

Diagnostico Molecular de *B. glumae* y *B. gladioli* en semillas de Arroz



Laboratorio de Patología de Arroz

Paola Fory; Daniela Bravo; Girena Aricapa; Gustavo Prado;
Gloria Mosquera

Procesamiento de muestras de arroz

Materiales

- ❖ Mechero de alcohol.
- ❖ Tubos de vidrio con tapa estériles o erlemeyers de 50 ml
- ❖ Alcohol al 70 y 96%.
- ❖ Micropipetas: 2-20 μ l; 10- 100 μ l; 20-200 μ l, 100-1000 μ l.
- ❖ Puntas para micropipetas.
- ❖ Pinzas
- ❖ Morteros y pistilos
- ❖ Tubos para microcentrifuga de 1.5 y 0.2 ml
- ❖ Medio de solido de King-B solido en cajas de Petri estériles
- ❖ Medios de cultivos de LB liquido estériles en frascos con tapa rosca
- ❖ Agua destilada estéril.

Equipos

- ❖ Stratalinker o lámpara UV con un poder mínimo de 80,000 μ J/cm²
- ❖ Incubadora a 28°C.
- ❖ Incubadora con agitación
- ❖ Termociclador.
- ❖ Cámara de flujo laminar.
- ❖ Espectrofotómetro.
- ❖ Baño maría a 80°, 65° y 37°C.
- ❖ Microcentrifuga.

Medios y reactivos

Medio LB liquido (g/l)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Ajustar el pH: 7.0 con NaOH	

Medio King-B (g/l)

Peptona	20 g
Agar	15 g
MgSO	1.5 g
KCl	1.5 g
Glicerol	10 ml

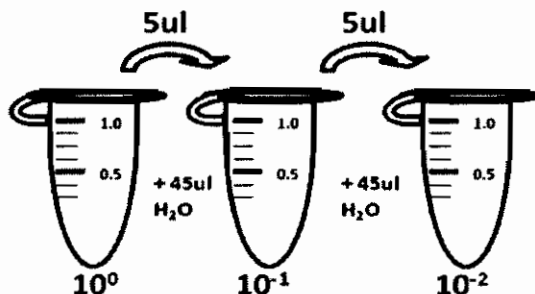
Preparación de las muestras

- 1) Tome 10 semillas de arroz con presencia de síntomas de la enfermedad y depositelas en un tubo estéril de 1.5 ml.
- 2) Asegúrese de contar con morteros y pistilos previamente esterilizados. Irrádíelos con luz UV ($80,000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) durante 15 minutos para degradar todo vestigio de DNA. En su defecto colocar los morteros y pistilos limpios en una solución de hipoclorito de sodio 1% por 1 hora. Luego enjuagar con abundante agua y autoclavar.
- 3) En cámara de flujo laminar macere cada muestra en seco con el fin de triturar lo mejor posible el material*, posteriormente adicione 500 μl de agua destilada estéril.

*/ Debe tener en cuenta que en el caso de la enfermedad producida por *B. glumae* uno de los síntomas característicos es la esterilidad (semilla vana). Por ende la no presencia de grano hace que la maceración del tejido se torne un poco dispendiosa.

- 4) Deposite nuevamente el macerado en el tubo 1.5 y homogenice la muestra con Vórtex durante 5 min.
- 5) Centrifugue rápidamente (Spin) durante 5 segundos y deposite el sobrenadante rápidamente en un tubo 1.5 ml.
- 6) Centrifugue a 10.000 rpm durante 5 min para concentrar la muestra. Reduzca el volumen a 100 μl aproximadamente y resuspenda por agitación leve.
- 7) Haga diluciones seriadas de cada una de las muestras. En una cámara de flujo laminar tome 5 μl del macerado obtenido en la preparación de las muestras (1×10^0) y haga diluciones seriadas (1×10^{-1} , 1×10^{-2}) en 45 μl de agua destilada estéril como se indica en la siguiente figura.

Nota: Asegúrese de resuspender adecuadamente la muestra por medio de agitación leve.

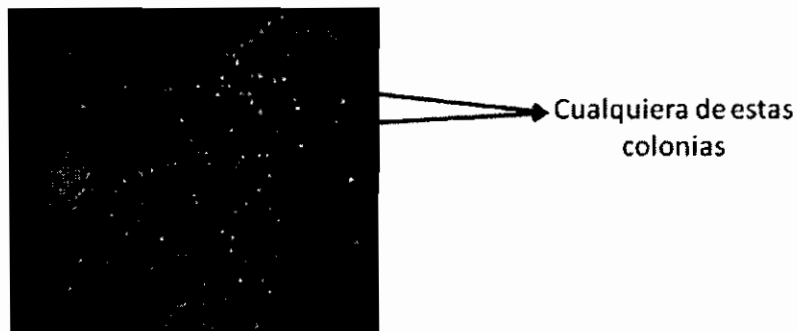


NOTA: A partir de las diluciones seriadas obtenidas, se pueden realizar paralelamente dos procedimientos:

- 1) Obtención y almacenamiento de colonias sugestivas de *B. glumae/gladioli* para diagnóstico convencional.
- 2) Detección de *B. glumae/gladioli*, mediante método molecular basado en PCR.

Obtención y almacenamiento de colonias sugestivas de *B. glumae/gladioli*

- 1) Tome 10 µl de cada una de las diluciones y siembre por agotamiento en cajas de Petri con medio King-B. Incube las cajas por 48 horas a 28 °C.
- 2) Seleccionar las colonias típicas a *B. glumae* o *gladioli* (pigmentadas y no pigmentadas) y siembre por agotamiento en una nueva caja de petri para su purificación (Obsevar foto). Incubar de nuevo por 48h a 28°C.



- 3) Tome con una pinza estéril una punta para micropipeta y pique una de las colonias purificadas y siembre en 3 ml de medio LB estéril (Bactotripton 10%, extracto de levadura 5%, cloruro de sodio 10%). Alternativamente se pueden usar palillos esteriles en lugar de puntas de micropipeta para transferir la colonia al medio líquido, si se usa esta opción tener en cuenta de no dejar el palillo en el medio durante la incubación.

Nota: Es necesario que tenga un control negativo para asegurarse que no se presentara ninguna contaminación durante el procedimiento. Para ello repita este procedimiento sin picar ninguna colonia.

- 4) Incube por 24 horas a 28°C en agitación constante a 250 rpm.
- 5) Una vez crecidas, 1mL del medio inoculado se transfiere a tubos eppendorf de 2.0 mL estéril que contiene 1mL de glicerol 60% y se homogeniza, luego

la mezcla se reparte en dos tubos eppendorf de 2.0 mL estéril. Un tubo se destinó a la colección de trabajo y el otro a la colección de reserva, almacenando separadamente a -80°C.

Detección de *B. glumaelgladioli*, mediante método molecular basado en PCR

Nota. Es importante tener en cuenta que según el grado de afección causado por la bacteria, el laboratorio de patología de arroz adecuo 3 metodologías de evaluación:

- 1) Lisis directa, se utiliza si se observa que la semilla presenta síntomas típicos de la enfermedad y presenta alta incidencia de grano totalmente vano.
- 2) Extracción de ADN genómico total, si se observa semilla con grano lleno y se observan síntomas leves o no síntomas visibles (concentraciones bajas de la bacteria). Esta metodología generalmente se usa para certificar semilla.
- 3) Extracción de ADN bacterial de colonias sugestivas, en caso de que los dos métodos anteriores den negativos.

1) LISIS DIRECTA

1. Tome 100 µl de cada una de las diluciones preparadas inicialmente y deposite el contenido en un tubo para PCR de 0.2 ml. Denature la muestra usando el termociclador a 95°C durante 8 minutos.
2. Deje a temperatura ambiente durante 5 minutos. Agregue 3ul de esta suspensión al coctel de PCR.

Para la detección específica de *B. glumae* y *B. gladioli* mediante PCR se usaron cebadores específicos de las regiones espaciadoras 16S-23S del ADN ribosomal (Ver tabla).

Secuencias específicas de los cebadores utilizados en la detección molecular de *B. glumae* y *B. gladioli*.

Nombre	Autor	Secuencia	Pb	Especie
GL-13F (1.1)	Takeuchi <i>et al</i> , 1997	5'-ACA CGG AAC ACC TGG GTA- 3'	400 bp	<i>B. glumae</i>
GL14R (1.2)		5'-TCG CTC TCC CGA AGA GAT -3'		
F (4.1)	Sayler <i>et al.</i> , 2006	5'-ACG TTC AGG GAT RCT GAG CAG-3'	286 bp	
R (4.2)		5'-AGT CTG TCT CGC TCT CCC GA-3'		
Glad F	Furuya <i>et al.</i> , 2002	5'-CGAGCTAATACCGCGAAA-3'	300pb	<i>B. gladioli</i>
Glad R		5'-AGACTCGAGTCAACTGA-3		

Concentraciones y volúmenes requeridos para la preparación del coctel de PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Reacción x 1 muestra (µL)
H2O destilada estéril	-	-	13.65
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	25mM	1.5mM	1.5
dNTPs	20mM	0.2mM	0.25
Forward 1	2 µM	0.16 µM	2
Reverse 2	2 µM	0.16 µM	2
Taq DNA Polimerasa	5 U/ µL	0.5 U	0.1
ADN (Lisado)			3
			25

Programa de PCR para la amplificación de una secuencia específica de *B. glumae*

Paso	Temperatura	
1	94 °C x 2 min	
2	94 °C x 1 min	29 Ciclos
3	57 °C x 45 seg	
4	72 °C x 1 min	
5	72 °C x 7 min	
6	10 °C x 10 min	
	END	

2) Extracción de DNA de Semillas de Arroz

PROCEDIMIENTO

Para la extracción de DNA en semillas de arroz, se siguió el protocolo de extracción sugerido por la casa comercial para la purificación de DNA genómico de levaduras y tejidos vegetales (Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) modificado), con algunas modificaciones.

- 1) Tome el concentrado obtenido en el paso 6 del procedimiento para la preparación de muestras anteriormente mencionado y adicione 300 µl del buffer de lisis (Nuclei Lysis).
- 2) Mezcle con vortex e Incube a 65 °C durante 15 minutos en baño maría.

- 3) Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 min y adicione 1.5 μl de RNasa (4mg / μl) e incubar a 37 °C durante 20 minutos (en baño maría o incubadora).
- 4) Dejar enfriar nuevamente la muestra a temperatura ambiente durante 5 min y adicione 100 μl de la solución para la precipitación de proteínas (**Protein Precipitation**) y homogenice la muestra con vortex durante 30 segundos.
- 5) Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos.
- 6) Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso es fundamental para obtener un ADN limpio, se debe evitar recuperar material de la difase que se forma; recupere con una pipeta de 200 μl sólo el 70% del sobrenadante: tendrá menos ADN pero más limpio.
- 7) Precipite el DNA adicionando 300 μl de etanol absoluto frio y 30 μl de acetato de sodio 3M, mezcle por inversión de los tubos. Dejar reposar durante 1 hora a -20°C.
- 8) Centrifugue a 14.000 rpm por 15 minutos.
- 9) Descartar el isopropanol y adicionar 300 μl de etanol al 70% frio.
- 10) Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos y elimine el sobrenadante. Deje secar los tubos a temperatura ambiente invirtiéndolos sobre una toalla de papel. (30 minutos)
- 11) Resuspenda el DNA en 30 μl de agua destilada estéril.

Concentraciones y volúmenes requeridos para la preparación del coctel de PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Reacción x 1 muestra ^{****} (μL)
H2O destilada estéril	-	-	12.65
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	25mM	1.5mM	1.5
dNTPs	20mM	0.2mM	0.25
Forward 1 ^{***}	2 μM	0.16 μM	2
Reverse 2 ^{***}	2 μM	0.16 μM	2
Taq DNA Polimerasa	5 U/ μL	0.5 U	0.1
ADN (semilla)	50ng/ μL	200ng	4
			25

3)EXTRACCIÓN DE DNA BACTERIAL

Se empleo el kit comercial "Wizard® Genomic DNA Purification Kit Plus" de Promega, se siguió el protocolo de extracción sugerido por la casa comercial para aislamiento de DNA genómico para bacterias gram negativas de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

PROCEDIMIENTO

- 1) Tome 1.5 ml de la suspensión bacteriana obtenida en el paso 4 del procedimiento **Obtención y almacenamiento de colonias sugestivas de *B. glumae/gladioli***. También se puede usar cultivo recuperado de crecimiento bacteriano fresco en medio sólido homogenizado en agua destilada estéril. Asegurarse de no utilizar exceso de bacteria que impedirá la efectividad del buffer de lisis.
- 2) Recupere la bacteria por centrifugación a 11.000 rpm durante 1 minuto. Descarte el sobrenadante y adicione 300 µl del buffer de lisis (**Nuclei Lysis**).
- 3) Mezcle con vortex e Incube a 80 °C durante 5 minutos en baño maría.
- 4) Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 min y adicione 1.5 µl de RNasa (4mg /µl) e incubar a 37 °C durante 20 minutos (en baño maría o incubadora).
- 5) Dejar enfriar nuevamente la muestra a temperatura ambiente durante 5 min y adicione 100 µl de la solución para la precipitación de proteínas (**Protein Precipitation**) y homogenice la muestra con vortex durante 30 segundos.
- 6) Deje en hielo durante 5 minutos y centrifugue a 13.000 rpm durante 3 minutos.
- 7) Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso es fundamental para obtener un ADN limpio, se debe evitar recuperar material de la difase que se forma; recupere con una pipeta de 200 µl sólo el 70% del sobrenadante: tendrá menos ADN pero más limpio.
- 8) Precipite el DNA adicionando 300 µl de etanol absoluto frío y 30 µl de acetato de sodio 3M, mezcle por inversión de los tubos. Dejar reposar 1 hora a -20°C.
- 9) Centrifugue a 13.000 rpm por 15 minutos.
- 10) Descartar el isopropanol y adicione 300 µl de etanol al 70% frío.
- 11) Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos y elimine el sobrenadante. Deje secar los tubos a temperatura ambiente invirtiéndolos sobre una toalla de papel (30 minutos)
- 12) Resuspenda el DNA en 150 µl de agua destilada estéril

Concentraciones y volúmenes requeridos para la preparación del coctel de PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Reacción x 1 muestra ^{***} (μL)
H2O destilada estéril	-	-	15.15
Buffer de PCR [*]	10X	1X	2.5
MgCl ₂ [*]	25mM	1.5mM	1.5
dNTPs	20mM	0.2mM	0.25
Forward 1 ^{**}	2 μM	0.16 μM	2
Reverse 2 ^{***}	2 μM	0.16 μM	2
Taq DNA Polimerasa [*]	5 U/ μL	0.5 U	0.1
ADN (semilla)	5ng/μL	10ng	1.5

EXTRACCIÓN DE DNA BACTERIAL CON Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) ®

El CTAB es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran magnitud molecular, y tiene propiedades detergentes; se conocen con el nombre de jabones invertidos, debido a que su actividad superficial se debe a la presencia de un ion positivo y no a uno negativo, como sucede en los sulfatos de alquilo e hidrógeno, que son los detergentes usuales.

PROCEDIMIENTO

(Protocolo modificado por Laboratorio de Patología de Forrajes del CIAT).

1. Tome 1.5 ml de la suspensión bacterial obtenida en el paso 4 del procedimiento **Obtención y almacenamiento de colonias sugestivas de B. glumae/gladioli**. También se puede usar cultivo recuperado de crecimiento bacterial fresco en medio sólido homogenizada en agua destilada estéril. Adicionar 800 μl de Buffer de extracción y mezclar durante 10 segundos con vórtex.

Buffer de Extracción.

CTAB	2%	2 gr
EDTA 0.5M pH 8.0	20 mM	4 mL
Tris-HCl 1M pH 8.0	100 mM	10 mL
NaCl	1.4 M	8.18 gr
PVP-40	1%	1 gr
Volumen final		100 mL

Nota: Adicionar el PVP-40 minutos antes de la extracción.

2. Incubar a 65°C durante 20 minutos. Mezclar invirtiendo el tubo cada 5 minutos aproximadamente.
3. Deje los tubos 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionar 800 μl de Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol (25:24:1), mezclar por inversión no use vórtex.
4. Centrifugar a 12500 r.p.m durante 12 minutos.

5. Recupere el sobrenadante y adicione a cada muestra 3 μ l de RNasa A [10 mg/ ml] e incubar a 37 °C durante 30 minutos. Deje los tubos 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Posteriormente adicionar 650 μ l de Cloroformo: Alcohol Isoamyl (24:1) y centrifugar a 12500 r.p.m. durante 12 minutos.
7. Recupere el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml nuevo, agregue 650 μ l de isopropanol frío y 1/10 volúmenes de Acetato de Sodio (NaAc) 3 M pH 7.0 (65 μ l) para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo e incube a -20 °C toda la noche.
8. Centrifugar a 12500 r.p.m durante 20 minutos y descartar el sobrenadante.
9. Enjuague suavemente el precipitado en 500 μ l etanol al 70% frío y elimine en alcohol con cuidado de no ir a desprender el pellet.
10. Secar el pellet invirtiendo el tubo sobre una servilleta limpia. Asegurarse de no dejar restos de etanol en el tubo.
11. Resuspender en 200 μ l de buffer TE o agua.

BIBLIOGRAFÍA

Correa, F. 2005 y 2006. Asociación de la bacteria *Burkholderia glumae* al complejo acaró-hongo-bacteria en Panamá. Observaciones sobre muestras afectadas por el complejo en campos de arroz de Panamá. Aislamientos y pruebas de patogenicidad.

Furuya, N, Ura, H, Iiyama, K, Matsumoto, M, Takeshita and M, Takanami. 2002. Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S–23S rDNA spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR J Gen Plant Pathol 68: 220-224.

Nandakumar, R. Rush, M. C. Correa, F. 2007. Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with Panicle Blight Symptoms on Rice in Panama. Plant Disease. Vol 91:6.

Sayler, R, R. Cartwright, and Y. Yang. 2005. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the USA. Plant Disease 90: 603-610.

Takeuchi T, Sawada H, Suzuki F, Matsuda I. 1997. Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S–23S rDNA spacer regions. Ann Phytopathol Soc Jpn 63:455–462.