misma especie. Esto apoya los resultados obtenidos con las pruebas bioquímicas, que a pesar de que este género y específicamente la especie *X. campestris* tiene un patrón característico, no todas las cepas mostraron la misma respuesta ante las diversas pruebas bioquímicas a las que fueron sometidas.

En el caso específico del aislado 9, difiere de las demás muestras y del perfil bioquímico de *X. albilineans* en general, pues hidroliza el almidón, es arginina dihidrolasa positiva y oxidasa débil. Con respecto a la hidrólisis del almidón, existen ciertos microorganismos que son capaces de procesar esta macromolécula para poder trasladarla al interior celular y emplearla como fuente de energía, es el caso de los aislados 2, 3, 9 y 21. La arginina dihidrolasa es un enzima que actúa sobre la L-arginina produciendo alcalinidad como resultado final, comúnmente encontrada en bacterias del género *Pseudomonas*.

Sobre este aspecto, cabe mencionar que una de las clasificaciones de *X. campestris* fue *Pseudomonas albilineans* (Ashby) Krasílnikov (Dye y Lelliott, 1974), con lo cual puede especularse que las variaciones en los resultados de esta prueba en particular tienen que ver con las similitudes que pueden tener estos dos géneros. La enzima citocromo c-oxidasa reacciona debido a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo, reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa, en consecuencia, como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones.

Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*). *X. campestris* es un organismo aerobio que por lo general no presenta esta enzima, como los aislados 5, 17 y 23, pero por su alta variabilidad

genética pueden haber ciertas cepas de la misma especie que presenten una reacción positiva al colocarlas en presencia de aceptores finales de electrones artificiales. Los 14 aislados que se encontraron dentro del perfil fueron entonces utilizados para el análisis molecular (ver Cuadro).

Con el método empleado se logró un aislamiento eficiente de ADN, a pesar de la presencia del exopolisacárido xanthano en grandes cantidades en todas las especies de *Xanthomonas*. Este polisacárido está involucrado en la asociación de la bacteria con la planta, pudiendo también identificarse como factor de patogenicidad, protección contra la desecación y formación de biopelículas. La amplificación mediante PCR de la región del ADN que codifica la subunidad ribosomal pequeña 16S, fue la forma más apropiada para verificar la calidad del ADN extraído (Figura 1). Este resultado permitió demostrar que el extracto está libre de compuestos que pudiesen inhibir la reacción de PCR.

Para la identificación molecular de la bacteria se evaluaron los 14 aislados bacterianos, de los cuales tres amplificaron la banda de 360 pb, indicando que pueden ser *X. albilineans* (Figura 2, carriles 6, 7 y 8). La mayoría de las bacterias aisladas amplificaron al menos una banda con los iniciadores específicos, debido a que uno de los iniciadores utilizados hibrida con el ADN de los genes ribosomales de 300 especies bacterianas (Jensen *et al.*, 1993), por lo cual se observaron distintos patrones de bandas en otras bacterias (Carriles 2, 9, 10, 12, y 13). Estos aislados serán caracterizados en estudios futuros.

Las regiones repetidas en el genoma fueron utilizadas para la identificación y estimación de la diversidad de bacterias (Lopes *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005; Versalovic *et al.*, 1994). La región consenso intergénica repetida de enterobacterias (ERIC) ha sido una de las herramientas empleadas para caracterizar a *X. albilineans* y para evaluar su diversidad (Lopes *et al.*, 2001). Este organismo se expandió alrededor de todo el mundo, por lo que la variabilidad en las cepas es muy elevada (Swings y Civerolo, 1993; Lopes *et al.*, 2001).

En este trabajo se observaron diversos patrones de bandas para las bacterias aisladas que no son *X. albilineans* (Figura 3). Las bacterias identificadas como *X. albilineans* no generaron patrones comparables a los reportados en la bibliografía, provenientes de bacterias de otras ubicaciones geográficas (Lopes *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo con patrones de bandas diferentes entre los múltiples aislados, permiten

sugerir que la variabilidad en *X. albilineans* es muy elevada y que generalmente viene relacionada con el lugar en el cual se colecta la muestra, pues, se logró establecer un patrón de identificación para algunas de las muestras aisladas ubicadas en la misma zona.

CONCLUSIÓN

- Las pruebas microbiológicas y bioquímicas permiten una primera aproximación en la identificación de *X. albilineans*. Sin embargo, al realizar el diagnóstico molecular, de los 14 aislados obtenidos a partir de las plantas de caña de azúcar con síntomas de EF, solo en los extractos de ADN de tres aislados se obtuvo la banda amplificada del tamaño correspondiente.
- El análisis mediante ERIC arrojó un patrón diferente para estos aislados, en comparación con los reportados para aislados de Los Angeles, Brasil, Islas Mauricio y Fiji; por lo que es probable que el patrón generado en las colonias analizadas sea específico para *X. albilineans* venezolana.
- Este es el primer trabajo donde se identifica y caracteriza molecularmente esta bacteria en el país.

BIBLIOGRAFÍA

- Araque, Y., J. Vitelli-Flores, A. Ramírez, G. Alonso y V. Rodríguez Lemoine. 2008. Identificación bioquímica y PCR especie-específica de *Burkholderia cepacia* en muestras de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* 28:82-89.
- Birch, R. 2001. *Xanthomonas albilineans* and the anti-pathogenesis approach to disease control. *Mol Plant Pathol.* 2:1-11.
- Carballo, J., M. Raymunde y M. Oropeza. 2007. Efecto de la infección de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, sobre la estructura anatómica de la hoja en caña de azúcar (*Saccharum* sp.) variedad R8 85-554b; XVII Congreso Venezolano Botánica. 20:330-333.
- Cova, J., H. Nass y A. Orozco. 2006. Enfermedades de la caña de azúcar (*Saccharum* spp) presentes en el estado Portuguesa durante el período 2003-2005; CENIAP HOY, N° 10: www.ceniap.inia.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniaphoy/articulos/articulos.

- Davis, M., P. Rott, P. Baudin and J. Dean. 1994. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 78:78-82.
- Díaz G. 2003. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológico. Protocolos de pruebas de identificación bacteriana. Laboratorio de Diagnóstico Clínico. 2º curso (2003-2004). San Fernando de Henares, Madrid, 9-16 pp.
- Gomes, L, K. Roncato, F. Aandrino and F. Almeida. 2000. A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. *Sci Agric.* 57:553-555.
- Honeycutt, R., B. Sobral and M. McClelland. 1995. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. *Microbiol.* 141:3 229-3 239.
- Hoy, J. and M. Grisham. 1994. Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana. *Plant Dis.* 78:1 083-1 087.
- Huerta, M., L. Ortega, C. Landeros, L. Fucikovskiy y M. Marín. 2003. Respuesta de 10 variedades de caña de azúcar a la EF de la hoja [*Xanthomonas albilineans* (Sabih) Dowson], en la región central costera de Veracruz. *Agrociencia.* 37:511-519.
- Jensen, M., J. Webster and N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol.* 59:945-952.
- Jiménez, O. y N. Contreras. 2004. *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en los estados Lara y Yaracuy. *Rev Fac Agron.* 21:231-243.
- Jiménez, O. y N. Contreras. 2008. Detección de *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar usando la técnica de ELISA y medios selectivos. *Bioagro.* 20:209-213.
- Jiménez, O. y N. Contreras. 2009. Respuesta de 11 variedades de caña de azúcar a la escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson) y evaluación de dos métodos de inoculación. *Bioagro.* 21:139-142.
- Kado, C. and M. Heskett. 1970. Selective media isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*; *Phytopathol.* 60:969-976.
- Lopes, S., K. Damann and L. Grelen. 2001. *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on Rep-PCR fingerprint. *Curr Microbiol.* 42:155-159.
- Lu, J., C. Perng, S. Lee and C. Wan. 2000. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 38:2 076-2 080.
- Ordosgoitti, A., A. Manzano y A. Piñero. 1977. La escaldadura de la caña de azúcar en Venezuela. *Agronomía Trop.* 27:235-249.
- Pan, Y., M. Grisham and D. Burder. 1997. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 81:189-94.
- Ricaud, C. and C. Ryan. 1989. Leaf scald: Diseases of sugarcane. Major diseases. Eds: Ricaud C, Egan B, Gillaspie A Jr y Hughes C. Amsterdam. The Netherlands; Elsevier Science Publishers; 39-58.
- Rivas, J., C. Redondo y G. Alonso. 2006. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas.* 9(2):3-7.
- Sambrook, J. and D. Russell. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition, 5.4, 5.14.
- Silva, M., I. Bedendo e M. Casagrande. 2005. Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal escaldadura da cana de açúcar. *Summa Phytopathol.* 33:341-347.
- Schaad, N., J. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, St. Paul: Phytopathological Society Press. 373 pp.
- Swings, J. and E. Civerolo. 1993. *Xanthomonas*. First edition. Chapman y Hall. London. 399 p.
- Vilchez, G. y G. Alonso. 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados

en el análisis de ácidos nucleicos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 29:6-12.

Versalovic, J., M. Schneider, F. J. De Bruijn and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5(1):25-40.