



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

DETECCIÓN DE *Erwinia chrysanthemi* pv *zea* (Sabet 1954) Victoria *et al.*, 1975 EN MAÍZ EN MORELOS, MÉXICO

Elisa Durán Peralta

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2011

La presente tesis titulada: DETECCIÓN DE *Erwinia chrysanthemi* pv *zear* (Sabet 1954) Victoria et al., 1975 EN MAÍZ EN MORELOS, MÉXICO realizada por la alumna: Elisa Durán Peralta, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

**FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. José Sergio Sandoval Islas

ASESOR

Dra. Mónica Mezzalama

ASESOR

Dr. Sergio Aranda Ocampo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 27 de Octubre de 2011

**DETECCIÓN DE *Erwinia chrysanthemi* pv *zeae* (SABET 1954) VICTORIA ET AL.,
1975 EN MAÍZ EN MORELOS, MÉXICO.**

**Elisa Durán Peralta, MC.
Colegio de Postgraduados, 2011**

RESUMEN

La “pudrición del tallo del maíz” causada por *Erwinia chrysanthemi* pv *zeae* es una de las principales enfermedades del maíz (*Zea mays* L.) en los países tropicales y subtropicales. En el presente trabajo se realizó la extracción de ADN del patógeno y se realizó PCR utilizando los iniciadores ADE1 y ADE2, diseñados para *E. chrysanthemi* (Burkh.) Young et al. 1978, que amplifican un fragmento de 420pb del gen *pe/ADE*. Se demostró que estos también pueden ser utilizados para su detección por PCR en tiempo real con resultados similares a los citados en la literatura; sin embargo no pueden ser empleados para la cuantificación de la bacteria debido a la formación de estructuras secundarias. Mediante la caracterización fisiológica, bioquímica y análisis molecular, los aislados bacterianos patógenos de maíz fueron identificados como *Erwinia chrysanthemi* pv *zeae* (Sabet 1954) Victoria et al. 1975.

Palabras clave: *Zea mays* L., *Erwinia chrysanthemi* pv *zeae*, pudrición del tallo del maíz, PCR en tiempo real, gen *pe/ADE*.

SUMMARY

Corn stalk rot caused by *Erwinia chrysanthemi* pv *zear* is a major disease of maize (*Zea mays* L.) in tropical and subtropical countries. DNA extraction of the pathogen and PCR were performed using the primers ADE1 and ADE2 designed for *E. chrysanthemi* that amplify a fragment of 420pb of the gene *PeIADE*. It was shown that these can also be used for detection by real-time PCR results similar to those cited in the literature; however they cannot be used for the quantification of bacteria due to the formation of secondary structures. Using biochemical, physiological and molecular tests, bacterial isolates from corn pathogens were identified as *Erwinia chrysanthemi* pv *zear* (Sabet 1954) Victoria et al. 1975.

Keywords: *Zea mays*, *Erwinia chrysanthemi* pv *zear*, corn stalk rot, real-time PCR, gene *PeIADE*.

AGRADECIMIENTOS

A Los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación;

Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por darme la oportunidad de realizar esta investigación.

A todo el personal del CIMMYT, por las facilidades que me brindaron para la realización del trabajo de invernadero y de laboratorio, en especial a Noemí, Gaby, José Luis, Rogelio, Mercedes y Liliana;

A la Dra. Monica Mezzalama, por la dirección, dedicación, tiempo, confianza y apoyo que me brindo y que hizo posible la realización de este trabajo de investigación;

Al Dr. Sergio Sandoval Islas, por su apoyo, amistad y orientación, que me ha brindado;

Al Dr. Sergio Aranda, por sus consejos, apoyo, revisión y aportaciones para la mejora del presente trabajo;

A todos los profesores de Fitosanidad, a mis compañeros, amigos y familia, quienes de alguna manera me han acompañado hasta hoy, aun en la distancia.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv <i>zoeae</i>.....	2
2.2. PCR.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Pruebas de patogenicidad.....	17
3.2. Extracción de ADN.....	18
3.3. PCR de punto final.....	18
3.4. PCR en tiempo real.....	19
3.5. Caracterización bioquímica y fisiológica.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. Pruebas de patogenicidad.....	20
4.2. PCR de punto final.....	22
4.3. PCR en tiempo real.....	24
4.4. Caracterización bioquímica y fisiológica.....	27
5. CONCLUSIONES	29
6. LITERATURA	31
7. ANEXOS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv <i>zear</i>	13
Figura 2. Síntomas causados por <i>E. chrysanthemi</i> pv <i>zear</i> en maíz.....	30
Figura 3. Amplificación por pcr de un fragmento del gen pectatoliasa de <i>E. chrysanthemi</i>	33
Figura 4. Determinación del límite de detección.....	35
Figura 5. Especificidad de detección de <i>E. chrysanthemi</i> por pcr en tiempo real.....	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características bioquímicas y fisiológicas para <i>E. chrysanthemi</i> pv <i>zeae</i>	37
--	----

ANEXOS

Pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas para <i>Erwinia</i> spp.....	48
Pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas para <i>E. chrysanthemi</i> pv <i>zetae</i>	50
Cuadro 1. Condiciones para la validación de <i>X. translucens</i> pv <i>undulosa</i> como control negativo.....	52
Cuadro 2. Determinación la concentración de ADN y temperatura.....	53
Cuadro 3. Determinación de concentración de iniciadores, concentración ADN y temperatura.....	54

1. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cereales más importantes en México: ocupa una superficie sembrada de más de ocho millones de hectáreas con un valor de la producción de más de setenta mil millones de pesos (SIAP, 2010).

La pudrición del tallo del maíz causada por la bacteria *Erwinia chrysanthemi* pv. *zear* es una enfermedad importante que prolifera más en condiciones de alta temperatura y humedad. En regiones templadas en EEUU se presenta con mayor incidencia y severidad cuando se utiliza el riego por aspersión. También se ha encontrado en zonas áridas de África, Asia, Europa, América del Norte y del Sur (CABI, 2007). El inóculo primario de esta bacteria está asociado a restos del cultivo de maíz principalmente y en el suelo además de otras gramíneas hospedantes. La infección ocurre mediante la invasión de tejido foliar o a través de heridas naturales en raíces, provocando una infección que avanza lentamente, mientras que en caso de inoculación directa en tallo es más rápida (Thind y Payak, 1978). La sintomatología se manifiesta por muerte prematura y marchitez en las puntas de las hojas superiores, seguida por las hojas inferiores; la pudrición puede ser de la base hacia la punta o viceversa (Prasad y Sinha, 1977). La detección de la bacteria se puede realizar mediante pruebas bioquímicas y actualmente es corroborado con PCR, la cual es una opción rápida de detección de fitopatógenos (Henson, 1993). Estudios moleculares han demostrado que las pectinasas producidas por *E. chrysanthemi* como factor de virulencia, en particular las enzimas pectato liasa (PL) son un determinante primario en la patogenicidad (Barras, 1994).

Los iniciadores ADE1 5'-GATCAGAAAGCCCCGCAGCCAGAT-3', ADE2 5'-CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC-3' amplifican un fragmento de 420 pb del gen pectato liasa de todas las cepas *E.chrysanthem*i (Nassar *et al.*, 1996).

Objetivo

El objetivo del presente estudio fue caracterizar 11 cepas del patógeno aisladas de maíz en el estado de Morelos, México y asociadas al síntoma de pudrición de tallo del maíz mediante pruebas bioquímicas, fisiológicas y moleculares (PCR y PCR en tiempo real).

Hipótesis

- La PCR en tiempo real que se estandarizara en este trabajo puede ser una alternativa en el diagnóstico de *E. chrysanthem*i pv *zeae* en el cultivo del maíz.
- Los iniciadores ADE1 y ADE2 pueden ser utilizados para la de detección de *E. chrysanthem*i por PCR y PCR en tiempo real.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. *Erwinia chrysanthem*i pv *zeae*.

Sinónimos (CABI, 2007).

Erwinia carotovora sp *zeae* Sabet 1954

Erwinia maydis Kelman *et al.*, 1957

Pectobacterium carotovorum f.sp. *zeae* (Sabet) Dowson 1957

Pectobacterium var carotovorum. graminarum Dowson y Hayward 1960

Pectobacterium chrysanthemi pv. *zetae* Kelman 1974

Erwinia carotovora (Jones, 1901) Bergey *et al.*, 1923

Erwinia chrysanthemi patotipo maíz tinte 1969

Descripción del género *Erwinia* spp.

Las células de *E. chrysanthemi* son bacilos Gram-negativos, 0.5-1.0 x 1.0-3.0 micras con los extremos redondeados. Se producen solos o en parejas, pero a veces en cadenas. Las células son generalmente móviles por medio de flagelos peritricos. Son bacterias aero/anaeróbicas facultativas que catabolizan la glucosa por la vía fermentativa y reducen los nitratos a nitritos (Hauben *et al.*, 1998). Pectinolíticas, producen indol y crecen a 36°C. Catabolizan (+)-L-arabinosa, inositol, malonato, pero no catabolizan (+)-D-trehalosa, metil-glucósido, (Dickey, 1979) y (Shaad 2001). Causan daño vascular, marchitez, ocasionan pudrición suave en una gama de plantas hospederas. Los miembros del género *Dickeya* forman un grupo según lo determinado por el análisis de secuencias de genes 16s ARNr. El contenido de G + C de la gama de géneros es de 56,4 a 59,5% en moles. La especie tipo es *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder 1953) (Samson *et al.*, 2005).

Taxonomía.

E. chrysanthemi han sufrido varias reasignaciones taxonómicas. En primer lugar estuvo clasificadas dentro del género *Pectobacterium* como *P. chrysanthemi*. Posteriormente *E. chrysanthemi* se clasificó en función de un sistema basado en patovar de acuerdo a la especificidad de huésped (Bradbury, 1986) y los sistemas de biovar basadas en las diferencias fisiológicas y nutricionales. El sistema más

utilizado fue el de biovar Ngwira y Samson (1990) y Samson *et al.*, (1990). En una revisión más reciente, realizada por Samson y colaboradores (2005) se dividió a *E. chrysanthemi* en seis especies ubicadas en un nuevo género conocido como *Dickeya*.

Con base en análisis filogenéticos, se propuso que *E. chrysanthemi* sea reclasificada como la primera especie de un género nuevo, *Dickeya*, como *Dickeya chrysanthemi*. Seis grupos de hibridación ADN-ADN se alinearon en el complejo *E. chrysanthemi* correspondientes a las seis especies genómicas descritas. Las características bioquímicas y las reacciones serológicas permiten la identificación de estas seis especies. Por lo tanto, para las seis especies de acuerdo a la definición filogenética de las especies bacterianas de Wayne *et al.*, (1987), se proponen los siguientes nombres: *Dickeya chrysanthemi*, *Dickeya dadantii*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya dieffenbachiae*, *Dickeya paradisiaca* y *Dickeya zea*

Distribución geográfica.

La distribución de *E. chrysanthemi* pv *zea* se observa en la figura 1.

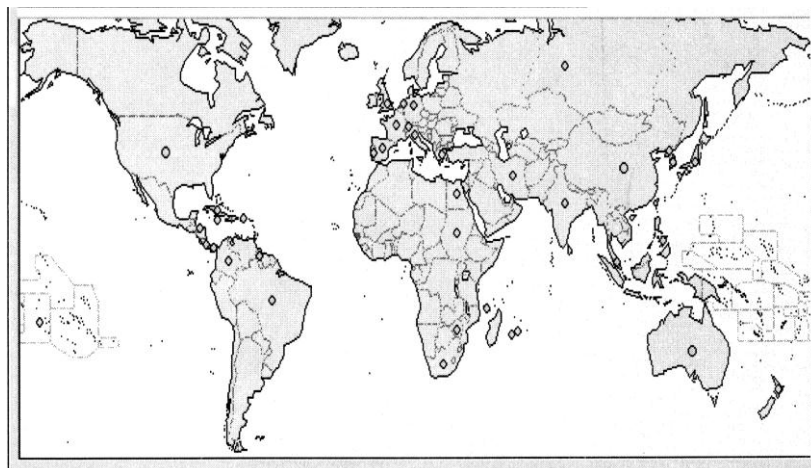


Figura 1. Distribución de *Erwinia chrysanthemi* pv *zea*. CAB International, 2007. Crop Protection Compendium, Global Module, 2007 Edition. Wallingford, UK, CAB International.

Diseminación.

Se ha observado de forma natural incidencias de hasta el 80-85%. Aun con alta humedad, la enfermedad no se desarrolla a 21°C, la infección es mayor a 32°C seguido de 28°C y es baja a 24°C. La infección es más alta en humedad relativa de 100%, intermedia en 79% y muy baja en 40%. La nebulización intermitente, tanto antes como después de la inoculación incrementa significativamente el porcentaje de infección en las regiones templadas. No hay evidencia de transmisión por semilla. El patógeno se puede aislar de agua. Puede entrar en las hojas a través de heridas, rociado a presión, pero no a través de las hojas intactas. Lesiones en raíces también pueden ser un sitio de entrada, pero la infección de manera natural avanza lentamente en comparación con la inoculación directa del tallo.

Otra forma de diseminación es por las manos de los operadores y las herramientas utilizadas para la poda y cosecha de las flores. El patógeno puede ser llevado por insectos saprófitos, agua de lluvia y viento, a distancias relativamente grandes (Ayvar *et al.*, 1994).

Sintomatología.

Las plantas de maíz son más susceptibles a los 40-60 días de edad. *E. chrysanthemi* es el patógeno de la pudrición suave, degrada órganos suculentos de sus hospederos tales como raíces y hojas gruesas. Coloniza el xilema, convirtiéndose en una infección sistémica, causando marchitez general. Este último aspecto es el más alarmante en la propagación vegetativa ya que el patógeno puede permanecer latente y por lo tanto se puede propagar. La bacteria puede sobrevivir en el suelo (en los desechos vegetales), por lo que el riesgo de infección es latente entre cosechas (EPPO/CABI, 2011).

El desarrollo de la enfermedad se debe a la acción de enzimas extracelulares producidas por estas bacterias como pectato liasa, poligalacturonasa, celulasa y proteasa, que degradan los componentes de la pared celular de las plantas, lo cual conlleva a la maceración de los tejidos y la liberación de nutrientes para el crecimiento bacteriano. La actividad de estas enzimas, principalmente de las pectato liasas, ha sido correlacionada con la patogenicidad y la virulencia de estas bacterias fitopatógenas (Franco y Stefanova, 2008).

Para despolimerizar la pectina de la planta, *Erwinia chrysanthemi* produce una serie de enzimas que incluyen una pectina-metil-esterasa codificada por el gen *pem* y cinco isoenzimas de la pectato liasa codificadas por los 5 genes *peIA*, *peIB*, *peIC*, *peID*, y *peIE*. La transcripción de los genes pectinasa depende de muchas condiciones medioambientales. Las diferencias en la expresión de los genes de pectinasa de *E. chrysanthemi* presumiblemente reflejan su papel durante la infección de las plantas, la degradación de los polímeros pécticos de la pared celular vegetal es el principal determinante de la maceración del tejido causado por *Erwinia* en la pudrición blanda (Hugouvieux, 1992).

Manejo.

Como ocurre con otras bacterias, los productos químicos disponibles rara vez son eficaces contra *E. chrysanthemi*. El sulfato de estreptomicina o kazugamycin se puede aplicar (en los países donde los antibióticos están permitidos) para controlar la pudrición blanda en invernadero. La cloración del agua reduce la infección en el maíz por *E. chrysanthemi* pv *zear*. El hipoclorito de calcio es eficaz como tratamiento al suelo. Hidróxido de calcio y estreptomicina asperjados son eficaces.

El control implica una estricta atención al saneamiento e higiene de plantas al aire libre o en invernadero. Puede sobrevivir hasta 10 semanas en el estiércol de ganado. La desinfección de herramientas de trabajo es de vital importancia. Se han detectado diferencias en la susceptibilidad entre las líneas de maíz en la India después de la inoculación artificial. La resistencia ha sido identificada en los híbridos de maíz que tienen mayor cantidad de fenoles totales presentes (CABI, 2007).

2.2. PCR.

La reacción de polimerización en cadena o PCR del inglés Polymerase Chain Reaction, es una tecnología que se utiliza para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo. Esta tecnología se ha venido utilizando con bastante éxito desde que fue patentada 1985 y se ha empleado en diferentes campos del conocimiento, tales como la medicina, taxonomía, biología, agronomía, área forense y criminalística, principalmente. Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadoras llamadas iniciadores o cebadores, una enzima ADN polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxiribonucleotidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un amortiguador apropiado y un equipo llamado termociclador que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado. La PCR consiste de tres pasos esenciales: el primero es la desnaturalización o sea la separación mediante temperatura (94° C) de la doble cadena de ADN a cadenas sencillas, que servirán como moldes para la síntesis del fragmento respectivo. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el alineamiento de las moléculas iniciadoras a la secuencia blanco del ADN molde. Las moléculas iniciadoras pueden

variar en longitud, composición de bases nitrogenadas y especificidad para parearse con la secuencia blanco y dependiendo de esto, la temperatura de alineamiento puede variar desde 25 °C a 65 °C. En el tercero, se lleva a cabo el alargamiento o extensión de la molécula iniciadora mediante la enzima ADN polimerasa a 72 °C. Lo más recomendable es que la ADN polimerasa seleccionada tolere la temperatura de desnaturalización y se mantenga activa durante el número de ciclos que se requieran. Por ejemplo, en muchas investigaciones se utiliza la ADN polimerasa *taq*, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, debido a que tolera la temperatura de desnaturalización sin alterar su función de polimerización. Estos 3 pasos (ciclos) se repiten en el termociclador, permitiendo obtener de manera exponencial el fragmento o fragmentos discretos sintetizados a partir del molde de ADN; por ejemplo, en una reacción de 30 a 35 ciclos, se acumularán alrededor de 10^6 a 10^8 moléculas de ADN; estas secuencias amplificadas (sintetizadas *ex novo*), pueden ser visualizadas en un gel de agarosa con técnicas de tinción convencionales (Valadez 2000).

Como en muchos progresos científicos e invenciones, hay controversia alrededor del descubrimiento de la PCR. En 1969 el científico noruego Kjell Kleppe presentó un trabajo en el que describió la duplicación y cuadruplicación de moléculas de DNA sintéticas pequeñas utilizando DNA polimerasa. Tres años más tarde, Kleppe describió en un artículo publicado en *Journal of Molecular Biology* por primera vez un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN con iniciadores in vitro. A pesar de esto, atribuyen a Kary Mullis, quien trabajaba para una compañía de biotecnología, la invención de PCR en 1983. Por ello se le concedió el premio Nobel de química en 1993. Otros científicos lo atribuyen a

Henry Erich Erlych, Norman Arnheim, Randall Saiki, Glen Horn, Corey Levenson, Esteven Scharf, Fred Faloona y Tom With. La PCR puede ser entonces, uno de aquellos ejemplos clásicos de trabajo de equipo.

Schena *et al.*, 2004 menciona que la técnica de la PCR ofrece varias ventajas sobre los métodos tradicionales de diagnóstico: los microorganismos no necesitan ser cultivados, tiene el potencial para detectar una molécula blanco única en una mezcla compleja, es rápida y versátil. Dependiendo del diseño de los iniciadores, pueden ser selectivos a nivel de reino, género o especie.

La típica reacción de amplificación incluye la secuencia blanco, la enzima ADN polimerasa, dos oligonucleótidos, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), cloruro de magnesio (MgCl₂), el buffer de reacción y aditivos opcionales, que todos son mezclados y colocados en un termociclador automático que realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta (Promega Technical Bulletin, 2005). El volumen de la reacción es variable, aunque en muchas ocasiones se recomienda emplear volúmenes pequeños cuando se utilizan pequeñas cantidades de ADN (Henegariu, 2000). Es necesario optimizar todos estos parámetros para lograr un correcto funcionamiento del sistema.

ADN. La correcta amplificación de la región de interés es dependiente de la cantidad y calidad del ADN molde. Los reactivos que se emplean normalmente para purificar los ácidos nucleicos (sales, guanidinio, proteasas, duodecil sulfato de sodio (SDS) y solventes orgánicos) son inhibidores potentes de las ADN polimerasas (Promega Technical Bulletin, 2005). Existen una serie de reglas sencillas para que el ADN

molde no sea un problema en la reacción: (1) se debe garantizar su integridad, es decir no puede estar fragmentado en trozos más pequeños del que se desea amplificar, (2) la muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de iones Mg^{2+} en la solución (Barbeyrac *et al.*, 1996) y (3) no debe haber determinados factores sanguíneos, fenol, detergentes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa (Practical Molecular Biology, 2003).

Enzima. Existen diferentes tipos de ADN polimerasa que llevan a cabo la replicación del ADN. Estas se pueden clasificar en: termolábiles (temperatura óptima de 37°C a 42°C, se desnaturalizan con el calor) y termoestables (temperatura óptima de 74 °C, resiste entre 40 a 50 segundos a 96°C) (Lozada, 2002). Una de las más utilizadas ha sido la Taq ADN polimerasa (Mas *et al.*, 2001). Se recomienda no usar un alto número de ciclos, las concentraciones de los dNTPs deben contener la misma proporción de A, G, T y C, disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa y la concentración de $MgCl_2$ debe oscilar entre 1.5 mM y 3.0 mM. Se recomienda utilizar entre 1 y 1.25 U de enzima en 50µl de reacción. Incrementos en la cantidad de enzima y del tiempo de extensión genera la aparición de artefactos debido a la actividad exonucleasa intrínseca 5' → 3' de la enzima (Lozada, 2002). La Taq polimerasa tiene actividad reducida entre los 45°C y 65°C (intervalos a los cuales son elegidas la mayoría de las temperaturas de alineamiento), tiempos más largos suelen incrementar la probabilidad de aparición de productos inespecíficos (Practical Molecular Biology, 2003). Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria, conocida como “efecto meseta”. La cantidad de ADN sintetizado es

suficiente para su posterior utilización en la identificación, secuenciación y/o conservación (Promega Technical Bulletin, 2005).

Iniciadores. Un iniciador es una cadena corta de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Se necesita un iniciador porque la ADN polimerasa, que cataliza la replicación del ADN, no pueden empezar a sintetizar una nueva cadena de ADN de la nada, sino que solo pueden añadir nucleótidos a una hebra preexistente. Se necesitan dos para la reacción de PCR, uno en el extremo 3' y el complementario 5' para la otra hebra. Son de aproximadamente 20 nucleótidos, porque es la cantidad necesaria para que de manera probable se una a un sitio específico de la cadena de ADN. Se recomienda que el contenido de G+C oscile entre el 40 y 60%, evitando la presencia de regiones con largas secuencias de una sola base, así como secuencias que puedan producir estructuras secundarias internas. Los extremos 3' no deben ser complementarios, para evitar la formación de dímeros. Se debe evitar además la presencia de tres G ó C cerca del extremo 3' (Brinkmann Instruments, 2004). La temperatura de alineamiento (T_a) de los iniciadores debe ser similar en ambos, la cual generalmente oscila entre los 45 °C y 60 ° C. La secuencia de los iniciadores puede incluir en el extremo 5' sitios de corte para enzimas de restricción, lo cual dependerá del propósito de la investigación (Henegariu, 2000).

Mg. La concentración de magnesio es un factor crucial que afecta el funcionamiento de la enzima Taq ADN polimerasa. Los componentes de la reacción tales como: el ADN molde, agentes quelantes presentes en la muestra (EDTA o citrato), dNTPs y proteínas pueden afectar la cantidad de magnesio libre (Promega Technical Bulletin, 2005). Su carencia puede inactivar la enzima y su exceso reduce la fidelidad de la enzima y puede incrementar las uniones inespecíficas (Eckert y Kunkel, 1990). Por tales razones resulta imprescindible determinar la concentración óptima de esta sal, la cual generalmente se encuentra en el rango de 1.5 a 3.0 mM.

Buffer de reacción. Por lo general el buffer de reacción 10x está formado por 100 mM tris-HCl (pH entre 8 y 9 a 25°C), 500 mM KCl, 0.1% gelatina, 1% de Triton x-100 y 15mM de MgCl₂. El buffer tris es el encargado de regular el pH de la reacción, el cual afecta la actividad y fidelidad de la enzima. Moderadas concentraciones de KCl pueden incrementar la actividad de la enzima de un 50 a un 60% por encima de la actividad en ausencia de esta sal, cuya concentración óptima a emplear es de 50mM (Henegariu, 2000). En ocasiones se hace necesario el uso de aditivos, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la PCR. La adición de betamina, dimetilsulfóxido (DMSO) y formamida es beneficioso cuando el ADN molde posee regiones ricas en GC y forma potentes estructuras secundarias del ADN que puede provocar que la polimerasa se detenga (Rees *et al.*, 1993). El ADN con regiones ricas en GC puede ocasionar una ineficiente separación de las dos cadenas del ADN, por lo tanto la adición de aditivos en estos casos es beneficiosa, pues la betamina reduce la cantidad de energía requerida para separar las cadenas del ADN molde y el DMSO y formamida interfieren en la formación de enlaces de hidrógeno entre ambas cadenas. También se pueden usar detergentes

como el tween 20, laureth 12 (0.1%) o Tritón x-100, que ayudan a estabilizar la enzima. Existen también protocolos que incorporan polietilenglicol (PEG), glicerol, seroalbúmina bovina (BSA), etc., aunque no son en ningún caso imprescindibles (Promega protocols, 2005).

Programa de amplificación. Los dos parámetros que comúnmente se optimizan son la temperatura y el tiempo de alineamiento. Los tiempos y temperaturas del resto de las etapas usualmente no varían significativamente (Promega protocols, 2005). Un tiempo de alineamiento de 30 a 45 segundos es frecuentemente empleado. Se plantea que incrementos de 2 a 3 minutos tienen una influencia negativa en la reacción. El número de ciclos también es un aspecto importante a considerar. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de los factores han sido optimizados. Es importante no realizar un número alto de ciclos (normalmente se emplean de 25-35 ciclos) ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones no específicas (OIE Manual, 2004; Farmacopea Europea, 2007).

Límite de detección. Es la mínima cantidad de ADN que el ensayo es capaz de detectar y puede ser representado como: número de copias del genoma, dosis infecciosa, unidades formadoras de colonias (UFC), etc del agente que puede ser detectado (British Pharmacopoeia, 2004). De acuerdo a lo descrito en la Farmacopea Europea, 2007 el límite de detección se debe calcular para cada especie en particular. Se recomienda por ejemplo testar las 3 series de diluciones en diferentes días con 8 réplicas por cada dilución. Las técnicas analíticas se deben optimizar en la fase lineal de la curva de respuesta. La gama de un análisis se

define como el intervalo entre la concentración superior y más baja de un agente infeccioso en una muestra en la cual el agente pueda ser detectado de manera confiable y reproducible (OIE Manual, 2004).

2.3. PCR en tiempo real.

La aparición de los Organismos Genéticamente Modificados en el mercado de alimentos, y la demanda de técnicas más precisas y fiables para detectar transgenes en transgénicos y patógenos en plantas comestibles, han impulsado la introducción de la PCR en tiempo real en la investigación de plantas. Esto fue seguido por numerosas aplicaciones de la investigación fundamental el objetivo de estudiar los perfiles de expresión de genes endógenos y las familias multigenes. Desde entonces, el interés en esta técnica en la comunidad científica de plantas se ha incrementado exponencialmente (Gachon, *et al.*, 2004).

La PCR en tiempo real tiene un enorme potencial en patología vegetal en un nivel de precisión que era imposible hace algunos años, esto gracias a la sensibilidad, velocidad, versatilidad y posibilidad de lograr análisis cuantitativos (Schena *et al.*, 2004). Es suficientemente sensible para detectar un gen, cuantificar su expresión y revelar pequeños cambios en el ARNm (Bustin, 2002). La técnica aporta nuevas oportunidades de investigación para el estudio de diagnóstico, los niveles de inóculo umbral, la epidemiología y las interacciones hospedante-patógeno. Por otra parte, la cuantificación de la transcripción del mRNA específico es cada vez más aplicado al estudio de los cambios en la expresión génica en respuesta a los fitopatógenos (Schena *et al.*, 2004).

En el área de fitopatología se han realizado trabajos en materia de bioseguridad de los cultivos (Schaad *et al.*, 2003), en la detección de hongos fitopatógenos de semillas (Taylor *et al.*, 2001) y bacterias fitopatógenas (Schaad y Frederick, 2002). Para virus se han hecho trabajos de detección de PCR en tiempo real (Schoen *et al.*, 1996;. Eun *et al.*, 2000;. Boonham *et al.*, 2002;. Korimbocus *et al.*, 2002), al igual que en nematodos (Ciancio *et al.*, 2000, Bates *et al.*, 2002), bacterias (Weller *et al.*, 2000;. Hermansson y Lindgren, 2001) y hongos (Schena *et al.*, 2004).

Para la detección de bacterias fitopatógenas se toman en cuenta los síntomas y signos que pueden observarse visualmente en el hospedante, la morfología de las colonias en medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Siendo algunas de ellas de lento crecimiento, con estos métodos no siempre se llega a su diagnóstico en el momento o tiempo oportuno. Otra metodología es el empleo de anticuerpos específicos con la técnica de ELISA, sin embargo existen muchos factores que influyen en la certeza del diagnóstico y no hay anticuerpos disponibles para todos los patógenos. Por este motivo se hace necesaria la búsqueda de alternativas complementarias de diagnóstico eficiente para estas y otras bacterias. En fitobacteriología el diagnóstico mediante técnicas moleculares es específico, rápido, fiable y permite a los usuarios evaluar la presencia/ausencia de un patógeno bacteriano en los tejidos de la planta sin pasar por el aislamiento y crecimiento artificial (Zaccardelli, 2010).

Una de las principales limitaciones para el uso de PCR de punto final y PCR en tiempo real para detectar fitopatógenos por métodos únicamente moleculares es la falta de discriminación si se encuentran vivos o muertos. (Schena *et al.*, 2004).

Sin embargo, existen soluciones técnicas para obviar este problema, como pre-tratamiento de las muestras con etidio monoazide, que penetra en las células muertas (pero no en células vivas) y se une covalentemente al ADN, evitando la amplificación por PCR (Nogva, 2003) y (Rudi, 2005). Otras técnicas incluyen el enriquecimiento selectivo del patógeno antes de la PCR (Lievens, 2005) y (Schaad et al., 1999) y el uso de la transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR) para amplificar mRNA, que se asocia con células viables (Singleton, 2000). El problema de los falsos positivos derivados de patógenos muertos no es exclusiva de PCR, ya que los resultados similares se puede obtener con los inmunoensayos (Elphinstone, 1996) y (Janse, 1988).

Una de las ventajas de la PCR en tiempo real es eliminar el requisito de procesamiento post-amplificación, lo cual reduce significativamente el tiempo y los pasos del trabajo, aumenta enormemente el rendimiento y por ello se obtiene un sistema automatizado de diagnóstico adecuado para un análisis a gran escala (Sचना et al, 2002; Sचना e Ippólito, 2003). Esto es posible gracias a la detección de fluorescencia que es proporcional al aumento en el número de copias amplificadas, a su vez, será proporcional a la cantidad inicial de ADN (Zaccardelli, 2010). Hay varias reacciones químicas posibles que generan la fluorescencia durante la PCR. Las principales se basan en colorantes fluorescentes que se unen a la doble cadena de ADN (Higuchi et al., 1993), (Zaccardelli, 2010). Actualmente hay cuatro químicos principales que son utilizados para la aplicación de esta técnica. Estos químicos pueden ser agrupados en secuencia de amplificación no específicos (SYBR Green I) y métodos de secuencia específica (TaqMan, Molecular beacons, y Scorpión-PCR) (Sचना et al., 2004).

Una gran variedad de compuestos naturales, tales como los ácidos húmicos, taninos y lignina, pueden interferir con las reacciones de PCR e inhibir la amplificación (Cullen y Hirsch, 1998; Bridge y Spooner, 2001; Ippolito et al, 2002), Estos problemas han sido superados con el desarrollo y optimización de los métodos de extracción de ADN, o sea existen diferentes protocolos de extracción diseñados de acuerdo al tipo y estructura de la planta.

3. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad de Semillas del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), El Batán, Texcoco, Edo. de México.

3.1. Pruebas de patogenicidad. Se recolectaron plantas enfermas de maíz procedentes del estado de Morelos, de las cuales se aislaron 11 cepas bacterianas en medio de cultivo King B (KB) (King et al., 1954). El inóculo se preparó mediante una suspensión acuosa utilizando colonias bacterianas de 24 horas de crecimiento, incubadas a 25° C, a una concentración de 10^7 UFC ml⁻¹, y se inocularon 50 µl mediante inyección en la axila de la hoja de plántulas de maíz (CML 312SR del CIMMYT) de 25 días de edad, crecidas en invernadero a 27°C. Como controles positivos se utilizaron 2 cepas de referencia *Erwinia chrysanthemi* pv *zeae* (American Type Culture Collection 29942) y *Erwinia chrysanthemi* (American Type Culture Collection 11663), y como control negativo agua estéril. Se establecieron 4 repeticiones. Después de la inoculación, las plántulas se incubaron en una cámara de crecimiento (Percival Scientific, USA) con una humedad relativa de 93±2 °C en la

noche y 72 ± 2 °C en el día, una temperatura de 30 ± 2 °C de día y 24 ± 2 °C en la noche, con un fotoperiodo de 12 horas. A los 2 días de inoculación se presentaron los síntomas de pudrición de tallo y se llevó a cabo el re-aislamiento en medio KB del área afectada de las plántulas.

3.2. Extracción de ADN. Se inoculó una colonia bacteriana en 50 ml de medio Luria Broth (LB) (Sambrook, *et al.*, 1989). Se incubó 12 horas en agitación constante de 100rpm a 27°C, se centrifugó 1 ml de cultivo bacteriano a 12000 rpm por 10 minutos en tubos de plástico de 1.5 ml, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de buffer PBS con *tween*, se colocaron los tubos en baño maría a ebullición 10 minutos (Smid *et al.*, 1995).

3.3. PCR de punto final. Se preparó la mezcla para la reacción en un volumen total de 20µl, la cual contenía: 10 µl de buffer 1X RED Taq® Ready Mix™ PCR Reaction Mix (SIGMA ALDRICH, USA), 100 nm de cada iniciador (ADE1 y ADE2), dilución 1:100 = 5 ng de ADN de las 11 cepas en estudio, las dos cepas de referencia, el control negativo *X. translucens* pv *undulosa* y agua (E-Toxate™ Water, SIGMA ALDRICH, USA). Para la PCR se usó un termociclador de gradiente (Mastercycler®; Eppendorf). El programa de amplificación consistió en un ciclo de pre-desnaturalización de 94°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 1 min, alineamiento 64 °C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min; y un ciclo de extensión final a 72° C por 10 min. Para la visualización del producto de PCR se realizó electroforesis en agarosa 2% utilizando buffer TBE 1X, se cargaron 5 uL de reacción por cada muestra, se utilizó el marcador Low Ladder® de 100pb SIGMA como referencia, el gel se corrió a 90V durante 1 hora. Se utilizó tinción con SYBR®

Gold Nucleic Acid Gel Stain (INVITROGEN, USA) y se fotodocumento la imagen utilizando el equipo UVP, INC, UK.

3.4. PCR en tiempo real. Se estandarizaron las condiciones de PCR en tiempo real para determinar el límite de detección realizando por cada ensayo una serie de 7 diluciones del ADN de las cepas de referencia como controles positivos y *X. translucens* pv *undulosa* como control negativo (densidad de las células en suspensión: rango 1×10^0 a 1×10^{-6} OD₆₀₀ unidades de células) con 3 repeticiones. La mezcla de reacción de PCR consistió en 10 µl IQ SYBR Green Supermix 1X (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, C.A), 100 nm de iniciador ADE1 y ADE2, 5ng de ADN y agua (E-Toxate™ Water., SIGMA ALDRICH, USA) para un volumen total de 20µl. Se usó el equipo CFX96 PCR en tiempo real (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las condiciones de reacción fueron: pre-desnaturalización 95°C por 3 min; 40 ciclos de desnaturalización 95 °C por 30 s, alineamiento 64°C por 30 s y extensión 72° C por 30 s; y una curva de fusión de 60 a 95° C con incrementos de 0.5 °C por 10 s. Para confirmar el tamaño del fragmento amplificado se utilizó gel de agarosa al 2% en buffer TBE, 1 h a 90 volts, SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (INVITROGEN, USA) y marcador Low Ladder® de 100pb SIGMA. Para generar la curva estandar se graficaron los ciclos umbral (CT) contra el logaritmo de la concentración del ADN.

3.5. Caracterización bioquímica y fisiológica. La identificación de los aislamientos bacterianos se hizo con base en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Para medir la utilización de compuestos de carbono se siguió la metodología de Schaad *et al.*, (2001): se inoculó el medio LB con una

suspensión de 10^{-7} UFC ml⁻¹ y se observó a los 7, 14 y 21 días (Thomson *et al.*, 1981). Para la prueba de citrato se usó el medio agar citrato de Simon (Schaad *et al.*, 2001). La actividad fosfatasa y el crecimiento a 37 y 40° C se determinó con el método descrito por Schaad *et al.*, (2001). La prueba de β - galactosidasa se hizo de acuerdo a Schaad (1988). Todas las pruebas de caracterización se realizaron por triplicado para cada aislamiento utilizando 50 μ l de la suspensión bacteriana de cada una de las 11 cepas en estudio, las cepas de referencia *E. chrysanthemi* pv *zeae* (American Type Culture Collection 29942), *E. chrysanthemi* (American Type Culture Collection 11663) y el control negativo *X. translucens* pv *undulosa*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pruebas de patogenicidad.

En la Figura 2A se observa la inoculación de plantas de maíz. Después de 24 horas se observaron manchas transparentes, acuosas, alargadas a partir de la base de la hoja hacia el ápice (Figura 2B), y posteriormente a las 48 horas una pudrición suave de color café en el tallo, que ocasionaba que se desprendieran las hojas fácilmente (Figura 2C). A las 72 horas las plantas se doblaban, en la raíz se observó una coloración café y una pudrición suave. Se presentó la pudrición típica de la enfermedad, se pudieron notar exudados lo que daba un indicativo de la presencia de la bacteria atacando a la planta (Figura 2D). Los síntomas coincidieron con lo reportado por Prasad y Sinha, 1977, EPPO/CABI, 2011. Las hojas se vuelven amarillas y el tejido infectado se convierte en marrón, suave. Las plantas suelen volcarse, debido a que se desarrolla una pudrición blanda en el tallo. El cúmulo de

hojas con facilidad se puede sacar, mostrando una condición suave y podrida en el punto de ruptura cerca de la base.

De estas lesiones a las 24 horas de incubación a 26°C en medio KB se obtuvieron colonias iridiscentes, con rayitas cruzadas blancas, translúcidas con cavidades profundas, en forma de copa o de pozos. Las colonias obtenidas coincidieron morfológicamente con la bacteria original inoculada.

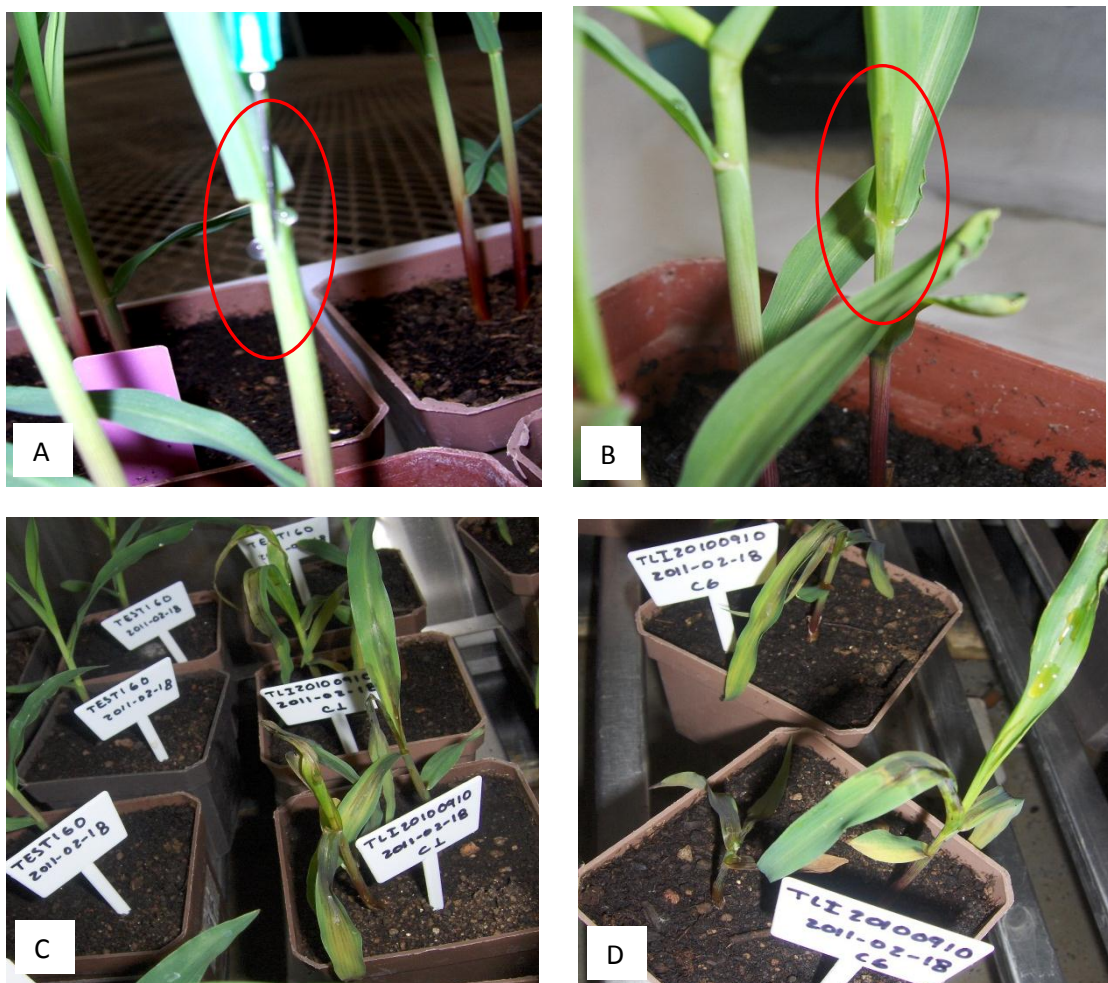


Figura 2. Síntomas causados por *E. chrysanthemi* pv *zae* en maíz. A. inoculación. B. mancha acuosa. C. Exudado bacteriano, D. Pudrición de tallo.

4.2. PCR de punto final.

Un ensayo estandarizado es un método que brinda constantemente el mismo resultado para una muestra dada. El desarrollo y estandarización de un sistema de PCR incluye optimizar todas las condiciones críticas como son tiempos, temperaturas, concentración de iniciadores, concentración de ADN, cantidad de enzima, cantidad de dNTPs, etc., es decir encontrar los mejores parámetros que permitan plantear que el sistema diseñado es confiable (Practical Molecular Biology, 2003).

Se realizaron 3 diferentes ensayos para obtener el protocolo estandarizado, como se observa en Anexo (cuadro 1, 2 y 3). Se utilizó como control positivo la cepa de referencia *E. chrysanthemi* pv *zeae* (ATCC 29942) y como control negativo *X. translucens* pv *undulosa*. Las condiciones críticas que se decidió probar en el programa de amplificación fueron cambios de temperatura, concentración de iniciadores y concentración de ADN.

El **ADN** mínimo óptimo oscila entre 10 y 100 ng y el máximo entre 400 y 500 ng (Lozada, 2002). Se probaron diluciones de ADN: 1:1000, 1:100, 1:10, y sin diluir. Al cuantificar el ADN la dilución 1:100 correspondió a 5ng.

La **concentración de iniciadores** a emplear debe oscilar entre los 5 y 50 pmoles, para una concentración final de 0.1 y 1 μ M en 50 μ l de reacción (Promega Technical Bulletin, 2005). Las concentraciones que se probaron fueron 1 μ M, 0.5 μ M y 0.1 μ M.

Las secuencias de los iniciadores son una consideración importante en la determinación de **la temperatura** de alineamiento óptima de la PCR. La temperatura de alineamiento óptima depende del iniciador con la menor temperatura

de fusión (T_m), generalmente mas/menos 5°C que la calculada, es la indicada para comenzar los estudios de optimización. Ambos iniciadores deben tener una T_m similar, planteándose que si las T_m se diferencian en más de 5°C , uno de los iniciadores debe ser rediseñado (Henegariu, 2000). De acuerdo a lo anterior se probaron las temperaturas de 55, 58, 61 y 64°C .

En el primer ensayo se comprobó que en ninguna de las condiciones probadas hubo amplificación de *X. translucens pv undulosa*, lo cual nos indicó que podía ser usada como control negativo (Anexo: Cuadro 1).

En el segundo ensayo al probar las 4 temperaturas y las 4 diluciones, se comprobó que la dilución 1:1000 y sin diluir no amplificó lo que significa que el rango en el cual se puede obtener producto de PCR es usando diluciones 1:100 y 1:10. Con las 4 temperaturas hubo amplificación. Las dos concentraciones de iniciadores amplificaron $1\ \mu\text{M}$ y $0.5\ \mu\text{M}$ (Anexo: Cuadro 2).

En el tercer ensayo se determinó como concentración óptima de iniciadores $0.1\ \mu\text{M}$, aunque otras concentraciones amplifican es mejor utilizar esta para disminuir la formación de dímeros de iniciadores. La concentración óptima de ADN fue 1:100, es la más diluida de las que permiten amplificación, con menos residuos de células que podrían inhibir la reacción de PCR. La temperatura óptima fue 64°C entre más alta sea la temperatura más se va purificando el producto de interés (Anexo: Cuadro 3).

En general el rangos que mostraron amplificación fueron: temperatura de 55, 58, 61 y 64°C , concentración de ADN 1:10 y 1:100 y concentración de iniciadores $1\ \mu\text{M}$ y $0.1\ \mu\text{M}$. Finalmente se evidencio que las condiciones óptimas para la amplificación del fragmento del gen *pe/ADE* de *E. chrysanthemi* fueron: concentración de ADN

1:100 = 5ng, concentración de iniciadores 0.1 μ M y 64 $^{\circ}$ C, puesto que la banda del amplicon presento mayor intensidad en la tonalidad al ser observada en el transiluminador luego de haber realizado una electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%.

Posteriormente se comprobó la presencia de *E. chrysanthemi*, por presencia del fragmento amplificado que coincide con los resultados obtenidos por Nassar *et al.*, 1996, (Figura 3).

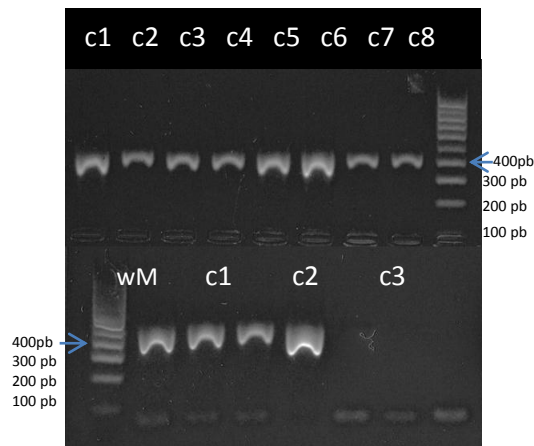


Figura 3. Amplificación de un fragmento de 400pb del gen pectatoliasa de *E. chrysanthemi* por PCR usando los iniciadores ADE1 y ADE2. Arriba. Carril 1-8, cepas bacterianas bajo estudio 1-8; Carril wM, Marcador PCR 100 bp Low Ladder, Sigma. Abajo. Carril wM, Marcador PCR 100 bp Low Ladder, Sigma; Carril 1-3, cepas bacterianas bajo estudio 9, 10 y 11; línea 4, cepa *E. chrysanthemi* pv *zeae* (American Type Culture Collection 29942); línea 5, cepa *E. chrysanthemi* (American Type Culture Collection 11663); línea 6, NTC; Carril 7, *X. translucens* pv *undulosa*.

4.3. PCR en tiempo real. Se comprobó que los iniciadores utilizados en PCR de punto final también sirven para la detección de *E. chrysanthemi* pv *zeae* por PCR en tiempo real. El ensayo mostró una buena respuesta lineal ($R^2 = 0,838$). El límite de detección de la reacción fue 0.1×10^{-6} OD₆₀₀ unidades de células (Figura 4A). El análisis de regresión estándar de la parte lineal de la pendiente dio un coeficiente de -1.437, que produjo una eficiencia de la PCR de 396.4% (Figura 4B).

La molécula fluorescente se une al azar a las dobles cadenas, incluyendo dímeros de iniciadores, por ello es necesario optimizar el método para prevenir la formación de productos inespecíficos. También se pueden someter las muestras a una etapa final de amplificación con un aumento gradual de la temperatura para obtener la T_m , que es la temperatura a la que la doble cadena de ADN se separa en dos. La variación de la fluorescencia se controla para generar una curva de fusión y se pueda identificar como diferentes picos, los generados por los productos de amplificación específicos, de los no específicos y/o dímeros de iniciadores (Zaccardelli, 2010). La intensidad de fluorescencia corresponde al producto amplificando y se observa en la Figura 5A. El análisis de la temperatura de fusión y picos de fusión de *E. chrysanthemi* pv *zeae* por SYBR Green en ensayos de PCR en tiempo real reveló una temperatura de fusión reproducible de 86.5 °C (Figura 5B). Sin embargo aparece más de un pico, lo cual nos indica la presencia de más de un producto de la PCR, por ello no se puede cuantificar la cantidad de ADN ya que la fluorescencia emitida se debe al total del producto amplificado, pero se puede llevar a cabo la detección del patógeno mediante la determinación de la temperatura de fusión.

La especificidad del proceso se puede comprobar tras la finalización de la ejecución de PCR, por las pruebas de la naturaleza del producto amplificado con electroforesis en gel, las curvas de fusión, y la secuencia de datos (Gachon *et al.*, 2004). Es útil realizar electroforesis en gel de agarosa cuando se optimiza un ensayo de PCR en tiempo real para relacionar la longitud del producto con los picos del análisis de la curva de fusión y la posible presencia de artefactos como dímeros de iniciadores (Dussault & Pouliot, 2006). La detección del patógeno por PCR en tiempo real en las

11 cepas fue positiva (Fig. 5A), el fragmento amplificado correspondió al fragmento del tamaño esperado (420 pb; Figura 3).

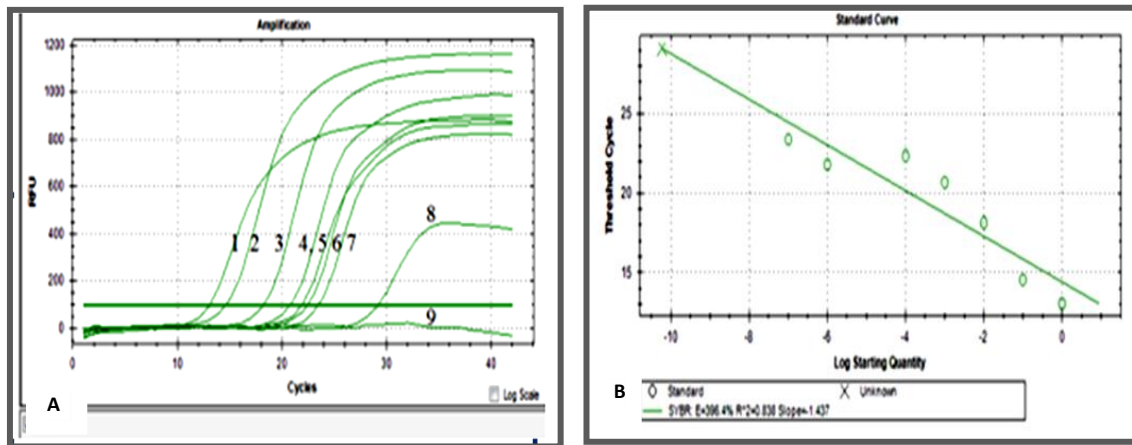


Figura 4. Determinación del límite de detección mediante la curva estándar de 7 diluciones de cultivo de *E. chrysanthemi* pv *zae* (American Type Culture Collection 29942), iniciadores ADE1, ADE2 y PCR en tiempo real con SYBR Green A. Intensidad de la fluorescencia vs. los ciclos. 1-7, diluciones de la muestra; 8, Control No Templado (NTC); 9 agua. B. Regresión lineal del Log de la cantidad inicial contra el Ct.

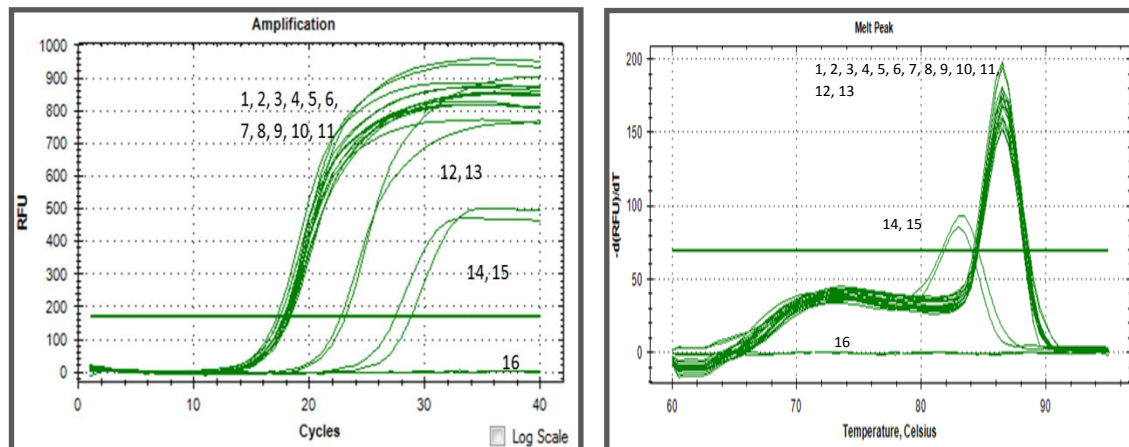


Figura 5. Especificidad de detección de *E. chrysanthem*^B por PCR en tiempo real con SYBR Green, usando las cepas en estudio y los iniciadores ADE1 Y ADE2. A, intensidad de fluorescencia correspondiente al producto amplificando. 1-11, cepas bacterianas bajo estudio; 12, cepa *E. chrysanthemi* pv *zae* (American Type Culture Collection 29942); 13, cepa *E. chrysanthemi* (American Type Culture Collection 11663); 14, control no templado (NTC); 15, *X. translucens* pv *undulosa*; 16, agua. B, análisis del pico de la curva de fusión. La primera derivada negativa de las unidades de fluorescencia negativa (-d(RFU)/dT) es graficado como una función de la temperatura. Producto amplificado, 86.5°C. El pico alto indica el producto amplificado y el pico bajo es el NTC; 1-11 cepas en estudio, 12-13 cepas *E. chrysanthemi* pv *zae* (American Type Culture Collection 29942) y *E. chrysanthemi* (American Type Culture Collection 11663), 14 NTC, 15 *X. translucens* pv *undulosa*, 16 agua.

4.4. Caracterización bioquímica y fisiológica. Las 11 cepas aisladas de maíz causaron pudrición blanda en papa y fueron patogénicas en plantas de maíz. Los resultados de la caracterización indican que estas cepas son gram negativas, anaeróbicas facultativas; crecieron en medio Cristal Violeta Pectato (CVP); fueron positivas para fosfatasa, indol y catalasa; sensibles a eritromicina; metabolismo oxidativo y fermentativo de la glucosa; redujeron nitratos; con producción de ácido de: melibiosa, citrato, rafinosa, arabitol y lactosa, pero fueron negativas en oxidasa, ureasa y adonitol. Utilizan L-arabinosa, D (+)-galactosa, D (+)-glucosa, Glycerol, D-mannosa, D-ribosa, Sucrosa. Producen β -galactosidasa y H_2S_2 , con crecimiento a 40 °C. De acuerdo a la caracterización (Cuadro 1), las cepas en estudio corresponden a *E. chrysanthemi* pv *zear*, lo cual coincide con lo reportado por Dye (1968), Lelliot and Stead (1987), Schaad *et al.*, (2001) y Samson (2005) para esta bacteria.

Cuadro 1. Resultados de pruebas bioquímicas y fisiológicas de las cepas bajo estudio, cepa de referencia *E. chrysanthemi* (American Type Culture Collection 11663) y *E. chrysanthemi* pv *zoeae* (American Type Culture Collection 29942). Las características de las cepas fueron evaluadas por comparación con una reacción de cepa típica de acuerdo a Dye (1968), Lelliot and Stead (1987), Schaad (2001) y Samson 2005.

Característica	<i>Erwinia</i> spp. Reacción típica	<i>E.</i> <i>chrysanthemi</i> ATCC 11663	<i>E.</i> <i>chrysanthemi</i> pv <i>zoeae</i> ATCC 29942	Cepa 1a11
Gram positiva	-	-	-	-
Fermentación	+	+	+	+
Oxidación	+	+	+	+
Colonias amarillas en YDC	-	-	-	-
Colonias mucoides en YDC a 30°C	-	-	-	-
Pigmento fluorescente en KB	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-
Crecimiento a 40 °C	-	+	+	+
Crecimiento en D1M agar	-	-	-	-
Formación de esporas	-	-	-	-
Micelio aereo	-	-	-	-
Crecimiento a CPV	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Fermentación de glucosa	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-
Utiliza:				
L-arabinosa	+	+	+	+
D (+)-galactosa	+	+	+	+
D (+)-glucosa	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+
D-ribosa	+	+	+	+
Sucrosa	+	+	+	+
Produce urease	-	-	-	-
β-galactosidasa	+	+	+	+
H ₂ S ₂	+	+	+	+
Crecimiento a 37 °C	+	+	+	+
Actividad fosfatasa	+	+	+	+
Sensibilidad a eritromicina	+	+	+	+
Indol	+	+	+	+
Produce acido de				
Melibiosa	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+
Arabitol	-	-	-	-
Lactosa	+	+	+	+
Utilización de keto-metyl glucoside	-	-	-	-
Pudrición en papa	+	+	+	+

+ Reacción positiva. - Reacción negativa.

En comparación con especies del género *Erwinia* causantes de pudrición blanda, como por ejemplo *Pectobacterium carotovora* y *Pectobacterium atrosepticum* existe una considerable diversidad dentro de *E. chrysanthemi*, tanto a nivel inmunológico, con alrededor de 12 serotipos sobre la base de lipopolisacáridos (Samson *et al.*, 1990) y el nivel molecular, con un 24% de similitud media (Avrova *et al.*, 2002) y 15 grupos de RFLP (Waleron *et al.*, 2002). La ribotipificación de la bacteria produjo siete grupos que podrían estar relacionados con patovares, biovares y en menor medida a la distribución geográfica (Nassar *et al.*, 1996).

5. CONCLUSIONES

- Se trabajó directamente con células bacterianas, lo cual reduce el tiempo de extracción de ADN.
- Los iniciadores ADE1 y ADE2 pueden ser utilizados para diagnóstico por PCR en tiempo real pero siempre incluyendo la determinación de curva de fusión.
- Se estandarizó la técnica de PCR convencional y PCR en tiempo real, sin embargo esta última produce estructuras secundarias.
- Al producir una muestra dos tipos de curvas: 86.5° C y a 83° C, no se sabe cuánta fluorescencia corresponde al producto y que tanta fluorescencia es por el subproducto o estructuras secundarias por ello no se puede cuantificar el ADN presente en la muestra.

- Es necesario corroborar el resultado mediante un gel de agarosa o agregar curva fusión porque sabemos que hay un subproducto.
- Al no correr un gel se ahorra trabajo, sin embargo se requiere de tiempo para la determinación de curva de fusión.
- La técnica de PCR en tiempo real permitió la detección a nivel de especie, pero aún se necesita realizar pruebas bioquímicas para llegar a patovar.
- Se recomienda diseñar nuevos iniciadores para PCR en tiempo real que diferencien patovares.
- Se recomienda la secuenciación de las 11 cepas bajo estudio, para su caracterización a nivel molecular.
- Se concluye la presencia de *Erwinia chrysanthemi* a nivel de especie por las pruebas de PCR en tiempo real, PCR de punto final, bioquímicas y fisiológicas; sin embargo mediante las pruebas bioquímicas y fisiológicas también es posible la identificación de la cepa hasta el nivel de patovar como *Erwinia chrysanthemi* pv *zeae* en las muestras analizadas.

6. LITERATURA

Avrova, A. O., L. J. Hyman., R. L. Toth., I. K. Toth. 2002. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Applied and Environmental Microbiology 68(4):1499-1508.

Ayvar, S. S., C. Sosa-Moss., R. M. Rosas y G. L. Villareal. 1994. Compendio de enfermedades de algunos cultivos de México. Serie Sanidad Vegetal. pp. 193-194.

Barbeyrac, B., Bébéar, C. y Taylor Robinson, D. (1996): PCR: Preparation of DNA from clinical Specimens. En: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol.II. Diagnostic Procedures. Academic Press, Inc., San Diego, California. pp: 61-65.

Barras F., F. V. Gijsegem and A Chatterjee. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. Annual Review Phytopathology 32:201–234.

Bates, J.A., E. J. A. Taylor., P. T. Gans and J. E. Thomas. 2002. Determination of relative proportions of *Globodera* species in mixed populations of potato cyst nematodes using PCR product melting peak analysis. Molecular Plant Pathology 3:153–161.

Boccaro M, A Diolez, M Rouve, and A Kotoujansky (1988) The role of individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saintpaulia plants. Physiological and Molecular Plant Pathology 33:95–104.

Boonham, N, P. Smith, K, Walsh, J, Tame, J, Morris, N, Spence, J Bennisson and I Barker. 2002. The detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). Journal of Virological Methods 101: 37–48.

Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. Farnham Royal, Slough, UK: CAB International.

Bridge, P. y B. Spooner. 2001. Soil fungi: diversity and detection. Plant and Soil 232: 147–154.

Brinkmann Instruments (2004): PCR optimization. <http://www.brinkmann.com/utilities/404.asp>.

British Pharmacopoeia Veterinary. 2004. Test for Absence of Mycoplasmas. Appendix XVI. B (Vet) 3. pp A17- A19.

Burkholder, W.H., L.H. McFadden., A.W. Dimock. 1953. A bacterial blight of chrysanthemums. *Phytopathology* 43, 522-525.

Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 23–39.

CAB International, 2007. Crop Protection Compendium, 2007 Edition. Wallingford, UK: CAB International. www. Cabi compendium.org/cpc.

Ciancio, A, P Leonetti and M. M. Finetti. 2000. Detection of nematode antagonistic bacteria by fluorogenic molecular probes. *EPPO Bulletin* 30: 563–570.

Cullen, D.W. y P.R. Hirsch. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 983–993.

DGSV-CNRF. 2011. Pudrición bacteriana (*Dickeya chrysanthemi* Burkholder 1953). Ficha Técnica SAGARPA-SENASICA. México D.F. 9 p.

Diagnostic Procedures. Academic Press, Inc., San Diego, California. pp: 61-65.

Dussault, A. A., M. Pouliot. 2006. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biological Procedures Online* 8: 1-10.

Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I- the “amylovora” group. *New Zealand Journal of Science* 11:590-607.

Eckert, K. A. y T. A Kunkel. 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermusaquaticus* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 18, 3739-44.

Elphinstone, J. G., J. Hennessy., J. K. Wilson,. and D. E. Stead. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bull.* 26:663-678.

EPPO/CABI, 2011. *Erwinia chrysanthemi*. Quarantine Pests for Europe. 2nd edition. Disponible en: http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia_chrysanthemi/ERWICH_ds.pdf (Consultado el 20 marzo de 2011).

Eun, A.J.C., M. L. Seoh and S. M. Wong. 2000. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan_ real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 87: 151–160.

Farmacopea Europea 5.8 (2007): Mycoplasmas. Appendix 2.6.7.

Franco C. Y., N. M. Stefanova. 2008. Determinación de actividades enzimáticas implicadas en la virulencia de cepas de *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* aisladas de papa. *Revista Agrosur*. La Habana, Cuba. 36 (3) 130-136.

Gachon, C., A . Mingam., B. Charrier. 2004. Real –time PCR: what relevance to plant studies?. *Journal of Experimental Botany*. Volume 55: Pp. 1445-1454.

Hauben, L., E. R. B. Moore., L. Vauterin., M. Steenackers., J. Mergaert., L. Verdonck., J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology* 21:384-397.

Henegariu, O. (2000): PCR <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>.

Henson, J. M., R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual review of Phytopathology* 3:81-109.

Hermansson, A. and P. E. Lindgren. 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 972–976.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G, Watson R. 1993 *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. *Bio/technology* 11,1026–1030.

Hugouvieux, N. C. P., H. Dominguez., J. R. Baudouy. 1992. Environmental conditions affect transcription of the pectinase genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* 174(23): 7807–7818.

Ipolito A., L. Schena., F. Nigro. 2002. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. European Journal of Plant Pathology 108: 855-868.

Janse, J. D. 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. EPPO Bull. 18:343-351.

King, E. O., W. K. Ward., D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44:301-307.

Kjell Kleppe et al (1971): Studies on polynucleotides XCVL. Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases, Journal Molecular Biology 56,341-361.

Korimbocus, J., D, Coates., I, Barker and N, Boonham. 2002. Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. Journal of Virological Methods 103: 109–120.

Lelliot, R. A. and D.E. Stead. 1987. Methods for the Diagnosis of bacterial Diseases of Plants. Vol. 2. British Society for Plant Pathology. 216 p.

Lievens, B., and B. P. H. J. Thomma. 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. Phytopathology 95:1374-1380.

Lozada, M. 2002. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos11/tamau/tamau.shtml>.

Mas, E., J. J. Poza., J. Ciriza., P. Zaragoza., C. Rodellar. 2001. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). AquaTIC. 15.

Nassar A., A Darrasse., M Lemattre., A Kotoujansky., C Dervin., R Vedel., Y. Bertheau. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. Applied and Environmental Microbiology 62(7):2228-2235.

Ngwira N, Samson R, 1990. *Erwinia chrysanthemi*: description of two new biovars (bv 8 and bv 9) isolated from kalanchoe and maize host plants. *Agronomie*, 10 (4): 341-345.

Nogva, H. K., Drømtorp, S. M., Nissen, H., and Rudi, K. 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques* 34:804-813.

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2004): Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Office International Des. Epizooties, Chapter 1.1.4. pp: 1-10.

Practical Molecular Biology. 2003. PCR Optimization. <http://www.molbiol.ru/eng/>.

Prasad, M., y S.K. Sinha. 1977. Application and standardization of various procedures for inoculation of maize by *Erwinia carotovora* f. sp. *zeae*. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 2, 132(1):75-80.

Promega Protocols and Applications Guide (2005): Nucleic Acid Amplification. Chapter 1. www.promega.com/paguide/.

Promega Technical Bulletin (2005): PCR Core Systems. Instructions for use of products M7660 and M7665. www.promega.com/tbs/tb254/tb254.html.

Rees, W. A., T. D. Yager., J. Korte., y P.H. Von. 1993. Betaine Can Eliminate the Base Pair Composition Dependence of DNA Melting. *Biochemistry* 32: 137-144.

Rudi, K., B. Moen., S. M. Drømtorp., A. L. Holck. 2005. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1018- 1024.

Sambrook, J., E. F. Fritsch., T. Maniatis. 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2nd edition). Cold Spring Harbor, New York. 789 p.

Samson, R., J. B. Legendre., R. Cristen., L. S. Fisher., W. Achouak., L. Gardan. 2005 Transfer of *pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.*, 1953) Brenner *et al.*, 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* com. nov and *Dickeya paradisiaca* com. nov. And deliniation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffebanchiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1415-1427.

Samson, R., N. Ngwira, N. Rivera. 1990. Biochemical and serological diversity of *Erwinia chrysanthemi*. Proceedings of the seventh International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Hungary. Plant Pathogenic Bacteria, Z. Klement ed. 895-900.

Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd. Edition. The American Phytopathological Society. 567p.

Schaad, N. W. and R. D. Frederick. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. Canadian Journal of Plant Pathology 24: 250–258.

Schaad, N. W., J. B. Jones., W. Chun (eds). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 3rd ed. APS Press. USA. 373p.

Schaad, N. W., R. D. Frederick., J. Shaw., W. L. Schneider., R. Hickson., M. D. Petrillo and D.G. Luster. 2003. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. Annual Review of Phytopathology 41:305–324.

Schaad, N. W., Y. Berthier-Schaad., A. Sechler., and D. Knorr. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Dis. 83:1095-1100.

Schena, L. y A. Ippolito. 2003. Rapid and sensitive detection of *Rosellinia necatrix* in roots and soils by real time Scorpion- PCR. Journal of Plant Pathology 85: 15–25.

Schena, L., F. Nigro and A. Ippolito. 2002. Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. European Journal of Plant Pathology 108: 355–366.

Schena, L., F. Nigro., A. H. Gallitelli., D. Gallitelli. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. European Journal of Plant Pathology 110:893-908, 2004.

Schoen, C.D., D. Knorr and G. Leone. 1996. Detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by immunocapture and a fluorogenic 5¢ nuclease RT-PCR assay. *Phytopathology* 86: 993–999.

Singleton, P. 2000. *DNA Methods in Clinical Microbiology*. Kluwer Academic Publishers, Boston.

Sistema de Información Agropecuaria (SIAP). 2010. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. SAGARPA. México. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob/mx> (Revisado: 29 agosto de 2010).

Smid, E. J., A. H. J. Jansen., L. G. M. Gorris. 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. *Plant Pathology* 44(6):1058-1069.

Taylor, E. J. A., J. Bates., D. Kenyon., M. Maccaferri and J. Thomas. 2001. Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. *Journal of Plant Pathology* 83: 75–81.

Thind, B. S., M. M. Payak. 1978. Epidemiological studies of bacterial stalk rot of maize (*Zea mays* L.) incited by *Erwinia chrysanthemi* Burkh. *et al.*, corn pathotype. *Phytopathologia Mediterranea* 17(1):59-62.

Thomson, S. V., D. C. Hildebrand., M. N. Schroth. 1981. Identification and nutritional differentiation of the *Erwinia* sugar beet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 71: 1037-1042.

Valadez, M. E., G. Kahl. 2000. Huella de ADN en el Genoma de Plantas, UACH-Fitotecnia, México, p147.

Waleron, M., K. Waleron., A. J. Podhajska., E. Lojkowska. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology (Reading)*, 148(2):583-595.

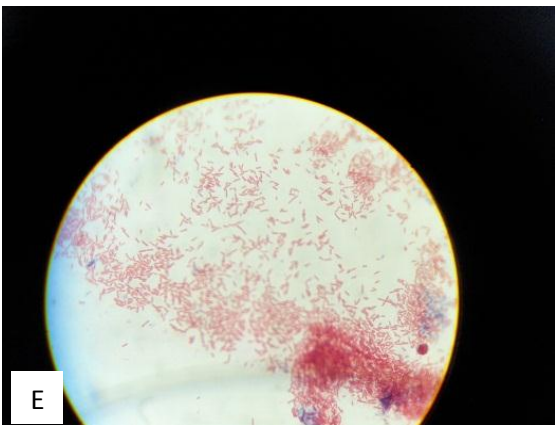
Wayne, L.G., D.J. Brenner., R.R. Colwell., P.A.D. Grimont., O. Kandler., M.I. Krichevsky., L.H. Moore., W.E.C. Moore., R.G.E. Murray., E. Stackebrandt., M.P. Starr., H.G. Trüper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:463-464.

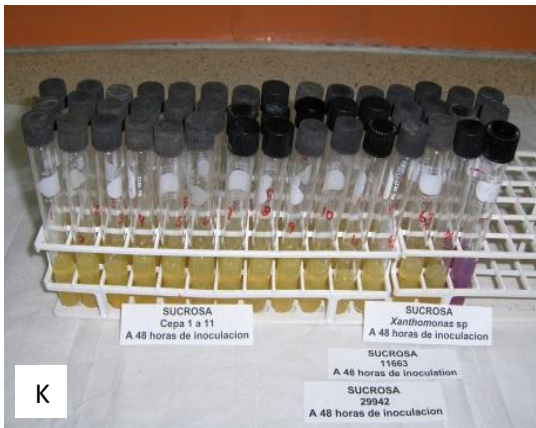
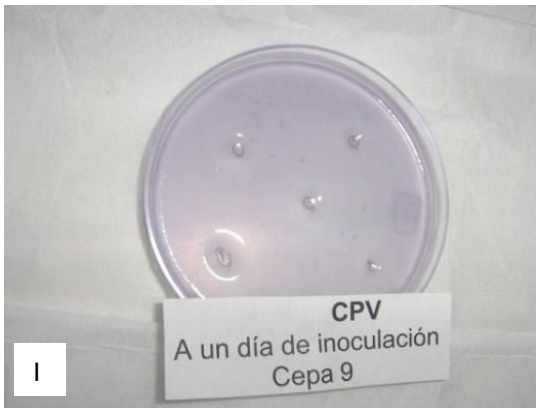
Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N and Stead DE (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (Taq-Man) assay. Applied and Environmental Microbiology 66:2853–2858.

Zaccardelli, M., M. Scortichini., F. Campanile., L Sigillo., S. Loreti. 2010. Metodi avanzati di diagnosi fitobatterologica.

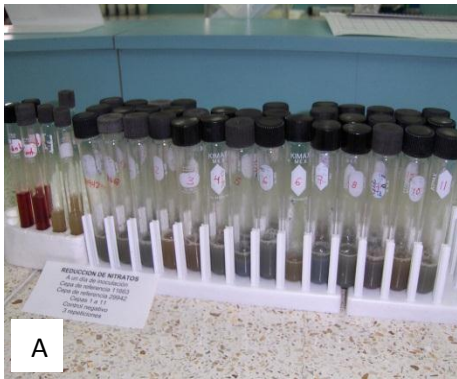
7. ANEXOS.

Pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas para *Erwinia* spp. A. Ribosa, B. Crecimiento en DIM agar, C. Ureasa, D. YDC, E. Tinción de GRAM, F. Hugh and Leifson. G. Catalasa, H. Arabinosa, I. CPV, J. Ribosa, K. Sucrosa, L. Galactosa.





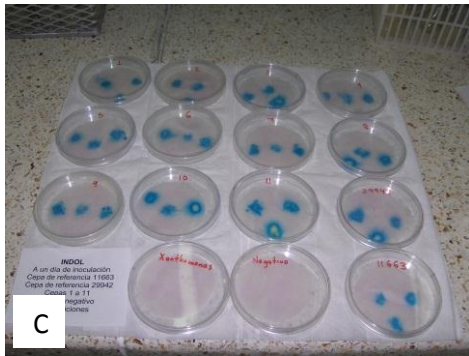
Pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas para *E. chrysanthemi* pv *zoeae*. A. Reducción de nitratos, B. Melibiosa, C. Indol, D. Actividad fosfatasa, E. Rafinosa, F. Utilización de citrato, G. Utilización de keto-metyl glucoside, H. Sensibilidad a Eritromicina, I. Produce H₂S₂, J pudrición en papa.



A



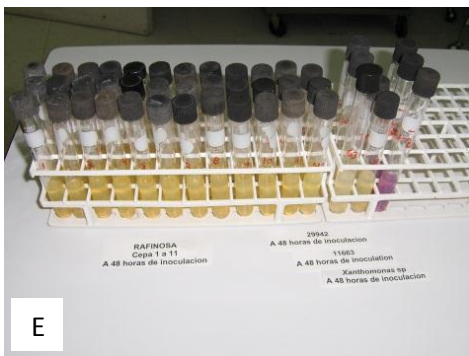
B



C



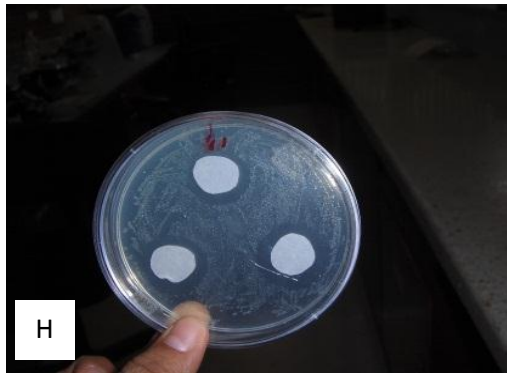
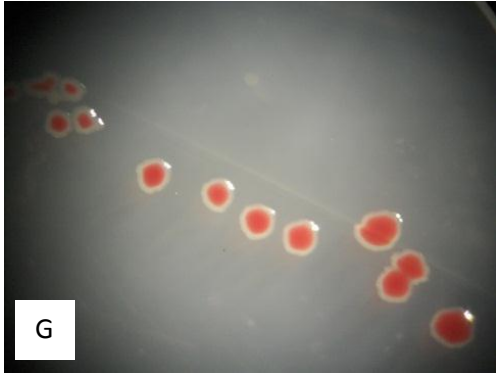
D



E



F



Cuadro 1. Validación de *Xanthomonas translucens* pv *undulosa* como control negativo.

Num. pozo	RED Taq Read y Mix (μL)	Agua PCR (μL)	Concentración iniciadores 1 μL c/u	Concentración de ADN <i>X. translucens</i> pv <i>undulosa</i> (1 μL)	Temperatura (°C)	Amplificación
1	10	7	1 μM	Sin diluir	55	No
2	10	7	1 μM	Sin diluir	58	No
3	10	7	1 μM	Sin diluir	61	No
4	10	7	1 μM	Sin diluir	64	No
5	10	7	1 μM	1:10	55	No
6	10	7	1 μM	1:10	58	No
7	10	7	1 μM	1:10	61	No
8	10	7	1 μM	1:10	64	No
9	10	7	1 μM	1:100	55	No
10	10	7	1 μM	1:100	58	No
11	10	7	1 μM	1:100	61	No
12	10	7	1 μM	1:100	64	No
13	10	7	1 μM	1:1000	55	No
14	10	7	1 μM	1:1000	58	No
15	10	7	1 μM	1:1000	61	No
16	10	7	1 μM	1:1000	64	No
17	10	7	0.5 μM	Sin diluir	55	No
18	10	7	0.5 μM	Sin diluir	58	No
19	10	7	0.5 μM	Sin diluir	61	No
20	10	7	0.5 μM	Sin diluir	64	No
25	10	7	0.5 μM	1:10	55	No
26	10	7	0.5 μM	1:10	58	No
27	10	7	0.5 μM	1:10	61	No
28	10	7	0.5 μM	1:10	64	No
29	10	7	0.5 μM	1:100	55	No
30	10	7	0.5 μM	1:100	58	No
31	10	7	0.5 μM	1:100	61	No
32	10	7	0.5 μM	1:100	64	No
33	10	7	0.5 μM	1:1000	55	No
34	10	7	0.5 μM	1:1000	58	No
35	10	7	0.5 μM	1:1000	61	No
36	10	7	0.5 μM	1:1000	64	No
37	10	7	0.1 μM	Sin diluir	55	No
38	10	7	0.1 μM	Sin diluir	58	No
39	10	7	0.1 μM	Sin diluir	61	No
40	10	7	0.1 μM	Sin diluir	64	No
37	10	7	0.1 μM	1:10	55	No
38	10	7	0.1 μM	1:10	58	No
39	10	7	0.1 μM	1:10	61	No
40	10	7	0.1 μM	1:10	64	No
41	10	7	0.1 μM	1:100	55	No
42	10	7	0.1 μM	1:100	58	No
43	10	7	0.1 μM	1:100	61	No
44	10	7	0.1 μM	1:100	64	No
45	10	7	0.1 μM	1:1000	55	No
46	10	7	0.1 μM	1:1000	58	No
47	10	7	0.1 μM	1:1000	61	No
48	10	7	0.1 μM	1:1000	64	No
49	10	7	29942 0.1 μM	1:100	64	Si
50				M-DNA ladder 100pb		

Cuadro 2. Determinación de la temperatura y la concentración de ADN de *E. chrysanthemi* pv *zeae*.

Núm. pozo	RED Taq Read y Mix (µL)	Agua PCR	Cepa	Iniciadores 1 µL c/u	ADN 1 µL	Temperatura (° C)	Amplificación
1	10	7	29942	1 µM	Sin diluir	55	no
2	10	7	29942	1 µM	Sin diluir	58	no
3	10	7	29942	1 µM	Sin diluir	61	no
4	10	7	29942	1 µM	Sin diluir	64	no
5	10	7	29942	1 µM	1:10	55	si
6	10	7	29942	1 µM	1:10	58	si
7	10	7	29942	1 µM	1:10	61	si
8	10	7	29942	1 µM	1:10	64	si
9	10	7	29942	1 µM	1:100	55	si
10	10	7	29942	1 µM	1:100	58	si
11	10	7	29942	1 µM	1:100	61	si
12	10	7	29942	1 µM	1:100	64	si
13	10	7	29942	1 µM	1:1000	55	no
14	10	7	29942	1 µM	1:1000	58	no
15	10	7	29942	1 µM	1:1000	61	no
16	10	7	29942	1 µM	1:1000	64	no
17	10	7	29942	0.5 µM	Sin diluir	55	no
18	10	7	29942	0.5 µM	Sin diluir	58	no
19	10	7	29942	0.5 µM	Sin diluir	61	no
20	10	7	29942	0.5 µM	Sin diluir	64	no
21	10	7	29942	0.5 µM	1:10	55	si
22	10	7	29942	0.5 µM	1:10	58	si
23	10	7	29942	0.5 µM	1:10	61	si
24	10	7	29942	0.5 µM	1:10	64	si
25	10	7	29942	0.5 µM	1:100	55	si
26	10	7	29942	0.5 µM	1:100	58	si
27	10	7	29942	0.5 µM	1:100	61	si
28	10	7	29942	0.5 µM	1:100	64	si
29	10	7	29942	0.5 µM	1:1000	55	no
30	10	7	29942	0.5 µM	1:1000	58	no
31	10	7	29942	0.5 µM	1:1000	61	no
32	10	7	29942	0.5 µM	1:1000	64	no
33				M-DNA ladder 100pb			

Cuadro 3. Determinación de concentración de ADN de *E. chrysanthemi* pv *zetae*, concentración de los iniciadores ADE1 y ADE2, y temperatura.

Núm pozo	RED Taq Ready Mix (µL)	Agua PCR	Cepa	Concentración de iniciadores 1 µL c/u	Concentración de ADN 1 µL	Temperatura (° C)	Amplificación
9	10	7	29942	1 µM	1:10	55	si
10	10	7	29942	1 µM	1:10	58	si
11	10	7	29942	1 µM	1:10	61	si
12	10	7	29942	1 µM	1:10	64	si
13	10	7	29942	1 µM	1:100	55	si
14	10	7	29942	1 µM	1:100	58	si
15	10	7	29942	1 µM	1:100	61	si
16	10	7	29942	1 µM	1:100	64	si
25	10	7	29942	0.5 µM	1:10	55	si
26	10	7	29942	0.5 µM	1:10	58	si
27	10	7	29942	0.5 µM	1:10	61	si
28	10	7	29942	0.5 µM	1:10	64	si
29	10	7	29942	0.5 µM	1:100	55	si
30	10	7	29942	0.5 µM	1:100	58	si
31	10	7	29942	0.5 µM	1:100	61	si
32	10	7	29942	0.5 µM	1:100	64	si
33	10	7	29942	0.1 µM	1:10	55	no
34	10	7	29942	0.1 µM	1:10	58	no
35	10	7	29942	0.1 µM	1:10	61	no
36	10	7	29942	0.1 µM	1:10	64	no
37	10	7	29942	0.1 µM	1:100	55	no
38	10	7	29942	0.1 µM	1:100	58	no
39	10	7	29942	0.1 µM	1:100	61	no
40	10	7	29942	0.1 µM	1:100	64	si
41				M-DNA ladder 100pb			