

Comparación de dos métodos para la detección de *Xanthomonas phaseoli* en semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.)

Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas phaseoli* on bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.)

Oralys C. León-Brito^{1*}, Catalina Ramis², Luis Angulo², Ana Maselli¹, Ada Maureen Medina² y Luis Alemán³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP); ²Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía (UCV-FAGRO), Instituto de Genética; ³Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, estado Portuguesa. *Correo electrónico: oralys927@gmail.com

RESUMEN

En búsqueda del método más efectivo, que se ajuste a las condiciones y recursos a nivel de laboratorio, se compararon dos metodologías para la identificación de la bacteria *Xanthomonas phaseoli* en semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Las semillas analizadas provenían de plantas de 28 accesiones previamente inoculadas en condiciones de umbráculo. Se utilizó el método convencional de bacteriología, realizándose estudios morfológicos, pruebas fisiológicas y bioquímicas, en colonias puras de bacterias con 24 horas de crecimiento, obtenidas de la siembra directa en agar nutritivo, de las semillas tratadas en dos condiciones: sin desinfectar y desinfectadas. Se empleó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa como método molecular. Con la utilización del método convencional solo se logró detectar la presencia de la bacteria en dos accesiones, mientras que con el método molecular se identificó en 18, del total de 28 accesiones. El método convencional utilizado fue menos efectivo porque se requiere mayor tiempo para el análisis de una muestra, en comparación con el método molecular, aunque el costo de este último es más elevado.

Palabras clave: bacteriosis común, detección enfermedad bacteriana, PCR.

ABSTRACT

According to laboratory condition and resources, two methodologies were compared in order to identify the most effective method to detect the presence of common bacterial blight caused by *Xanthomonas phaseoli* in black bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). The seeds were taken from 28 accessions of plants previously inoculated under greenhouse conditions. Conventional methods, including morphological, physiological and biochemical tests, using 24 hours pure bacteria colonies, obtained directly from seedlings grown on nutrient agar from seeds treated in disinfected and non-disinfected conditions were performed; also the molecular technique of polymerase chain reaction. The conventional method permitted the detection of the bacterial pathogen in two accessions of seeds, whereas 18 were identified with the molecular method. The conventional method was less effective and required longer time for results compared to the molecular method, with higher cost.

Key words: bacterial blight, detection bacterial disease, PCR.

INTRODUCCIÓN

La caraota, *Phaseolus vulgaris* L., es una de las principales leguminosas de grano que se consume en Venezuela. Su importancia radica en su beneficio como fuente de proteína y otros nutrientes, necesarios en la alimentación humana. Según cifras del Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (MPPAT), en el año 2014, la superficie cosechada de este rubro fue de 7616 ha, con una producción de 6191 t, representando un rendimiento de 813 kg.ha⁻¹.

Esta leguminosa se cultiva en casi todos los estados del país, en una multiplicidad de ambientes, comprendidos en zonas desde 150 a 2000 msnm, temperaturas de 15 a 27 °C, precipitaciones de 300 y 500 mm de agua de lluvia por ciclo y suelos franco-arenosos o franco-limosos, profundos, fértiles, con pH entre 5,5 y 7,0 (Pérez *et al.*, 2013 y Morros, 2001).

La caraota se propaga por semilla, siendo necesario tener en cuenta la calidad de la misma para el éxito del cultivo. Pueden ser un medio ideal para el transporte de patógenos de origen fúngico, viral, bacterial e inclusive de nematodos, que afectan la germinación y, como consecuencia, la emergencia y población final de plantas; o bien, causar problemas patológicos en los cultivos una vez establecidos. Igualmente, pueden diseminar enfermedades a regiones donde estaban ausentes (Montoya-Estrada y Castaño-Zapata, 2009).

La incidencia de enfermedades es uno de los factores que limita la producción del cultivo de caraota, por cuanto la ocurrencia e importancia económica de las mismas varían considerablemente en las diferentes zonas climáticas y en los sistemas de producción (Cruz-Izquierdo *et al.*, 2001).

En Venezuela, desde 1980, se ha señalado la presencia de microorganismos patógenos como hongos, virus y bacterias en la mayoría de las clases de semillas de fabáceas estudiadas, incluyendo: certificada, registrada, fundación y experimental o genética (Trujillo, 1989).

Una de las principales enfermedades que afecta a la caraota es la bacteriosis común causada por *Xanthomonas phaseoli*, la cual se propaga por semilla, lo que reduce los rendimientos de

40 a 45% en la producción de grano y disminuye la calidad de la semilla (Cruz-Izquierdo *et al.*, 2001; Lagarde *et al.*, 2010; Mutlu *et al.*, 2008 y Nunes *et al.*, 2008).

Sutton y Wallen (1970), realizando estudios epidemiológicos sobre *X. campestris* pv. *phaseoli*, demostraron que la presencia de una semilla de caraota infestada en un lote de 1000 semillas es suficiente para ocasionar una epidemia. Karavina *et al.* (2008), reportan que *Xanthomonas* ssp. puede sobrevivir hasta quince años en semillas de caraota, lo que ocasiona entre 10 y 50% de pérdidas. Saettler (1991) señala que el primordial medio de sobrevivencia de la bacteria *X. phaseoli* es la semilla contaminada, y puede mantenerse interna o externamente sobre ésta, siendo un medio efectivo de diseminación local y a larga distancia de este patógeno; además constituye la principal fuente de inóculo primario.

Existen diferentes metodologías para la detección de *X. phaseoli* en la semilla, que van desde las más sencillas, como siembra en suelo estéril y observación del crecimiento de las plantas (poco eficiente), hasta las más sofisticadas que incluyen utilización de medios selectivos, técnicas moleculares y serológicas, que son de mayor eficiencia, pero acarrear mayores costos (Roth, 1995 y Trujillo *et al.*, 2005).

En la identificación de bacterias en semillas de caraota, el Laboratorio de Bacteriología de Protección Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), en Maracay, estado Aragua, utiliza como metodología la siembra directa de las semillas en agar nutritivo, en dos condiciones: desinfectadas y sin desinfectar. Posteriormente, se efectúa el aislamiento, purificación e identificación de las colonias de bacterias, a las cuales se le realizan las pruebas determinadas por Schaad *et al.* (2001).

La metodología de siembra directa de las semillas sobre medios de crecimiento semisólidos para la obtención de patógenos bacterianos, ha sido cuestionada por diferentes autores, entre ellos Trujillo (1998) y Trujillo *et al.* (2005), quienes señalan que en las semillas existen muchos microorganismos contaminantes que crecen a una velocidad superior al de las bacterias

fitopatógenas, enmascarándolas y haciendo difícil su aislamiento.

Existen herramientas de diagnóstico molecular de microorganismos fitopatógenos, principalmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), basada en los genes ribosomales. La técnica de PCR es rápida, económica y permite producir un gran número de copias de moléculas de ADN vía catálisis enzimática, para mostrar diferencias en secuencias de genes del ARN ribosomal (rARN) o ADN mitocondrial (mADN), según Guzmán-Piedrahita *et al.*, 2009.

Audy *et al.* (1994) desarrollaron un procedimiento rápido para la identificación de *X. phaseoli*, basado en la reacción en cadena de la polimerasa, diseñando iniciadores para amplificar regiones específicas del ADN del plásmido de *Xanthomonas*, obteniendo un fragmento de 730 pb. Por su parte, Toth *et al.* (1998), diseñaron iniciadores específicos para una rápida diferenciación de *X. campestris* pv *phaseoli* var *fuscans* con un fragmento de 450 pb, tipo SCAR (secuencias caracterizadas de regiones amplificadas), tal fragmento corresponde a una secuencia de ADN genómico de la bacteria, detectado como una banda específica a través de RAPDs (Birch *et al.*, 1997). Estos últimos utilizados por Sánchez (2012) para la caracterización de aislamientos de *X. albilineans*, obteniendo distintos fragmentos amplificados entre 200 y 1200 pb, según los aislamientos de la bacteria.

La presente investigación tuvo por objetivo comparar la efectividad de dos métodos para la detección de la bacteria *X. phaseoli* en semillas de caraota provenientes de plantas inoculadas en condiciones de umbráculo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en Maracay, estado Aragua en el Laboratorio de Bacteriología ubicado en el área de Protección Vegetal del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP); en conjunto con el Laboratorio de Genética Molecular (LGM) del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) perteneciente

al Instituto de Genética, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

Material vegetal

El material estuvo constituido por semillas de caraota cosechadas (Cuadro 1) de 28 accesiones, provenientes de un ensayo en condiciones de umbráculo, donde las plantas habían sido inoculadas con la bacteria *X. phaseoli*, obtenida del Laboratorio de Bacteriología de Protección Vegetal del INIA-CENIAP e identificada como la cepa Tucutunemo de los Valles de Aragua, siguiendo el procedimiento de Lagarde *et al.* (2010).

Método convencional de bacteriología

Se utilizó el método de siembra directa. Las semillas fueron tratadas en dos condiciones: un primer grupo, sin desinfectar (SSD) y un segundo grupo desinfectadas (SD). En el caso de las semillas desinfectadas, fueron tratadas con hipoclorito de sodio al 1,5%, durante dos minutos y luego lavadas con agua destilada estéril. Se utilizaron placas de petri de 9 cm de diámetro, con agar nutritivo (AN), donde se colocaron ambos grupos de semillas. El número de semillas por placa no fue superior a 10 y dependió del tamaño de las mismas; todo este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar. Las placas de petri con las semillas se colocaron en una incubadora a 28 °C. Se realizaron observaciones de las placas, en un microscopio estereoscópico, a las 24 y 48 horas de incubación. Las bacterias que se observaron a las 24 horas correspondieron a saprófitas y las que se observaron a partir de las 48 horas fueron patogénicas.

Para el aislamiento, purificación e identificación de las colonias de bacterias en crecimiento, posibles *Xanthomonas*, se tomaron aquellas de color amarillo claro y con un anillo de platino se estriaron, en forma de zigzag, en platos de petri conteniendo AN, luego se incubaron a 28 °C. A las 24 horas de incubación, se tomó una muestra de las colonias en crecimiento y se estrió por desgaste, para obtener colonias aisladas. Consecutivamente, a las 24 horas después de incubación se tomaron colonias aisladas de color amarillo claro que correspondió a la obtención de colonias puras o cultivo puro.

Cuadro 1. Accesiones de cultivares de caraota (*P. vulgaris* L.) empleados para detectar la presencia de la bacteria *X. phaseoli* por el método tradicional de bacteriología y método PCR.

Accesión	Accesiones del Banco de Germoplasma	Genealogía	Cultivar
1	Testigo resistente	XAN 154	Testigo
2	Testigo susceptible	Tacarigua	Testigo
3	I-1984	MGM-01-98-007	Var. Local
4	I-1997	MGM-01-98-022	Var. Local
5	I-2019	MGM-02-99-06	Var. Local
6	I-2029	MGM-03-99-07	Var. Local
7	I-2043	MEM-01-00-08	Var. Local
8	I-2133	MGM-05-01-08	Var. Local
9	I-2139	DP-03-01-004	Var. Local
10	I-2152	MEM-03-01-10	Var. Local
11	I-2153	MEM-03-01-11	Var. Local
12	I-2162	CQ-04-01-01	Var. Local
13	I-2164	CQ-05-01-02	Var. Local
14	I-2180	MS-03-01-09	Var. Local
15	I-2208	AB-02-01-017	Var. Local
16	I-2219	MEM-03-02-017	Var. Local
17	I-2222	MEM-03-02-022	Var. Local
18	I-2226	MGM-08-02-001	Var. Local
19	I-2231	MGM-08-02-010	Var. Local
20	I-2232	MGM-08-02-012	Var. Local
21	I-2239	MGM-08-02-026	Var. Local
22	I-2242	MGM-08-02-029	Var. Local
23	I-2245	MGM-08-02-032	Var. Local
24	I-2568	DP-06-06-103	Var. Local
25	I-2662	BAT-68	Línea CIAT
26	UCV-150	INIAL8xMEM0301014 150/M/M/M	Línea avanzada UCV
27	UCV-27	Xan154xMEM0301013/27/M/ M/M/M/M	Línea avanzada UCV
28	UCV-56	Xan154xMEM0301013/56/M/ M/M/M/M	Línea avanzada UCV

Var. Local= Variedad local

Posteriormente, se le realizaron los estudios morfológicos, pruebas fisiológicas y bioquímicas para identificar la bacteria presente en las semillas, siguiendo los procedimientos de rutina del Laboratorio de Bacteriología de Protección Vegetal del INIA-CENIAP, según la metodología de Schaad *et al.* (2001).

Método de técnicas moleculares

Extracción de ADN genómico. Las semillas de cada accesión de caraota provenientes de plantas inoculadas con la bacteria *X. phaseoli*, en condiciones de umbráculo, fueron puestas a germinar en papel absorbente previamente humedecido con agua destilada. A los 3 días del proceso de germinación, a las semillas se les eliminó el tegumento y estas fueron utilizadas para la extracción de ADN siguiendo la metodología de Gepts y Clegg (1989), Gepts *et al.* (1992) y Murray y Thompson (1980), con algunas modificaciones implementadas en el Laboratorio de Genética Molecular en el CIBA-UCV (Castañeda, 2010).

Determinación de la cuantificación y calidad del ADN obtenido. La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó en gel de electroforesis de agarosa al 1% en comparación con el ADN fago lambda no digerido de concentración conocida. Todas las muestras de extracción fueron incubadas a 37 °C con ARNasa durante 1 hora para mejorar la calidad de las mismas y eliminar el ARN.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utilizó la técnica de PCR específica, utilizando los iniciadores desarrollados por Audy *et al.* (1994) y Toth *et al.* (1998), cuyas secuencias se presentan en Cuadro 2. La prueba permite detectar la presencia de la bacteria a través de la amplificación de un fragmento de 730pb o 450pb, respectivamente; la no amplificación indica la ausencia del ADN de la bacteria en la muestra.

Se utilizaron cuatro muestras de ADN de la bacteria *X. albilineans* como control positivo para la PCR (Sánchez, 2012). Las muestras de ADN de las accesiones de caraota y de

Cuadro 2. Secuencia y tamaño de iniciadores utilizados para la amplificación por PCR para detectar la presencia de *X. phaseoli* en semillas de caraota.

Fuente	Iniciador	Secuencia	Tamaño (pb)
Audy <i>et al.</i> (1994)	X4-c	GGCAACACCCGATCCCTAACAGG	730
	X4-e	CGCCCGGAAGCACGATCCTCGAAG	
Toth <i>et al.</i> (1998)	Xf2	ATGGCTCAAGGAAAACTTTCAGG	450
	Xf1	ACGCAAGACCCATCGTCATTC	

Cuadro 3. Componentes empleados para la reacción PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Tampóns	5X	1X
MgCl ₂	25mM	3mM
dNTP's	20mM	0,2mM
Cebador directo e indirecto	50µM	1 µM
Albumina bovina (BSA)	5mg.mL ⁻¹	0,1 mg.mL ⁻¹
GoTaq® Flexi ADN	1U.µL ⁻¹	0,2 U.µL ⁻¹
ADN	5ng. µL ⁻¹	1ng. µL ⁻¹
Volumen Final	25 µL	

los controles positivos para la bacteria, fueron preparadas a una concentración de $5\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Las condiciones de la mezcla de reacción para la PCR se presentan en el Cuadro 3.

La amplificación por PCR fue realizada en un termociclador *Cycler®* BIO-RAD Thermal Cycler, en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, seguida de 34 ciclos de amplificación a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, hibridación a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos y extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min, seguida por un ciclo de extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min y un ciclo final a $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.

Visualización de los productos de amplificación por PCR. La separación de los productos de amplificación por PCR se realizó a través de la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1,5%, teñido con bromuro de etidio 0,00002%, durante 2 horas y media a 80 v y 25mA. El gel fue visualizado en el transiluminador UV y fotografiado con analizador de imágenes del Gel Doc (BIO-Rad).

Técnica convencional vs metodología molecular. La comparación de la técnica convencional y metodología molecular utilizada para detectar la presencia de la bacteria *X. phaseoli* en las semillas de caraota se realizó considerando la efectividad y eficiencia de cada metodología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de *X. phaseoli* a través de métodos convencionales de bacteriología

De acuerdo con el estudio morfológico de las bacterias de 24 horas de crecimiento, las colonias puras fueron de color amarillo claro, lisas, redondas con bordes enteros y apariencia mucoide. Estas se identificaron en 6 de las 28 accesiones estudiadas, registradas como 7, 22, 24, 26, 27 y 28. Las colonias de bacterias que presentaron las características señaladas, se obtuvieron de las semillas desinfectadas (SD) de cada cultivar, indicando la presencia de la bacteria en el interior de las semillas.

Este resultado confirma lo expuesto por Trujillo (1989) sobre la diseminación de bacterias fitopatógenas a través de la semilla. A fin de confirmar la presencia de *X. phaseoli*, se

realizaron las pruebas químicas y fisiológicas correspondientes. En el resto de las accesiones analizadas, no se observaron colonias con características típicas de la bacteria en estudio.

En el Cuadro 4 se resumen los resultados hallados para las pruebas químicas y fisiológicas de aquellas bacterias obtenidas de las semillas de las 6 accesiones mencionadas anteriormente, así como los resultados de la pruebas que se esperarían para *X. phaseoli* según Schaad *et al.* (2001). Las muestras de las accesiones 7 y 22 presentaron las características típicas de *X. phaseoli*, pudiéndose concluir que tales semillas estaban infectadas con *X. phaseoli*, demostrando la translocación de la bacteria desde el punto de inoculación en las hojas cotiledonares hasta las semillas.

En el caso de la accesión 24, la bacteria presentó resultado positivo de la prueba de respiración tanto en anaerobiosis como aerobiosis, resultado no esperado para *X. phaseoli*, por cuanto ésta solo debe crecer en condiciones aeróbicas; esto explica una de las desventajas del método convencional por no tener la sensibilidad para la identificación precisa de algunos aislados bacterianos. Para las muestras de las accesiones 26, 27 y 28, las pruebas no son concluyentes. La prueba de catalasa resultó negativa para la accesión 27 y en la prueba en medio diferencial SX resultó negativa en las accesiones 26 y 28; sin embargo, estas pruebas no son determinantes para la caracterización final, se recomienda realizar pruebas adicionales que permitan la identificación precisa.

X. phaseoli se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, aeróbico, móvil mediante un flagelo polar. A nivel bioquímico, presenta reacción de la oxidasa negativa o débil, catalasa positiva, no produce indol e hidroliza el Tween 80, produce ácido a partir de arabinosa, celobiosa, galactosa, glucosa, manosa y trehalosa, también produce H_2S , proteólisis de la leche e hidrólisis del almidón.

Las colonias jóvenes en placas de agar suelen ser lisas, redondas con bordes enteros y apariencia mucoide. La pigmentación amarilla debido a la xantomonadina (pigmentos amarillos no solubles en agua) constituye una de sus principales características, pero no es

Cuadro 4. Resultados de las pruebas en las semillas de accesiones donde se observó la presencia de colonias bacterianas de *X. phaseoli* y su comparación con las características reportadas por Schaad *et al.* (2001).

N° de accesión	Condición y N° de semillas analizadas	Identificación	Tinción de Gram			Medio diferencial SX	Respiración (OF)			Crecimiento a 35 °C en un medio YDC
			Positiva (+)	Oxidasa	Catalasa		● CG	○ SG		
		Schaad <i>et al.</i> (2001)	■BC (-)	-	+	+	-	-	+	+
7	SD (4)	Var. Local	■BC (-)	-	+	+	-	-	+	+
22	SD (1)	Var. Local	■BC (-)	-	+	+	-	-	+	+
24	SD (4)	Var. Local	■BC (-)	-	+	+	+	+	+	+
26	SD (10)	UCV-150	■BC (-)	-	+	-	-	-	+	+
27	SD (6)	UCV-27	■BC (-)	-	+	+	-	-	+	+
28	SD (5)	UCV-56	■BC (-)	-	+	-	-	-	+	+

Semillas desinfectadas (SD), ■Bastones Cortos (BC), ●Con Glicerina, ○ Sin Glicerina, Var. Local=Variedad local.

determinante en la identificación ya que existen cepas no pigmentadas y ocasionalmente mutantes no coloreados (Bradbury, 1984; Noval, 1991; Schaad *et al.*, 2001 y Saettler, 1991).

Identificación de *X. Phaseoli* por técnicas moleculares

Una vez realizada la extracción de ADN de las semillas de las 28 accesiones de caraota para identificar la presencia de *X. phaseoli*, se verificó la cantidad y calidad del ADN obtenido, obteniéndose entre 5 y 100 ng.μL⁻¹. En tales muestras estaría presente el ADN de la planta y posiblemente de la bacteria.

Los ADN de las accesiones de caraota a una concentración de 5 ng.μL⁻¹ más los ADN de la bacteria *X. albilineans*, utilizados como control positivo, a igual concentración, fueron empleados para obtener las muestras amplificadas mediante la (PCR) para las regiones específicas determinadas por Audy *et al.* (1994) y Toth *et al.* (1998).

En el caso de la prueba diseñada por Audy *et al.* (1994), en la Figura 1 se presentan los productos de amplificación para cada accesión, observándose la amplificación superior de un fragmento de 750pb en la mayoría de las muestras analizadas (64,3%) provenientes de semillas de caraota. Este resultado demuestra que la bacteria no se diseminó de manera similar en las accesiones evaluadas. En el caso de *X. albilineans* se observa amplificación de bandas de otras tallas similares a las observadas por Sánchez (2012).

En la Figura 2 se presentan los productos de amplificación obtenidos para los iniciadores Xf1-Xf2 (Toth *et al.*, 1998) visualizados en gel de agarosa 1,5% en presencia de bromuro de etidio. En la misma, se observa en general la amplificación de fragmentos entre 200 y 1200pb en todas las muestras evaluadas, similares a las obtenidas por Sánchez (2012); sin embargo, no propias a la banda esperada de 450pb para *X. phaseoli* var. *Fuscans*, según lo reportado por Toth *et al.* (1998); lo que indica que las muestras no corresponden a ese tipo del patógeno. Esta prueba debería tomarse como un complemento de la anterior, ya que permite la identificación de la presencia de *X. phaseoli*.

Del total de las 28 muestras analizadas por la técnica molecular, 18 revelaron evidencias de la presencia de la bacteria en las semillas de las plantas inoculadas, demostrando así la translocación de la bacteria desde el punto de inoculación hasta las semillas.

La presencia del ADN de la bacteria fue detectado tanto en cultivares locales, líneas avanzadas, el testigo resistente (XAN154) y el susceptible ('Tacarigua'), tal resultado indica que la reacción de resistencia o susceptibilidad no se relaciona con la presencia o no de la bacteria en el tejido vegetal. Los resultados obtenidos por Cafati y Saettler (1980) y Contreras *et al.* (2001) señalan al respecto, la cantidad de células bacterianas que logran sobrevivir y causar los síntomas. De esta manera, a fin de distinguir genotipos susceptibles y resistentes sería necesaria una prueba molecular de tipo cuantitativa.



Figura 1. Visualización de los productos de amplificación PCR iniciadores X4-e-X4-c (Audy *et al.*, 1994) en gel de agarosa 1,5%. Marcador de 50pb (pozo 1); controles positivos de *X. albilineans* (pozos 2-5); ADN extraído de 28 muestras de semillas provenientes de plantas inoculadas con *X. phaseoli* de 28 accesiones de caraota (pozos 6 al 33).



Figura 2. Visualización de los productos de amplificación PCR iniciadores SCAR Xf1-Xf2 en gel de agarosa 1,5%. Marcador de 50pb (pozo 1); controles positivos de *X. albilineans* (pозos 2-5); ADN extraído de 28 muestras de semillas provenientes de plantas inoculadas con *X. phaseoli* de 28 accesiones de caraota.

Método convencional vs. Molecular

La comparación de ambas metodologías se realizó considerando la eficacia, al detectar la presencia de la bacteria y su eficiencia medida en tiempo y recursos necesarios para la obtención de resultados. En cuanto al primer aspecto, en el Cuadro 5 se presentan los resultados de identificación de la presencia de la bacteria *X. phaseoli* con el uso de las metodologías convencionales y moleculares de 28 muestras de semillas de caraota obtenidas de plantas inoculadas con *X. phaseoli*.

En el mismo, se destaca la baja efectividad del método convencional utilizado para detectar la presencia de la bacteria en cuanto al número de muestras (2), en comparación al método molecular con 18 muestras; al respecto Audy *et al.* (1994) encontraron que la técnica de PCR por ellos desarrollada era capaz de detectar la presencia de cantidades muy pequeñas del ADN de la bacteria, correspondiente a 10cfu, haciéndola mucho más sensible.

Para las muestras 26, 27 y 28 las distintas pruebas bioquímicas no coincidieron en su totalidad con lo esperado para *X. phaseoli* (Cuadro 5), por lo que se indica que no fueron concluyentes en cuanto a la presencia de la bacteria en las semillas de tales genotipos. En el caso particular de la accesión 27, se detectó la presencia de la bacteria mediante la prueba molecular. Estos 3 genotipos de caraota son producto de un programa de mejoramiento genético para resistencia a la bacteriosis

común, con la introducción de un simple gen de resistencia procedente de la accesión XAN154 (Ramis *et al.*, 2008), por lo que manifiestan menores síntomas tanto en campo como bajo inoculación dirigida (Castañeda, 2010).

Estudios anteriores han demostrado que en genotipos resistentes, *X. phaseoli* puede sobrevivir en los tejidos de plantas infectadas sin que se presenten síntomas (Cafati y Saettler, 1980). Por otra parte, Contreras *et al.* (2001) comparando genotipos de caraota resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles a *X. phaseoli* observaron la presencia de la bacteria en menor cantidad en relación a la mayor resistencia. Siendo así, una prueba sensible como la PCR es capaz de detectar la presencia de bajas cantidades del ADN de la bacteria que las pruebas convencionales no pudieran demostrar. Estos resultados han sido señalados por Trujillo *et al.* (2005) quienes indican que es indispensable la prueba de reinoculación en plantas a fin corroborar la identificación del agente causal. Esto requiere de un mayor tiempo y recursos.

Por su parte, en el Cuadro 6 se presenta la comparación de las metodologías, convencional y molecular, para la detección de la presencia de *X. phaseoli* en semillas de caraota en cuanto al tiempo y costo requerido para el análisis de una muestra. En el mismo, se evidencia que aunque el costo del análisis molecular es mayor, el tiempo para obtener resultados es mucho menor. Toth *et al.* (1998) indican que la técnica

Cuadro 5. Presencia (+) o ausencia (-) de *X. phaseoli* identificada con el uso de metodologías convencionales y moleculares, en muestras de semillas de caraota obtenidas de plantas inoculadas con la bacteria.

Muestra	Nomenclatura	Métodos	
		Convencional	Molecular
1	XAN 154	-	+
2	Tacarigua	-	-
3	MGM-01-98-007	-	+
4	MGM-01-98-022	-	-
5	MGM-02-99-06	-	+
6	MGM-03-99-07	-	+
7	MEM-01-00-08	+	+
8	MEM-01-00-08	-	+
9	DP-03-01-004	-	+
10	MEM-03-01-10	-	-
11	MEM-03-01-11	-	+
12	CQ-04-01-01	-	-
13	CQ-05-01-02	-	-
14	MS-03-01-09	-	-
15	AB-02-01-017	-	+
16	MEM-03-02-017	-	+
17	MEM-03-02-022	-	+
18	MGM-08-02-001	-	+
19	MGM-08-02-010	-	+
20	MGM-08-02-012	-	+
21	MGM-08-02-026	-	-
22	MGM-08-02-029	+	+
23	MGM-08-02-032	-	-
24	DP-06-06-103	-	+
25	BAT-68	-	+
26	UCV 150	no concluyente	-
27	UCV 27	no concluyente	+
28	UCV 56	no concluyente	-
Número de muestras con presencia de <i>X. phaseoli</i> detectada.		2	18

Cuadro 6. Comparación de las metodologías convencional y molecular para la detección de la presencia de *X. phaseoli* en semillas de caraota en cuanto al tiempo y costo requerido para el análisis de una muestra.

Métodos	Tiempo (días)	Costo (Bs/muestra) Año 2015
Convencional	De 7 a 15	239,68*
Molecular	3	2.500**

*Laboratorio de Bacteriología de Protección Vegetal del INIA-CENIAP. **Laboratorio de Genética Molecular del CIBA, adscrito al Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía, UCV.

de PCR reduce significativamente el tiempo requerido para detectar *X. c. pv. phaseoli* y *X. c. pv. Phaseoli* var. *Fuscans*; este método permite una detección más sensible, rápida y específica.

La sensibilidad del método depende, en gran medida, de la detección de la bacteria. Los estudios morfológicos conjuntamente con las pruebas fisiológicas y bioquímicas, pueden determinar ciertas características en respuesta a los procesos funcionales de la célula bacteriana.

Sin embargo, el estudio del ADN mediante pruebas moleculares es mucho más preciso, ya que tiene mayor sensibilidad para caracterizar a la bacteria mediante la molécula de ADN. También la patogenicidad de la cepa está condicionada a la incidencia que pueda tener la bacteriosis en ese momento, en las semillas del germoplasma, por lo cual no permita ser detectada por las técnicas convencionales de identificación de bacterias fitopatógenas.

CONCLUSIONES

Se evaluaron 28 accesiones de semilla de caraota para detectar *X. phaseoli* a través de dos metodologías: convencional y molecular. La metodología convencional señala que dos accesiones presentaron la bacteria y con el método molecular se identificaron 18 muestras con la presencia de *X. phaseoli*.

El método convencional, que presenta menor costo, fue menos efectivo que el método molecular para detectar la presencia de *X. phaseoli* en semillas de caraota, el cual tiene mayor costo y rápido tiempo de respuesta.

Los resultados demostraron la presencia de la bacteria *X. phaseoli* en semillas de plantas

inoculadas, siendo ésta la principal forma de diseminación de la enfermedad; por lo que se considera de vital importancia contar con una técnica de detección confiable para los programas de multiplicación de semilla y para los programas de mejoramiento genético.

LITERATURA CITADA

- Audy, P., A. Laroche, G. Saindon, H. C. Huang and R. L. Gilbertson. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 84:1185-1192.
- Bradbury, J. 1984. Genus II. *Xanthomonas* Dowson. In: Krieg (ed). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* Vol I. Baltimore, USA. William and Wilkins. pp. 199-210.
- Cafati, C. R. and A.W. Saettler. 1980. Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. *Phytopathology*. 70:675-679.
- Castañeda H., R. 2010. Evaluación molecular de la resistencia a la bacteriosis común (*Xanthomonas phaseoli*) y del rendimiento, en familias F_{2,4} de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay, Venezuela. 70 p.
- Contreras, N., G. Trujillo, O. Borges y F. Centeno. 2001. Análisis ultraestructural de la interacción de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* con genotipos resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles de *Phaseolus vulgaris* L. *Interciencia*. 26(11):554-557.

- Cruz-Izquierdo, S., P. Ramírez-Vallejo, B. Tlapal-Bolaños, I. Ramírez-Ramírez, R. García-Espinoza, J. Sandoval-Islas, y F. Castillo-González. 2001. Producción masiva de *Xanthomonas axonodopis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. *Agrociencia*. 35:575-581.
- Gepts, P. and M. T. Clegg. 1989. Genetic diversity in Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) at the DNA sequence level. *The Journal of Heredity*. 80(3):203-208.
- Gepts, P., V. Llaca, R. O. Nodar and L. Panella. 1992. Analysis of seed proteins, isozymes and RFLPs for genetic and evolutionary studies in *Phaseolus*. In: Linskens H-F, Jackson JF (eds.), *Modern methods of plant analysis (New Series)*. Seedanalysis. Springer, Berlin. pp. 63-93.
- Guzmán-Piedrahita, Ó. A., J. Castaño-Zapata y B. Villegas-Estrada. 2009. Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico. *Agronomía*. 17(2):7-24.
- Karavina, C., J. Chihya and T. A. Tigere. 2008. Detection and characterization of *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds collected in Zimbabwe. In: *Journal of Sustainable Development in Africa*. 10(1):105-119.
- Lagarde, P., A. Medina, C. Ramis y A. Maselli. 2010. Evaluación de la resistencia a la bacteriosis común causada por *Xanthomonas phaseoli* en plantas F₃ de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). *Fitopatología Venezolana*. 23(2):35-39.
- Montoya-Estrada, C. N. y J. Castaño-Zapata. 2009. Microorganismos asociados con granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), variedad Cargamanto Blanco. *Agronomía*. 17(2):25-35.
- Morros, M. E. 2001. Cultivo de la caraota con énfasis en el estado Lara. Maracay, Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Lara. (Serie D N° 2). 74 p.
- MPPAT (Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras). 2015. Base de datos de la Dirección de Estadística. Caracas-Venezuela.
- Mutlu, N., K. Vidaver, D. P. Coyne, J. R. Steadman P. A. Lambrecht and J. Reiser. 2008. Differential Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* Strains on Bean Plant Disease. 92(4):546-554.
- Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res*. 8:4321-4325.
- Noval, C. 1991. Género *Xanthomonas*. In: Andres, M.; Arias, M y Bello, A. (eds). *Manual de laboratorio, diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp. 285-312.
- Nunes, W., M., Corazza, S. Dias de Souza, S. Mui Tsai and E. Kuramae. 2008. Characterization of *Xanthomonas axonodopis* pv. *phaseoli* isolates. Botucatu, Brazil. *Summa Phytopathol*. 34(3):228-231.
- Pérez, D., N. Camacaro, M. E. Morros y A. Higuera. 2013. Leguminosas de grano comestible en Venezuela. Caraota, frijol y quinchoncho. *Agricultura en Venezuela* N° 1. José Luis Berroterán (Editor). Ediciones ONCTI, Caracas. 157 p.
- Ramis, C, O. Movil, M. Maselli, A. Medina y D. Pérez. 2008. Estudio de la herencia de la resistencia a *Xanthomonas phaseoli* en una población F₂ de caraota (*Phaseolis vulgaris* L.). III Congreso Venezolano de Mejoramiento Genético y Biotecnología Agrícola (III CONVEME). Barquisimeto, Venezuela. 25 al 27 de junio 2008.
- Roth, D. A. 1995. Review of extraction and isolation methods in Saettler *et al.* 1995. Detection of bacteria and other planting material. APS Press. St. Paul, Minnesota. pp. 3-16.
- Saettler, A. 1991. Diseases caused by bacteria. In: Hall, R. (ed). *Compendium of bean diseases*. The American Phytopathological Society Press. USA. pp. 29-31.

- Sánchez, G., T. M. 2012. Diagnóstico y caracterización molecular de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en variedades comerciales de caña de azúcar *Saccharum* sp., en Venezuela. Tesis. Doctorado en Ciencias Agrícolas. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 111 p.
- Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3^{era} Ed. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota. USA. 371 p.
- Sutton, M. D. and V. R. Wallen. 1970. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* on bean in Southwestern Ontario. Canadian. pp. 1329-1334.
- Trujillo, G., Y. Hernández y L. Gómez. 2005. Metodología fácil para la extracción y detección de bacterias fitopatógenas de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Notas Técnicas. Fitopatología Venezolana. 18(2):37-39.
- Trujillo, G. 1998. Fundamentos de Bacterias Fitopatógenas. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Rev. Alcance 56. 187 p.
- Trujillo, G. 1989. La problemática de las semillas de leguminosas comestibles en relación con los patógenos de planta. Caso: Venezuela. Agronomía al Día. 2:30-32.
- Toth, I. K., L. J. Hyman, R. Taylor and P. R. J. Birch. 1998. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. Journal of Applied Microbiology. 85:327-336.