

Implementación de una técnica molecular de diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) en semillas analizadas en el Laboratorio de sanidad de germoplasma del CIAT.

María del Socorro Balcázar¹, M. Cuervo².

¹ Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), km 17, Recta Cali-Palmira, Palmira.
 Correo electrónico: m.balcazar@cgiar.org
² Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

INTRODUCCIÓN:

El Programa de Recursos Genéticos (PRG) del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) tiene como misión proteger y conservar la diversidad genética de las colecciones más grandes del mundo para frijol, yuca y forrajes tropicales. Anualmente, el PRG distribuye de 5.000 a 9.000 accesiones, a investigadores, agricultores e instituciones en Colombia y otros países del mundo. La conservación y distribución de germoplasma involucra diferentes actividades dentro de las cuales la sanidad es un factor determinante. La distribución de semillas por parte del PRG del CIAT tiene entre sus prioridades la distribución de material sano. Para cumplir esta prioridad se realizan pruebas sanitarias para la detección de hongos, bacterias y virus. Los métodos moleculares constituyen una herramienta de diagnóstico oportuno para los patógenos de importancia cuarentenaria.

El marchitamiento bacteriano del frijol es una enfermedad vascular causada por la bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*(Cff). (1), un patógeno cuarentenario que infecta la semilla de frijol (Fig. 1) a través de heridas en los tejidos vegetales y las aberturas naturales (2). Los síntomas típicos de la enfermedad son: marchitamiento, amarillamiento de las hojas, retraso del crecimiento y muerte de la planta (Fig. 2). El marchitamiento de las hojas es más evidente durante las horas más calurosas del día las cuales pueden regresar a la turgencia durante la noche (3), (Fig. 3). La enfermedad fue descrita por primera vez por Hedges (1) y en Colombia se identificó por primera vez en el Valle del Cauca en 1983 (4).

El Laboratorio de Sanidad de Germoplasma del PRG del CIAT tiene la responsabilidad de certificar que el germoplasma distribuido esté libre de este patógeno de interés cuarentenario. Por lo tanto, es de nuestro más alto interés contar con metodologías eficientes y eficaces para el análisis de los materiales a distribuir.

OBJETIVO:

Implementar un protocolo basado en la técnica molecular de PCR para la detección rápida, sensible y específica de Cff en semillas de frijol y pastos tropicales.

MATERIALES Y METODOS:

Las colonias utilizadas para la implementación de esta técnica molecular se hicieron crecer en medio de cultivo agar nutriente.

A partir de estas se realizaron diluciones en agua destilada estéril.

Como controles positivos fueron utilizadas colonias de Cff, (Fig. 4). Como controles negativos se usaron colonias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* y *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*,

Para la detección de Cff en muestras de frijol y pastos tropicales, se usó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los cebadores CFFOR2 (GTTATGACTGAACCTCCTCC) y CFFREV4 (GATGTTCCCGGTGTTCCAG) diseñados por Tegli S, Sereni A, Surico G., (6) mediante los cuales se amplifica un fragmento de ADN de 550 pb.

Para la realización del PCR se utilizó 2.5 µl de la suspensión celular con unas concentraciones finales de: 0,2 mM de cada cebador, 1 µl de Taq DNA polimerasa y 25 mM dNTPs, a un volumen final de 25 µl. La reacción consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos y 34 ciclos que consisten de una desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 55 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Adicionalmente se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

RESULTADOS:

En las muestras positivas se observa el fragmento esperado de 550 pb, indicando la presencia de CFF, Fig (5) líneas 1 a 4.

No se observó amplificación de ADN en las reacciones de los controles negativos, (Fig. 5) líneas 5 a 8.

CONCLUSIONES:

La implementación exitosa de esta metodología en el Laboratorio de Sanidad de Germoplasma del PRG del CIAT permite ahora realizar una detección rápida sensible y específica del Cff en semillas de frijol y pastos tropicales, superando los problemas de las técnicas convencionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Hedges, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* nov. sp. Science, Washington, v.55, n.1, p.433-434, 1922.
- Dinesen, I.G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plant (*Phaseolus vulgaris*). International Conference Plant Pathogenic Bacteria, Washington, v.2, p.929-33, 1978.
- Rava, C.A.; Costa, J.G.C. Reação de cultivares de feijoeiro comum à Murcha-de-curtobacterium. In: Reunião Sul-Brasileira de Feijão, Reunião Anual Paranaense de Feijão, 2001, Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, p.55-56, 2001
- Torres G. C.; Lenne, J.M.; Victoria, J.I. Bacterial wilt of *Zornia* spp. caused by *Corynebacterium flaccumfaciens* Plant pathogenic bacteria, Lozano, J.C. Gwin, P. (eds).- Cali (Colombia): CIAT, - ISBN 84-89206-21-X. p. 74-79. 1981.
- Guimarães, P.M.; Smith, J.J.; Palmano, S.; Saddler, G.S. Characterization of *Curtobacterium flaccumfaciens* pathovars by AFLP-prep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v.109, p.817-825, 2003.
- Tegli S, Sereni A, Surico G. PCR based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. Letters Apply Microbiology. ;35(4):331-337. 2002.



Figura 1.



Figura 2.



Figura 3.



Figura 4.



Figura 5.