

USO DE LA REGIÓN ENTRE LOS GENES RIBOSOMALES 16S Y 23S PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Clavibacter michiganensis* subs. *nebraskensis*

L. Ayala¹, R. Rodríguez^{1*}, C. Aguilar¹, F. Lara² y A. Quero³

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila

Blvd.. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas s/n Col Republica Saltillo Coahuila 25280 Tel (844) 416-9213

Fax (844) 439-0511 e-mail rrh961@hotmail.com

²Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios SA de CV. Saltillo Coahuila, México

³Colegio de Postgraduados, campus Salinas SLP. México

Palabras Claves: PCR, Bacterias, Maíz

Introducción. La enfermedad “atizonamiento y marchitez de la hoja del maíz” es causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Cmn). El síntoma más característico de esta enfermedad son puntos de color verde oscuro o negrusco a lo largo de las venas de las hojas infectadas (Schuster *et al.*, 1972). La identificación de Cmn se realiza por medio de pruebas bioquímicas o bien infectando plantas susceptibles para después observar los síntomas. Estas pruebas además de ser tardadas no son sensibles. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una síntesis cíclica enzimática en donde las cadenas de ADN son copiadas *in vitro*. PCR es una alternativa para la detección de Cmn por su especificidad, sensibilidad y rapidez. A la fecha no ha sido reportada la identificación de esta bacteria utilizando la técnica de PCR. En esta investigación se describe el desarrollo de un método para la identificación de *C. m. nebraskensis* utilizando PCR.

Metodología. Colonias bacterianas fueron aisladas de lavados de semilla de maíz con buffer de fosfatos. Para el aislamiento de las bacterias se utilizó el medio de cultivo King de B, y se incubó a 27 °C por 72 hrs. La identificación bacteriana se realizó por medio de pruebas bioquímicas y BiologTM (fermentación de carbohidratos). Se realizaron pruebas de hipersensibilidad en tabaco y de patogenicidad en 3 variedades de maíz. La extracción de ADN de la cepa se realizó utilizando un método basado en proteinasa K, mientras que la extracción de ADN de las plántulas infectadas se realizó utilizando un método basado en CTAB. Se diseñaron iniciadores específicos para la región entre los genes ribosomales 16s y 23s los cuales fueron utilizados en PCR de ADN bacteriano y del tejido infectado.

Resultados y Discusión. *Aislamiento de la bacteria.* Se presentaron colonias pequeñas de color amarillo y mucosas, descripción que coincide con la morfología reportada para Cmn (Smidt and Vidaver, 1986). *Pruebas bioquímicas.* La cepa aislada presentó reacción positiva en las pruebas de Gram y de oxidasa, en la prueba de flagelos e hidrólisis del almidón se presentó una reacción negativa. En la prueba de Biolog, la bacteria degradó los siguientes sustratos Alaninamina, Adenosina, Turanosa, Dextrina,

Celobiosa, Maltosa, Psicon, D-fructosa, D-manitol, D-xilosa, D-manosa, Metilpiruvato, D-galactosa, D-ribosa, Gentiobiosa, D-sorbitol, D-glucosa, Sucrosa, Glicerol. Con base en los sustratos que degrada la bacteria se clasificó como Cmn. *Prueba de hipersensibilidad.* La planta de tabaco inoculada con la bacteria presentó marchitez en un periodo de tres días alrededor de la zona inoculada. Lo que nos indica que la bacteria aislada es fitopatógena. *Prueba de patogenicidad en maíz.* Transcurrida una semana de la inoculación, las plantas de las tres variedades presentaron los signos característicos de la enfermedad tales como marchitez en todas las hojas, manchas de color café oscuro-negro húmedas a lo largo de las hojas. *Diseño de primer o iniciadores.* Los siguientes primers fueron usados para las reacciones de PCR. ^{5'} CCA TGT GGG GTG GGA ACG C ^{3'} (derecho) ^{5'} TTG TGA TCC ACC GGA AAA ^{3'} (izquierdo). La región entre los genes de rRNA 16S y 23S se considera como una región ideal para el desarrollo de primers específicos para Cmn debido a que es una región conservada. Las secuencias nucleótidas diseñadas para este trabajo se compararon con secuencias en los bancos de genes (Brown, 1999), demostrando que estos primers son específicos para el genoma de Cmn ya que se mostraron que no existía hibridación entre ellos mismos ni con el otro primer como tampoco con ninguna otra secuencia en el banco de genes. La distancia entre los dos primers es de 215 pb. Después de realizar PCR tanto de ADN bacteriano como de tejido vegetal infectado se observaron en los geles bandas intensas en las longitudes de 215 pb. de acuerdo al marcador molecular.

Conclusiones. Los primers diseñados fueron útiles para la detección de Cmn por PCR. Amplificándose una banda de 215 pb a una temperatura de apareamiento de 62° C.

Referencias

- Brown, T.A. 1999. *Addresses*. Genomes. Primera ed. Bios Scientific Publishers. 91, 417
- Schuster, M.L. et al. 1972. 27th Ann. Corn and Sorghum Res. Congr. Chicago Ill., Dic. 12-14, 27:176-191
- Smidt, M., and Vidaver, A.K. 1969. Plant Dis. 70:1031-36.