

# IDENTIFICACION DE *Pantoea stewartii* por inmuno-PCR DIRECTAMENTE DE LA SEMILLA DE MAIZ

J.C. Rocha, R. Rodríguez\*, C.N. Aguilar, F. Lara, A. Quero, F. Castillo  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila  
Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas s/n Col. República C.P. 25280 Saltillo Coahuila  
Tel. (844) 416-92-13. Fax (844) 415-95-34. E-Mail. [rrh961@hotmail.com](mailto:rrh961@hotmail.com)

**Palabras claves:** bacteria, marchitez, Stewart

**Introducción.** *Pantoea stewartii* causa en el maíz la enfermedad marchitez de Stewart, esta se caracteriza por lesiones ovales y acuosas en la hoja. La enfermedad de Stewart puede causar la muerte de la planta en las primeras etapas de desarrollo (Wilson *et al.*, 1998). La bacteria se presenta, tanto en el exterior como en el interior de la semilla, lo cual, puede ocasionar que esta no germine o no alcance los estándares de calidad para la importación o movilización hacia áreas libres de la enfermedad.

Los métodos tradicionales de detección como, el cultivo de plantas en invernaderos, esperando aparezcan los síntomas, o bien, realizar cultivos de lavados de semilla en medios selectivos, son muy tardados y con un rango amplio de error, (Blakemore *et al.*, 1999). Actualmente se cuenta con métodos de mayor eficacia y más rápidos, de los cuales, destacan ELISA y PCR. Estos se caracterizan por contar con un alto grado de sensibilidad y especificidad, sin embargo, presentan ciertas limitaciones como lo son, la falta de sensibilidad de ELISA cuando la bacteria esta en bajas cantidades y la inhibición de PCR por algunos componentes de la semilla. La presente investigación tiene como objetivo desarrollar un método basado en inmuno-PCR para la detección de *P. stewartii* directamente de la semilla. A su vez se determinaron las condiciones óptimas (temperatura de apareamiento, tiempo de incubación de la muestra para la fijación de la bacteria y calidad de los tubos empleados) para la realización de esta técnica.

**Metodología.** La detección de *P. stewartii* directamente de la semilla se realizó por la técnica de inmuno-PCR. La cual se describe brevemente: Se sensibilizaron microtubos de la marca Axigen y Fisher de 0.6 ml con anticuerpo específico a *P. stewartii* y se agregó una muestra infectada con la bacteria según el procedimiento descrito para microplacas (Singh y Somerville, 1992). Posteriormente se procedió a preparar la reacción de PCR directamente en los microtubos usando primers específicos a *P. stewartii* (Blackmore *et al.* 1999). Se evaluaron tres diferentes temperaturas de apareamiento de primers, (62, 65 y 68 °C), una vez seleccionada la temperatura de apareamiento óptima, se repitió, la técnica de inmuno-PCR usando 4 diferentes tiempos de incubación en la fijación de la bacteria (12 hrs, 9hrs, 6 hrs y 3hrs), después de seleccionar el tiempo de incubación, se realizó por tercera vez la técnica de inmuno-PCR utilizando tubos del mismo material (polipropileno) pero de diferentes marcas (Fisher y Axigen). En todos los casos la verificación del producto

amplificado se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa (1%). Usando un marcador molecular Ladder 100 para estimar el tamaño de la banda amplificada. Para la identificación de muestras infectadas se aislaron bacterias de semillas, en medio de cultivo selectivo y se procedió a la identificación de la bacteria por medio de pruebas bioquímicas (Schaad *et al.*, 2001).

**Resultados y Discusión.** La cepa bacteriana aislada de semilla de maíz en medio selectivo presentó características morfológicas que la ubican en el grupo de *Pantoea* y al realizar las pruebas bioquímicas corresponde bioquímicamente a *P. stewartii* dado que fue Gram negativa y mostró reacción positiva a: Prueba de Ryu, crecimiento aeróbico, crecimiento anaeróbico, hipersensibilidad en tabaco, color amarillo en KB, melibiosa, sucrosa, sorbitol, y negativa a: H<sub>2</sub>S de cysteina, reducción de nitratos, producción de indol, licuefacción de gelatina, celobiosa, maltosa, rhamnosa. Con los primer específicos para *P. stewartii* se logró amplificar un segmento de ADN de aproximadamente 400 pares de bases (pb) a las temperaturas de apareamiento de 62 °C y 65 °C, de las cuales, esta ultima muestra segmentos de mejor calidad. Con los tiempos de incubación se obtuvieron bandas de 400 pb de la misma calidad en los cuatro tiempos usados. La marca de los tubos no tuvo ningun efecto en los resultados obtenidos. Pruebas con los primer en cuestión mostraron que estos primer son altamente específicos para *P. stewartii* (Blackmore *et al.*, 1992). Pruebas de detección altamente sensitivas como PCR son de gran importancia para propósitos cuarentenarios dado que detectan niveles bajos de inculo, los cuales, permanecerían indetectables con métodos convencionales

**Conclusiones.** Se logró amplificar un segmento de ADN de 400 pb de *P. stewartii*, directamente de semilla de maíz por la técnica de inmuno-PCR y se estandarizaron los parametros principales para esta técnica.

## Bibliografía.

- 1.- Blakemore, E.J.A., Law, J.R. y Reeves, J.C. 1999. Seed Sci. and Technology 27:385-396.
- 2.- Schaad, N. W., Jones, J.B. y Chun, W. 2001. Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. P 73-83.
- 3.- Singh, R.P. y Somerville, T.H. 1992. Am. Potato J. 69:21-30.
- 4.- Wilson, W.J., Dillard, H.R., y Beer, S.V. 1998. Plant Disease 83(2):114-118.