

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
EN TIEMPO REAL, Q – PCR PARA LA DETECCIÓN DE *Ralstonia solanacearum*,
SEQUEVAR 1.

TESIS
PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR
JOSE ALEJANDRO RUIZ CHUTAN
EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERO AGRÓNOMO

EN
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO

Guatemala, julio de 2013

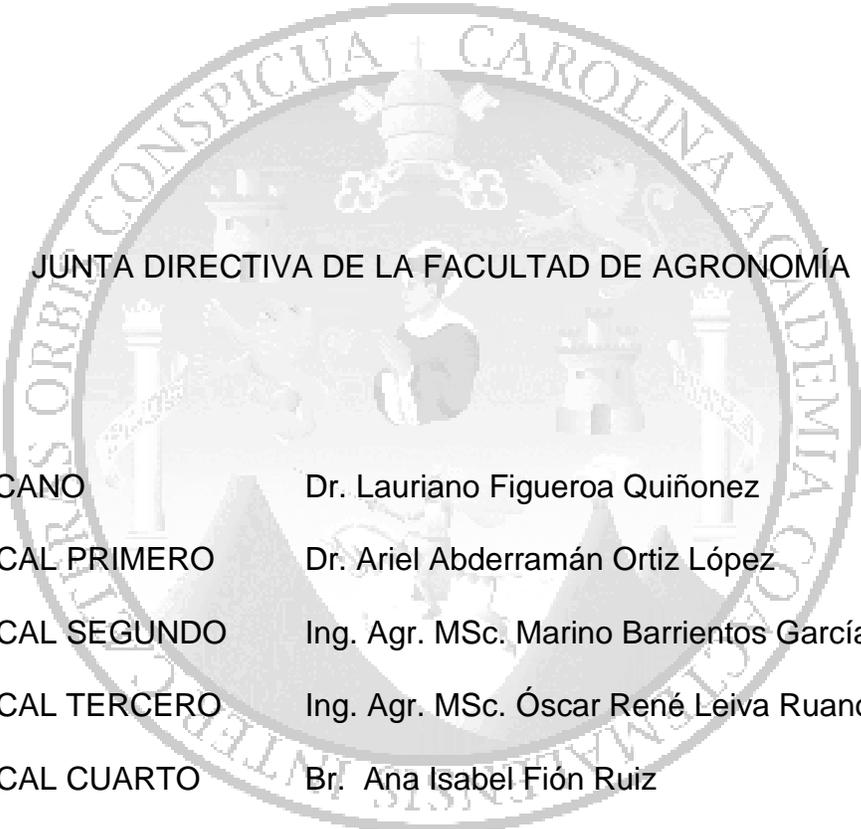
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR MAGNÍFICO

Dr. Carlos Estuardo Gálvez Barrios

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA



DECANO	Dr. Lauriano Figueroa Quiñonez
VOCAL PRIMERO	Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. MSc. Marino Barrientos García
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. MSc. Óscar René Leiva Ruano
VOCAL CUARTO	Br. Ana Isabel Fión Ruiz
VOCAL QUINTO	Br. Luis Roberto Orellana López
SECRETARIO	Ing. Agr. Carlos Roberto Echeverría Escobedo

Guatemala, julio 2013

Guatemala, julio de 2013

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala
Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el Trabajo de Graduación “Evaluación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, Q-PCR, para la detección de *Ralstonia Solanacearum*, sequevar 1.”, como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme.

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

José Alejandro Ruiz Chután

ACTO QUE DEDICO A:

- DIOS** Por concederme el don de la vida, por ser el amigo que nunca falla, el que ha estado en los momentos más felices y difíciles de mi vida. Gracias por estar siempre conmigo.
- Mis padres** Dilcia Edith Chután Alvarado por ser mi máximo ejemplo de lucha, sacrificio y amor desmedido, por permitirme alcanzar su realización a través de este logro, un logro para los dos. Héctor Fernando Ruiz Tinti por sus enseñanzas de vida, por expresarme su amor a través de su ayuda incondicional en todo mi trayecto de formación. Los amo y les agradezco infinitamente los esfuerzos, que con gran amor realizaron para que hoy alcancemos esta meta.
- Mis hermanos** Dilsya Azucena Ruiz Chután por tus cuidados, consejos, apoyo y amor fraternal. José Fernando Ruiz Chután por traer nuevamente la alegría a nuestro hogar, por demostrarme tu amor a través de tus abrazos y gestos tan sinceros e inocentes. Les agradezco ser mi motivación para mejorar cada día. Con mucho amor les comparto este logro esperando que sea un ejemplo para su superación.
- Mis abuelos** María Judith Alvarado Camas por su dedicación e incansables cuidados. Carlos Benedicto Chután Cabrera (Q.E.P.D.) como un homenaje a la persona que es mi ejemplo de superación y determinación en la vida. Berta Refugio Ruiz Castro por su ejemplo de lucha y sacrificio.
- Mi novia** Rosario del Carmen Gómez Jordán por tu apoyo incondicional en cada momento desde que llegaste a mi vida. Por ser mi gran motivación para alcanzar una vida llena de éxitos y felicidad a tu lado. Que alegría poder compartir este momento tan especial contigo.

- Mis tíos Mis tíos Irma, María Eugenia, Fernelly, Tito, Julia, Julio y Alberto. Gracias por sus consejos y apoyo para lograr concluir exitosamente esta etapa de mi vida.
- Mis primos Mis primos Gabriela, Roberto, Eduardo, Lucía, Gustavo, Gerardo, Juan Carlos, Marlen, Elizabeth, Andrea y Ana. Con mucho cariño.
- Mis amigos Mis amigos por el apoyo brindado para alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTOS A:

Fundación Kinal Por ser el ente de formación moral, espiritual y científica. Por enseñarme que el trabajo bien hecho es el distintivo de un buen cristiano.

Facultad de Agronomía y Cuerpo Docente Por abrirme sus puertas y brindarme los conocimientos científicos que me formaron como profesional de las ciencias agrícolas.

Mis asesores MSc. Amilcar Sánchez por ser mi ejemplo de formación humana y académica. Por enseñarme la importancia e influencia de las nuevas tecnologías en el campo agrícola.

Dr. David Monterroso por sus valiosos aportes a este documento con el cual culmino esta importante etapa de mi formación académica.

Agradezco a ambos la paciencia, dedicación y confianza que tuvieron en mi al aceptar asesorar mi trabajo. Dios los bendiga.

Supervisor y asesor de EPS Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte, un honor haber tenido la oportunidad de recibir sus valiosos consejos durante la carrera y el Ejercicio Profesional Supervisado, por brindarme calidad de enseñanza y sabias palabras de aliento para poder alcanzar este logro.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
1 INTRODUCCIÓN	1
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3 MARCO TEÓRICO	5
3.1 MARCO CONCEPTUAL.....	5
3.1.1 <i>Ralstonia solanacearum</i>	5
3.1.1.1 Descripción.....	5
3.1.1.2 Diversidad de <i>Ralstonia solanacearum</i> y nivel más alto de especificidad. Definición de sequevar.	6
3.1.1.3 Importancia económica	7
3.1.1.4 Distribución geográfica.....	8
3.1.2 Sintomatología	9
3.1.2.1 Papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	9
3.1.2.2 Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	10
3.1.2.3 Geranio (<i>Pelargonium sp.</i>)	11
3.1.3 Factores epidemiológicos	13
3.1.3.1 Ciclo de la enfermedad	13
3.1.3.2 Sobrevivencia de la bacteria	14
3.1.3.3 Diseminación de la bacteria	14
3.1.4 Técnicas utilizadas en la detección e identificación de <i>Ralstonia solanacearum</i>	15
3.1.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
3.1.4.1.1 Reactivos	17
3.1.4.1.2 Ciclo de amplificación.....	18
3.1.4.1.3 Diseño de los cebadores	19
3.1.4.1.4 Electroforesis en gel de agarosa para visualización de bandas de ADN	21
3.1.4.2 PCR en tiempo real (Q-PCR)	23
3.1.4.2.1 Agentes intercalantes.....	23
3.1.4.2.2 Sondas de hibridación específicas	24
3.1.4.2.3 Sondas de hidrólisis	25
3.1.4.2.4 Molecular beacons	26
3.1.4.2.5 Sondas FRET	26
3.1.4.2.6 Equipos utilizados en el PCR en tiempo real	27
3.1.4.2.7 Ventajas del PCR en tiempo real	28
3.1.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Nested PCR)	29
3.1.4.4 Medio Semiselectivo y Diferencial	30
3.1.4.5 Técnicas serológicas	31

	PÁGINA
3.1.4.5.1	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA..... 32
3.1.4.5.2	Inmunofluorescencia..... 33
3.2	MARCO REFERENCIAL..... 34
3.2.1	Zonas de muestreo..... 34
3.2.1.1	Patzicía, Chimaltenango 35
3.2.1.2	Santa María de Jesús, Sacatepéquez 35
3.2.2	Laboratorios de investigación 35
3.2.3	Detecciones realizadas de <i>Ralstonia solanacearum</i> a través de distintas técnicas 36
4	OBJETIVOS..... 39
5	HIPOTESIS..... 40
6	METODOLOGIA 41
6.1	Selección del área a muestrear..... 41
6.2	Toma y almacenamiento de muestras 41
6.2.1	Muestras de suelo 41
6.2.2	Muestras de tejido vegetal..... 42
6.3	Preparación y esterilización de las soluciones de extracción..... 43
6.4	Aislamiento y purificación de la bacteria 44
6.5	Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real 45
6.6	Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional..... 46
6.7	Protocolo de electroforesis..... 47
6.8	Análisis e interpretación de los resultados 48
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN 50
7.1	Siembra y aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> 50
7.2	Detección de <i>Ralstonia solanacearum</i> sequevar 1 mediante la técnica de PCR convencional..... 53
7.3	Detección de <i>Ralstonia solanacearum</i> sequevar 1 mediante la técnica de PCR en Tiempo Real..... 55
8	CONCLUSIONES..... 60
9	RECOMENDACIONES..... 61
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 62

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Tubérculo de papa infectado con <i>Ralstonia solanacearum</i> raza 3 biovar 2.....	10
Figura 2. Planta de tomate afectada por <i>Ralstonia solanacearum</i> raza 3 biovar 2.....	11
Figura 3. Sección transversal con exudado bacteriano causado por <i>Ralstonia solanacearum</i> raza 3 biovar 2.....	12
Figura 4. Mecanismo de las sondas de hidrólisis.	25
Figura 5. Mecanismo de molecular beacons	26
Figura 6. Mecanismo de las sondas FRET.....	27
Figura 7. Mecanismo de funcionamiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada.....	30

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Taxonomía de la especie.	5
Cuadro 2. Departamentos y municipios de estudio	34
Cuadro 3. Secuencia de los cebadores y tamaño de amplificación de los fragmentos de ADN.	36
Cuadro 4. Secuencia de los cebadores y sondas, y tamaño de amplificación de los fragmentos de ADN.....	37
Cuadro 5. Materiales para la preparación de la solución del suelo.....	43

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL, Q – PCR, PARA LA DETECCIÓN DE *Ralstonia solanacearum*, SEQUEVAR 1.

EVALUATION OF QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE, Q-PCR, FOR DETECTION OF *Ralstonia solanacearum* SEQUEVAR 1

RESUMEN

La marchitez bacteriana es la principal enfermedad de origen bacteriano a nivel mundial, siendo *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith, el agente causal de dicha enfermedad. Su gran variabilidad genética, hace que alrededor de 50 familias botánicas sean hospedantes de esta bacteria causando grandes daños en cultivos de interés económico a nivel mundial. Debido a las características de la bacteria, esta es capaz de sobrevivir sin ningún problema en tejido vegetal así como en suelo y agua. Gracias al avance que han experimentando las técnicas moleculares, actualmente se ha llegado a clasificar a la bacteria hasta el nivel de sequevar mediante la comparación de regiones de ADN específicas y muy conservadas como el gen de la endoglucanasa (Schaad 2001; Hayward 1964; Hayward 1991).

Actualmente una de las herramientas más avanzadas en la detección de patógenos es la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, debido al alto nivel de fiabilidad en cuanto a especificidad y sensibilidad.

Para llevar a cabo la evaluación de la técnica antes descrita se utilizaron muestras provenientes de tejido vegetal y suelo de plantaciones de papa y tomate escogidas mediante un muestreo dirigido para garantizar la presencia del sequevar 1 de la

bacteria *R. solanacearum*. Las muestras de tejido vegetal, junto con agua estéril, fueron maceradas para obtener una suspensión, la cual fue utilizada para realizar la siembra de la bacteria en el medio Semiselectivo de Sudáfrica Modificado (SMSA) para lograr aislar la bacteria. Seguidamente, se identificaron las colonias que poseían las características típicas de la bacteria en estudio: consistencia lechosa, mucoide y blanquecina de coloración rojiza al centro. Las colonias identificadas como positivas se utilizaron para realizar una Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional empleando los cebadores 630 y 631 que son específicos para el sequevar 1 de la bacteria *Ralstonia solanacearum*,

Por otra parte, de la misma suspensión utilizada para realizar la siembra de la bacteria en el medio SMSA, se tomó una alícuota para realizar el proceso de detección molecular del sequevar 1 de la bacteria, mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Q-PCR) empleando los mismos cebadores utilizados para llevar a cabo el PCR convencional, más la adición de un agente intercalante que provocó una emisión fluorescente tras la formación de los amplicones.

Finalmente, se determinó que la técnica de detección evaluada, PCR en tiempo real, es específica para la detección de la bacteria *Ralstonia solanaceraum* al nivel del sequevar 1, mostrando un 80% de efectividad en las detecciones realizadas, comparado con los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR convencional a través de protocolos validados en otras investigaciones.

1 INTRODUCCIÓN

La marchitez bacteriana es la principal enfermedad de origen bacteriano a nivel mundial, siendo *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith, el agente causal de dicha enfermedad. Su gran variabilidad genética, hace que alrededor de 50 familias botánicas sean hospederas de esta bacteria causando grandes daños en cultivos de interés económico a nivel mundial. Debido a las características de la bacteria, esta es capaz de sobrevivir sin ningún problema en tejido vegetal así como en suelo y agua.

La bacteria *R. solanacearum*, desde su primera descripción, ha sido subclasificada: en razas, según las especies vegetales que pueden ser hospederos; posteriormente en biovares, según su capacidad de producir ácidos a partir de un sustrato de carbohidratos; y actualmente en sequevares, gracias al avance de las técnicas moleculares que han permitido la comparación de regiones de ADN específicas y muy conservadas como el gen de la endoglucanasa (Schaad 2001; Hayward 1964; Hayward 1991).

Actualmente la bacteria *R. solanacearum* sequevar 1, es uno de los agentes patógenos más agresivos dentro del género *Ralstonia*, siendo sumamente destructivo en cultivos como papa tomate y geranio. Debido a la agresividad mostrada por parte de *R. solanacearum* sequevar 1, esta ha sido clasificada por los Estados Unidos como un agente potencial que puede ser utilizado como arma en terrorismo biológico (Lambert 2002).

Los principales métodos utilizados en la detección de *R. solanacearum* pueden ser clasificados en tres grupos según su principio de funcionamiento: de modo que se

pueden encontrar los métodos moleculares y de secuenciamiento de genes, métodos de incubación en medios selectivos y métodos serológicos, siendo estos últimos los mayormente utilizados en la detección de la bacteria en condiciones de campo; aunque se ha demostrado que su bajo nivel de especificidad puede incurrir en falsos positivos en cuanto a la presencia de dicha bacteria.

Debido al rápido desarrollo de los métodos moleculares en la detección de patógenos, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa ha mostrado que podría superar los problemas anteriormente descritos presentes en las técnicas serológicas, aunque aún no ha desplazado por completo a dichas técnicas en la detección de *R. solanacearum*. Lo anterior, es debido a que dicha técnica debe ser realizada dentro de instalaciones y con el equipo propio de un laboratorio, por lo cual esta técnica no puede ser utilizada en la detección en condiciones de campo.

Ante dicha problemática, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Q-PCR, puede ser la mejor opción en la detección de *R. solanacearum* sequevar 1 pues ofrece un mayor nivel de fiabilidad en cuanto a especificidad y sensibilidad.

La presente investigación pretendió demostrar, que actualmente la técnica de Q-PCR, podría ser la mejor opción para la detección en condiciones de campo de la bacteria *R. solanacearum*, pues esta supera los problemas presentes en las técnicas serológicas como ELISA y las técnicas moleculares como el PCR convencional. La evaluación de la técnica de Q-PCR para la detección de dicha bacteria, se llevó a cabo a partir de muestras provenientes de tejido vegetal y suelo.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La bacteria *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith, que ocasiona la marchitez bacteriana, es la principal enfermedad de origen bacteriano en el mundo (Kelman, 1953; Hayward, 1991). Esto causa un fuerte impacto en la agricultura debido a que sus ataques causan grandes pérdidas a nivel mundial en cultivos de interés económico como lo son papa, tomate y geranio (Champoiseau, Jones, Allen 2009). La clasificación de *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 (sequevar 1), por parte de los Estados Unidos, como un agente potencial para bioterrorismo (Lambert, 2002), deja en claro la agresividad de este patógeno así como la importancia en su detección temprana.

En condiciones de campo, la técnica más utilizada por su rapidez y facilidad de uso en la detección de *R. solanacearum*, a partir de muestras de tejido vegetal y suelo, es el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas ELISA. Sin embargo, el principal problema de esta técnica es su bajo nivel de especificidad, lo que provoca falsos positivos impidiendo así la detección del patógeno hasta el nivel de especificidad de sequevar. Por otra parte, las técnicas serológicas necesitan de una gran cantidad de bacterias presentes en la muestra para que estas puedan ser detectadas, por lo que su nivel de sensibilidad es otro impedimento para una detección fiable del patógeno de interés. Esta problemática podría ser resuelta a través de técnicas moleculares, específicamente mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Q-PCR, ya que esta técnica permite mejorar considerablemente los niveles de especificidad y sensibilidad gracias a su novedoso sistema de amplificación y cuantificación simultáneo.

No obstante, esta técnica aún no ha sido utilizada para la detección de *R. solanacearum* sequevar 1, por lo cual se carece de una metodología de campo aceptada a nivel internacional para la detección en campo del patógeno de interés, dando como consecuencia la dependencia de métodos serológicos como principal herramienta de detección a nivel de campo para la bacteria *R. solanacearum* corriendo el riesgo de la fiabilidad de sus resultados.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 *Ralstonia solanacearum*

3.1.1.1 Descripción

- Taxonomía de la especie

Ralstonia solanacearum

Cuadro 1. Taxonomía de la especie.

Clase	Betaproteobacteria
Orden	Burholderiales
Familia	Burholderiaceae
Género	<i>Ralstonia</i>
Especie	<i>Ralstonia solanacearum</i> E.F. Smith

Ralstonia solanacearum E.F Smith, es el agente causal de la marchitez bacteriana, principal enfermedad de origen bacteriano en el mundo, que afecta a más de 50 familias botánicas (Hayward, 1991), dentro de las cuales se encuentran especies de interés económico, incluyendo tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), papa (*Solanum tuberosum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Es una bacteria anaeróbica, gram negativa; en forma de bacilos, midiendo 0.5-0.7x1.5-2.0 Um de tamaño. Es muy sensible a la desecación y es inhibida en cultivo de bacterias con concentraciones bajas (2%) de cloruro de sodio (NaCl). Para la mayoría de cepas, la temperatura óptima de crecimiento está entre 28 y 32 °C; aunque algunas cepas se desarrollan mejor por debajo de los 27 °C (Champoiseau, Jones, Allen 2009). Se caracteriza por interrumpir el flujo de agua a través del xilema como resultado de la acumulación de masas de bacterias, resultando en la marchitez de la planta (González, Arias, Peteira 2009).

La marchitez bacteriana generalmente ocurre en tierras bajas de áreas tropicales y subtropicales, pero el subgrupo de *Ralstonia solanacearum* llamado raza3 biovar 2 (R3bv2) ataca plantas de altitudes altas o en zonas templadas (Champoiseau, Jones, Allen 2009). R3bv2 es un patógeno extremadamente destructivo de la papa, causando la podredumbre parda de la papa en las tierras altas del trópico de África, Asia y Latinoamérica. Recientemente ha aparecido en Europa, en donde ha causado disturbios en la producción de semilla de papa por las pérdidas generadas a causa de las medidas cuarentenarias. Debido a la agresividad de este patógeno, en 2002 fue listado como un agente potencial para bioterrorismo en Estados Unidos (Lambert, 2002), lo que deja en claro el daño que esta bacteria puede llegar a causar en la agricultura.

3.1.1.2 Diversidad de *Ralstonia solanacearum* y nivel más alto de especificidad.

Definición de sequevar.

La diseminación de la bacteria alrededor del mundo, en conjunto con el amplio rango de hospederos que puede afectar, la convierten en la enfermedad bacteriana más importante en las plantas (Buddenhagen, Kelman 1964; Hayward 1991). Existen cientos de aislados de *Ralstonia solanacearum* que son genéticamente distintos. Históricamente, la subdivisión de las especies fue poco rigurosa, pues se basó en el rango de hospederos y biovares, los cuales se basaban en la capacidad de producir ácido a partir de un panel de carbohidratos (Schaad, Jones, Chun 2001; Hayward, 1964; Hayward, 1991). Actualmente, una clasificación filogenética más significativa basada en la secuencia del gen de la endoglucanasa, el cual es un gen íntimamente

ligado a la virulencia del patógeno; y el gen *hrpB*, divide a las especies complejas en cuatro filotipos (Poussier, Prior, Luisetti, Hayward, Fegan 2000).

Este enfoque agrupa a las cepas por su origen geográfico de modo que, el filotipo I agrupa a las cepas provenientes de Asia, el filotipo II cepas provenientes de América, el filotipo III cepas provenientes de África y el filotipo IV cepas provenientes de Indonesia (Fegan, Prior 2005; González, Arias, Peteira 2009). Cada filotipo está compuesto de un número de *sequevares*. *Un sequevar* es definido como un grupo de cepas con secuencias altamente conservadas dentro de la zona secuenciada. *Los sequevares*, son principalmente definidos sobre secuencias parciales del gen de la endoglucanasa. Se han secuenciado 140 aislados de *R. solanacearum* logrando identificar 23 *sequevares*. *Cada sequevar* está compuesto de un número de líneas clonales, las cuales pueden ser identificadas utilizando métodos de huellas génicas como PFGE, AFLP's o rep-PCR. (Fegan, Prior 2005).

3.1.1.3 Importancia económica

Ralstonia solanacearum ha sido descrita como una de las bacterias fitopatógenas más destructivas del mundo. Esta ha afectado al menos 3.75 millones de acres de campos de cultivo de papa en más de 80 países, con pérdidas anuales estimadas en más de \$ 950 millones. (DEFRA, 2003). En los años de 1998 y 1999, el brote de R3bv2 que se presentó en Holanda dejó pérdidas estimadas en \$ 2.7 millones como resultado de la podredumbre parda de la papa (Meiners, 2000). Además, la industria de floricultura de Estados Unidos incurrió en pérdidas cuando la bacteria fue

recientemente detectada y confirmada en esquejes de geranio provenientes de Kenya y Guatemala. Combinando las pérdidas producidas en papa, tomate, pimientos, berenjena y cultivos que puedan ser afectados por *R. solanacearum* R3bv2, estas pueden alcanzar los \$70,191,390 millones anualmente (ERS, 2003).

3.1.1.4 Distribución geográfica

Ralstonia solanacearum es una bacteria extendida a nivel mundial. *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 se encuentra en Áreas norteamericanas, específicamente en México; así mismo se puede encontrar en muchos países europeos como Francia, Holanda, Alemania, Rusia e Inglaterra entre otros. Este patógeno también ha sido identificado en Asia incluyendo a países como China, Taiwán, India, Indonesia y Japón entre otros. En la región, este patógeno está presente en Egipto, Etiopía, Kenya, Sudáfrica, entre otros. En Latinoamérica, *R. solanacearum* raza 3 biovar 2 está presente desde México, pasando por toda Centroamérica, hasta llegar al sur de Argentina. Finalmente, *R. solanacearum* raza 3 biovar 2, está presente en Australia y Papúa Nueva Guinea (CABI, 2003). Actualmente, Canadá y Estados Unidos son los únicos países en los cuales *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 no se encuentra presente (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

3.1.2 Sintomatología

3.1.2.1 Papa (*Solanum tuberosum*)

Tanto los signos como los síntomas que ocasiona *R. solanacearum* en el cultivo de papa y de tomate son bastante similares. En las primeras etapas de la enfermedad los síntomas se manifiestan en el follaje provocando el marchitamiento de las hojas más jóvenes durante los momentos más cálidos del día. Durante la noche, la planta parece recuperarse debido al descenso de la temperatura. Si la enfermedad continúa su desarrollo bajo condiciones favorables, esta empieza a provocar marchitez y desecamiento generalizado en toda la planta, se pueden encontrar hojas totalmente secas de coloración verde; posteriormente se presenta un amarillamiento del follaje y finalmente la muerte de la planta. (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

En tallos jóvenes, los haces vasculares infectados pueden ser observados como rayos largos y estrechos de color marrón oscuro. En plantas jóvenes, sumamente susceptibles de variedades suculentas se puede manifestar un desplome del tallo. Si la infección es muy avanzada, las secciones transversales del tallo pueden mostrar una coloración marrón en los tejidos infectados. En etapas posteriores de la enfermedad de la podredumbre de la papa se pueden encontrar síntomas en los tubérculos. Las secciones transversales de las papas muestran una decoloración gris-marrón de tejidos vasculares. Si la infección continúa, la decoloración puede extenderse a la medula o corteza del tubérculo. La presencia de un exudado mucilaginoso, tanto en tallos como en tubérculos, indica la presencia de células bacterianas (Champoiseau, Jones, Allen 2009).



Figura 1. Tubérculo de papa infectado con *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 (Champaiseau 2009).

3.1.2.2 Tomate (*Lycopersicon esculentum*)

La marchitez también aparece en concentraciones de plantas en las partes bajas de los campos en donde el agua puede acumularse. Los síntomas que se presentan en tomate y otras solanáceas infectadas con *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 pueden ser identificados porque las hojas marchitas no caen de la planta y mantienen su tamaño y color verde, hojas infectadas pueden tornar una coloración amarillenta y retardar su crecimiento. Si la infección es muy severa puede provocar una coloración marrón y desecación. En los tallos sintomáticos cortados a nivel del suelo se muestra un exudado mucilaginoso blanquecino en la superficie del corte. Cortes de tallo colocados en agua producen un flujo bacteriano del xilema del tallo infectado. El desarrollo de la infección bacteriana dentro del sistema vascular resulta en la muerte de la planta. (Floyd 2008; Champoiseau, Jones, Allen 2009).



Figura 2. Planta de tomate afectada por *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 (Champoiseau 2009).

3.1.2.3 Geranio (*Pelargonium sp.*)

Los síntomas iniciales se presentan como una clorosis anormal y la marchitez de las hojas bajas. El enroscamiento hacia arriba de los márgenes de las hojas es un síntoma típico. En esta etapa de la enfermedad, al igual que en la papa, la planta parece recuperarse durante las noches al presentarse temperaturas más bajas. Si las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad, se puede presentar un rápido avance de la marchitez que puede atacar toda la planta, iniciando desde las hojas más viejas hasta las más jóvenes, pudiendo llegar a provocar el desplome del tallo. Con regularidad las hojas marchitas se vuelven cloróticas y posteriormente marrones necróticas. Los márgenes se pueden volver cloróticos y posteriormente

necróticos, hasta que finalmente la planta entera se deseca y muere. (Champoiseau, Jones, Allen 2009).



Figura 3. Sección transversal con exudado bacteriano causado por *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 (Champoiseau 2009)

La expresión de los síntomas es favorecida por las altas temperaturas (29°C – 35°C), estos pueden desarrollarse rápidamente tras haberse dado la infección. Después de la infección, el patógeno puede sobrevivir en la planta durante un tiempo prolongado sin producir síntomas, con lo cual puede ser dispersado al no ser detectada su presencia en plantas asintomáticas. Plantas con infección latente pueden contener grandes poblaciones de R3bv2 (arriba de 10^8 células/g de tejidos de tallo) y a menudo arrojar un gran número de bacterias de sus raíces en las aguas de escorrentía o el suelo. Hospederos alternos de *R. solanacearum* como *S. dulcamara* a menudo parecen saludables, aun cuando están infectadas. Sin embargo, cuando los síntomas de la marchitez aparecen, estos son muy similares a los descritos para tomate (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

Un síntoma muy común, es el apareamiento de un exudado pegajoso y lechoso en la superficie de tallos recién cortados; esta condición indica la presencia de masas densas de células bacterianas en haces vasculares infectados, especialmente en el xilema. Otro síntoma común se presenta al colocar secciones de tallos recién cortadas en agua. El síntoma consiste en el apareamiento de una baba blanca viscosa que sale del extremo cortado del tallo. Este fluido representa el exudado bacteriano saliendo de los extremos cortados de haces vasculares que ha sido colonizados. (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

3.1.3 Factores epidemiológicos

3.1.3.1 Ciclo de la enfermedad

Ralstonia solanacearum infecta a sus plantas hospederas principalmente a través de las raíces, entrando por medio de las heridas formadas por la emergencia de raíces laterales o por heridas en la raíces causadas por organismos del suelo. La bacteria también puede entrar a la planta por medio de heridas en los tallos, manipulación o por herramientas. Una vez que la bacteria ha infectado por medio del tallo o las raíces, esta coloniza a la planta a través del xilema y tejidos vasculares (González, Arias, Peteira 2009). R3bv2 tiene un efecto más severo en las plantas entre 24°C y 35°C, la severidad decrece cuando la temperatura supera los 35 °C o desciende por debajo de 16 °C actividad por debajo de los 16 °C no es común (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

3.1.3.2 Sobrevivencia de la bacteria

Esta bacteria puede sobrevivir desde días hasta años en aguas infestadas, suelos húmedos o capas profundas del suelo, formando un depósito de inóculo desde el cual puede dispersarse. Factores como la diversidad biológica y ambiental pueden afectar la sobrevivencia de *R. solanacearum* tanto en hábitat de suelo como en agua. Las poblaciones de bacterias pueden decrecer rápidamente a bajas temperaturas (< 4 °C), pero R3bv2 puede sobrevivir en un estado fisiológicamente latente, viable, pero no en un estado cultivable. R3bv2 puede sobrevivir inviernos moderados en malezas hospedadoras o en la rizósfera de plantas hospedadoras, actuando como un inóculo de reserva (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

3.1.3.3 Diseminación de la bacteria

La propagación vegetativa puede jugar un papel importante en la diseminación de R3bv2, particularmente por la vía de semillas de papa infectadas en estado de latencia, así mismo puede suceder con los esquejes de geranio. La infección de planta a planta se puede presentar cuando las bacterias se desprenden de las raíces infectadas y se movilizan cerca de las raíces de plantas sanas. La dispersión del patógeno, desde campos infestados hasta campos libres del patógeno, puede ocurrir por la transferencia de suelo a través de maquinaria de uso agrícola, y por la escorrentía superficial después de la aplicación de riego o una lluvia. Este patógeno, también puede ser diseminado desde estanques infestados o ríos, hacia campos sanos a través

de inundaciones o aplicaciones de riego. *R. solanacearum* es principalmente un patógeno transmitido por el suelo y el agua (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

3.1.4 Técnicas utilizadas en la detección e identificación de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum raza 3 biovar 2 puede ser identificada por medio de muestras de plantas sintomáticas o asintomáticas y de muestras de agua o suelo por medio de algunos métodos microbiológicos y moleculares. (Priou, Gutarra, Aley 2006; Schaad, Jones, Chun 2001; Weller, Elphinstone, Smith, Boonham, Stead 2000). Una combinación de al menos dos pruebas distintas es necesaria para la identificación de especies y biovar. Pruebas de detección pueden facilitar la detección temprana de *R. solanacearum* en plantas, o muestras de suelo y agua que estén contaminadas, pero la mayoría de estas pruebas no pueden ser utilizadas para detectar raza o biovar.

Estas pruebas de detección incluyen flujo bacteriano, plaqueado en un medio semi-selectivo como un modificado SMSA (Elphinstone, Hennessey, Wilson, Stead 1996), ensayos inmunodiagnósticos utilizando anticuerpos específicos, reacción en cadena de la polimerasa PCR con cebadores específicos, y pruebas de patogenicidad utilizando hospederos susceptibles como plántulas de tomate (Elphinstone, Hennessey, Wilson, Stead 1996; Schaad, Jones, Chun 2001; Weller, Elphinstone, Smith, Boonham, Stead 2000, Champoiseau, Jones, Allen 2009).

Pruebas comercialmente disponibles como tiras inmunológicas pueden ser utilizadas para la rápida detección de *R. solanacearum*, tanto en campo como en laboratorio. Cepas de *R. solanacearum* pueden ser subclasificadas en filotipos y luego en sequevares por medio de PCR y análisis de secuencia de genes (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

3.1.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Creada por Kary Mullis en 1983, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, es ampliamente utilizada en la biología molecular y consiste en producir copias de una región específica del ácido desoxirribonucleico, ADN, de un organismo (Mullis 1990).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de la enzima ADN polimerasa para replicar hebras de ADN debido a la función de adición de nucleótidos al extremo 3' de una cadena de ADN, teniendo una segunda cadena complementaria como molde, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. Conforme se ha ido utilizando la técnica de PCR, esta ha sido simplificada gracias al descubrimiento y aislamiento de ADN polimerasa termoestable, denominada *Taq* polimerasa, a partir de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (Chien, Edgar, Trela 1976).

3.1.4.1.1 Reactivos

La reacción requiere de los siguientes componentes:

- ADN polimerasa termo estable: puede soportar altas temperaturas, para PCR de rutina la enzima Taq de *Thermus aquaticus* (Chien, Edgar, Trela 1976), es la más utilizada. Esta enzima cataliza la adición covalente de nucleótidos al extremo 3' de una cadena de ADN, teniendo una cadena complementaria como molde (Mullis, 1990). La enzima es activa únicamente en presencia de iones de Mg^{2+} y de ADN preexistente, el cual debe servir como iniciador o cebador y como molde (Gardner, Simmons, Snustad 2000).
- Fuente de nucleótidos (dNTPs): los nucleótidos consisten en un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos (pentosa) y un compuesto cíclico nitrogenado denominado base. Existen cuatro bases diferentes, adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G). Los nucleótidos son los constituyentes básicos de la molécula de ADN (Gardner, Simmons, Snustad 2000).
- Cebadores de ADN: son pequeñas secuencias de ADN, usualmente de 18 a 24 pares de bases de longitud, diseñados para alinearse a una secuencia de ADN molde en los extremos de la región a ser amplificada (Nakhla 2004). La ADN polimerasa reacciona sobre el extremo 3' de esta molécula, añadiendo los nucleótidos complementarios al ADN molde (Gardner, Simmons, Snustad 2000).

- ADN objetivo: este puede ser bicatenario o monocatenario; aislado de un organismo. Normalmente existen varios miles de copias de ADN en la mezcla de la reacción (Nakhla 2004).
- Cationes divalentes: son requeridos para iniciar la actividad de la *Taq* polimerasa generalmente suele utilizarse magnesio Mg^{+2} en una concentración molar que exceda la concentración de los dNTPs y de los cebadores debido a que estos también capturan los iones y debe quedar disponibilidad del catión para la polimerasa (Nakhla 2004).
- Amortiguador: es utilizado para establecer un valor adecuado de pH para el buen funcionamiento de la ADN polimerasa. Generalmente, el amortiguador mantiene el pH dentro de un rango de 8.3 a 8.8 a temperatura ambiente y baja aproximadamente a 7.2 cuando es incubado a 72 °C (Nakhla 2004).

3.1.4.1.2 Ciclo de amplificación

El procedimiento de PCR consiste en tres pasos que conforman un ciclo de copiado. Por medio de un termociclador, la temperatura de la mezcla cambia en cada paso para optimizar la reacción. Los ciclos son repetidos hasta alcanzar la cantidad de copias de ADN deseadas. A continuación se describen los pasos de cada ciclo de PCR (Fulladolsa 2009).

PASO 1: Desnaturalización

Se eleva la temperatura de la muestra a +/- 95 °C, provocando la ruptura de los puentes de hidrogeno que existen entre las bases complementarias de las hebras del ADN. De esta manera se logra la separación de las hebras de ADN (Fulladolsa 2009).

PASO 2: Apareamiento

La temperatura disminuye hasta +/- 55 °C y los cebadores se aparean con su secuencia complementaria en la hebra molde del ADN objetivo (Fulladolsa 2009).

PASO 3: Extensión:

La temperatura se eleva hasta +/- 72 °C para que la ADN polimerasa pueda adicionar nucleótidos a la nueva cadena de ADN en crecimiento. Se unirán bases a la hebra molde hasta que se llegue al final de la región que se desea amplificar (Fulladolsa 2009).

3.1.4.1.3 Diseño de los cebadores

Los cebadores de ADN son diseñados para alinearse en los extremos de las hebras opuestas del ADN molde, en la región a ser amplificada (Nakhla 2004; Iowa State University 2005). De esta manera, ambas hebras son sintetizadas al mismo tiempo, de tal modo que los nucleótidos adenina (A) y timina (T) se alinean y citosina (C) y guanina (G) también lo hacen. Debido a que la mezcla de reacción contiene cebadores complementarios a ambas hebras de ADN, los productos de la síntesis de ADN pueden ser copiados (Iowa State University 2005). Para el diseño de cebadores deben considerarse algunos aspectos (Nakhla 2004).

- Longitud: mientras más largo sea el cebador, más específico será su alineamiento. Sin embargo, el ADN de algunos organismos tiene muchas regiones con secuencias repetidas, por lo que si se diseña un cebador para alguna de estas regiones perderá su especificidad. Los cebadores deberán alinearse únicamente en la región de interés y no en sitios múltiples. Generalmente, un cebador de 18 a 24 nucleótidos es suficientemente largo para alinearse específicamente a una región particular del ADN (Nakhla 2004).
- ADN objetivo: si la región de ADN de interés es repetida o se alinea consigo misma luego de la desnaturalización, la amplificación será difícil (Nakhla 2004).
- Auto-complementariedad: los cebadores no deben ser auto-complementarios para evitar que se alineen entre ellos mismos en vez de hacerlo al ADN molde. Asimismo, el cebador delantero no debe ser complementario al cebador reversa (Nakhla 2004).
- Extremo 3' del cebador: es crucial para la especificidad, este extremo debe ser una G o una C, teniendo cuidado de que no termine en CG o CG en el extremo contrario para evitar la auto-complementariedad. El extremo 4' no tiene que ser complementario a la secuencia de ADN molde (Nakhla 2004).
- Contenido de G y C: estos nucleótidos se acoplan entre sí por tres enlaces de hidrógeno, mientras que los A y T lo hacen por medio de dos enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, los enlaces G-C son más fuertes y el porcentaje de

estos nucleótidos afectara su acoplamiento al ADN objetivo. Un diseño adecuado para un buen cebador deberá incluir entre 40 y 60% de C o G (Nakhla 2004).

3.1.4.1.4 Electroforesis en gel de agarosa para visualización de bandas de ADN

El método de electroforesis de ácidos nucleicos hace referencia a la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico con el objetivo de separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de DNA y RNA (Padilla *et al.* 2006; Alvadalejo 2006). Fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937 (García 2000).

Los geles de agarosa se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma, de manera que moléculas de ADN de diferente tamaño van a moverse de forma distinta en una electroforesis en gel (Padilla *et al.* 2006).

El gel de agarosa se coloca en un aparato horizontal, denominado cámara de electroforesis, el cual constituye un sistema eléctrico termodinámico. Consiste en una caja dividida en dos compartimentos por medio de una plataforma en el centro. El gel se coloca sobre la plataforma y se agrega tampón de electroforesis. La cámara posee electrodos en cada compartimento. El aparato recibe energía de una fuente de poder y libera energía en forma de calor. Las moléculas de ADN son sometidas a electroforesis

y se desplazan al polo positivo, ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa (Fulladolsa 2009).

La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductividad eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente. En un tampón de elevada fuerza iónica la conductividad eléctrica es elevada y se genera una mayor cantidad de calor. Los tampones para la electroforesis de ADN contienen EDTA, y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o tris-fosfato (TPE) con pH entre 7.5-7.8 (Osma y Querci 2007).

El peso molecular de los ácidos nucleicos puede determinarse en electroforesis al comparar las movilidades electroforéticas de varios marcadores de peso molecular conocido. Existen patrones de varios rangos de peso molecular, se debe aplicar el que abarque el peso molecular esperado (García 2000).

Los geles de agarosa se tiñen con bromuro de etidio el cual es una sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Luego de la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se observan las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (Padilla *et al.* 2006).

3.1.4.2 PCR en tiempo real (Q-PCR)

Es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Mediante la detección de fluorescencia se puede medir la amplificación de AND sintetizado en cada momento, ya que la cantidad de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Los termocicladores para llevar a cabo el PCR en tiempo real, incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los ciclos donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia utilizados en el PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Costa 2004).

3.1.4.2.1 Agentes intercalantes

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I (Lee., Squirrell, Leslie, Brown 2004). El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se

unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en el PCR (Costa 2004).

Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevada (*hot-start PCR*), lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas (Moretti, koons, Budowle 1998) o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad. Además la mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados. Cada fragmento amplificado tiene una Temperatura de fusión característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia diana (Costa 2004).

3.1.4.2.2 Sondas de hibridación específicas

Consisten en dos sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un receptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante

resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, también denominadas sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET (Costa 2004)

3.1.4.2.3 Sondas de hidrólisis

Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador (Holland, Abramson, Watson, Gelfand 1991). Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Costa 2004).

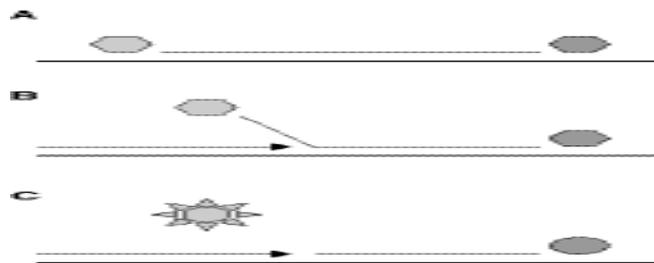


Figura 4. Mecanismo de las sondas de hidrólisis (Costa 2004).

3.1.4.2.4 Molecular beacons

Son sondas parecidas a las anteriores. Tiene una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN molde. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN molde la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero (Cimino, Metchette, Tessman, Hearst, Isaacs 1991).

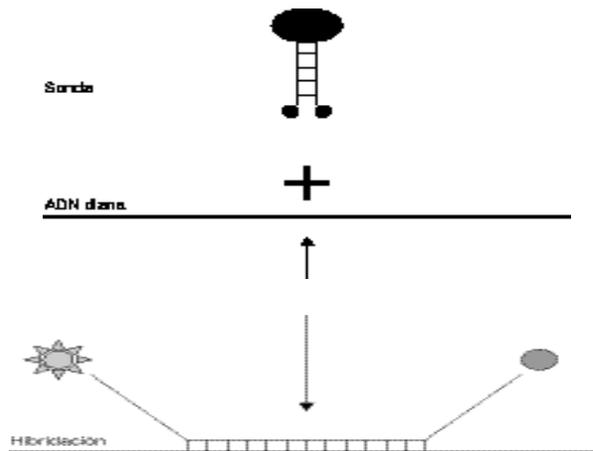


Figura 5. Mecanismo de molecular beacons (Costa 2004)

3.1.4.2.5 Sondas FRET

Este sistema de compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN molde. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos

están próximos. Al ser excitado el donador, se transfiere su energía al receptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo. En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil (Costa 2004).

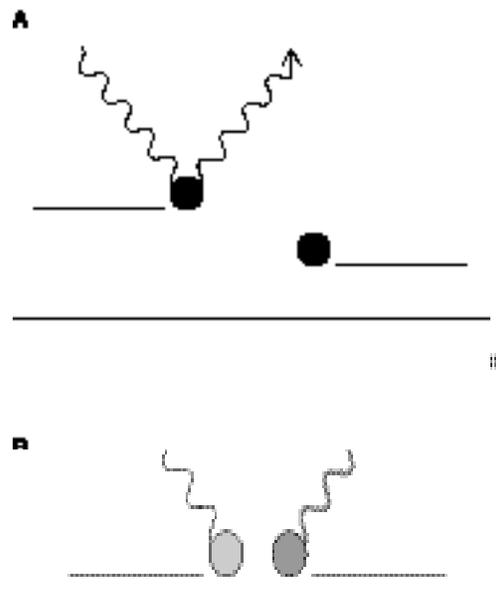


Figura 6.Mecanismo de las sondas FRET (Costa 2004).

3.1.4.2.6 Equipos utilizados en el PCR en tiempo real

Están compuestos por un termociclador y un lector de fluorescencia y diseñados para poder efectuar la lectura de fluorescencia emitida en cada uno de los ciclos de la reacción. Las diferencias más importantes entre los equipos que se encuentran

actualmente en el mercado hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante. Disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de varios tipos de fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar distintos tipos de ADN molde en la misma reacción o incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores (Costa 2004).

3.1.4.2.7 Ventajas del PCR en tiempo real

La primera gran ventaja de la PCR a tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Además, gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante (Weller, Elphistone, Smith, Boonham 2000). Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor que en los procedimientos convencionales. Los equipos para PCR a tiempo real tienen una gran capacidad ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos (Costa 2004).

3.1.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Nested PCR)

Técnica que comporta dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) sucesivas, con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en la segunda PCR (*internal* o *nested PCR*) flanqueen una región genómica amplificada en la primera reacción en cadena (*external PCR*) (Gonzalo, Diaz, Saladrigas-Isenring, Halphen 2003)

Este método intenta reducir la contaminación en el producto, debido a la amplificación de sitios de unión no esperados. Además, El método de la PCR anidada se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas que a veces se observan con la PCR clásica, dado que en cada etapa se realiza un número menor de ciclos (las PCR de muchos ciclos conllevan a menudo errores de lectura y de síntesis, debido, entre otras cosas, a la falta de fidelidad de la polimerasa Taq) (Gonzalo, Diaz, Saladrigas-Isenring, Halphen 2003).

Además, si el producto de la primera PCR es el resultado de una amplificación inespecífica, el segundo par de cebadores internos no reconocerá la secuencia complementaria, y por consiguiente no habrá amplificación. Cabe mencionar que aunque el método en sí comprende dos reacciones en cadena de la polimerasa consecutivas, lleva el nombre de la segunda PCR (la *internal PCR* o *nested PCR*) por ser esta segunda reacción la que aporta el amplicón de interés (Gonzalo, Diaz, Saladrigas-Isenring, Halphen 2003).

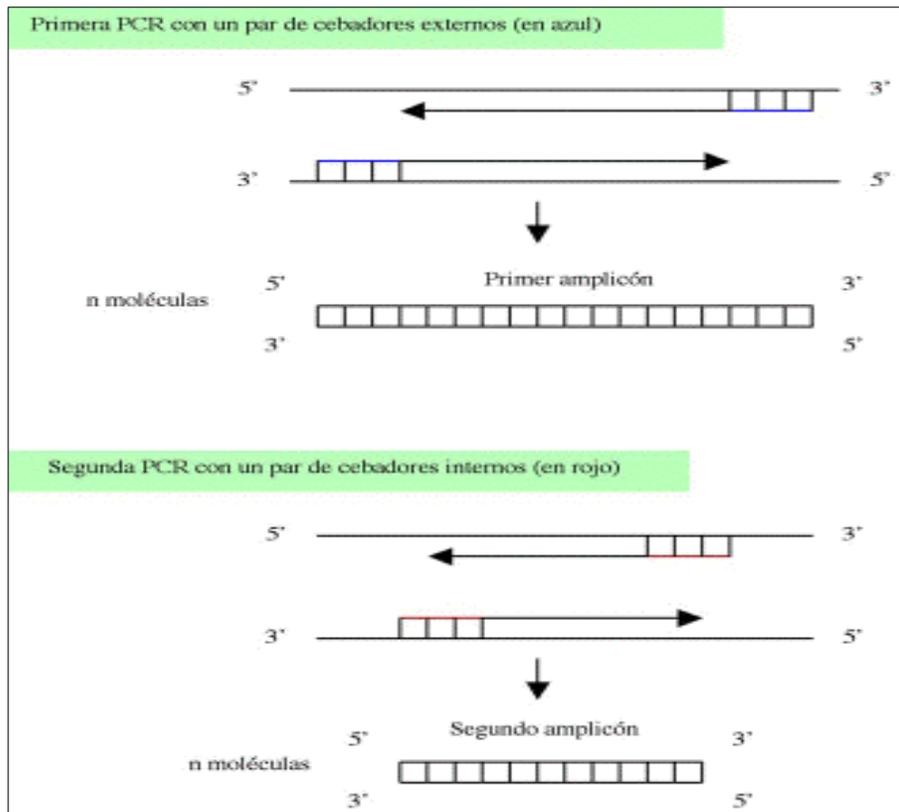


Figura 7. Mecanismo de funcionamiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Gonzalo, Diaz, Saladrigas-Isenring, Halphen 2003)

3.1.4.4 Medio Semiselectivo y Diferencial

El aislamiento de *R. solanacearum*, a partir de tejido fresco proveniente de plantas sintomáticas, generalmente no suele presentar mayores complicaciones, debido a la alta densidad del patógeno en el tejido. Sin embargo, el aislamiento del patógeno a partir de plantas asintomáticas presenta mayor dificultad, debido a la baja cantidad de células viables presentes. Como es de esperar, el aislamiento del patógeno a partir de muestras de suelo, es la manera más problemática debido a la

presencia de otros microorganismos, muchos de los cuales se multiplican más rápidamente de lo que lo puede hacer *R. solanacearum* (Schaad, Jones, Chun 2001).

Distintos medios han sido descritos para el aislamiento de *R. solanacearum*, pero ninguno es completamente satisfactorio, ya que estos no son capaces de sostener el crecimiento de todas las cepas de *R. solanacearum*, y/o no son capaces de suprimir el crecimiento de las bacterias Gram negativas que estén o no emparentadas. El medio más conocido y más ampliamente utilizado es SM-1, SMSA y el SMSA modificado. Aunque SMSA y su modificación contienen glicerol, el reemplazo del glicerol por glucosa puede ser ventajoso ya que de esta manera se permite un crecimiento más rápido de *R. solanacearum* evitando así algunos de los problemas de competencia y antagonismo con otras bacterias (Schaad, Jones, Chun 2001).

En medio de incubación SMSA deben transcurrir de 48-72 horas a 28 C para que se presente un crecimiento óptimo del patógeno. Plantas hospederas pueden ser explotadas para realizar aislamientos de suelo o para aislar numerosas poblaciones (Schaad, Jones, Chun 2001).

3.1.4.5 Técnicas serológicas

Los anticuerpos han sido muy utilizados y en muchos formatos de prueba para detección e identificación de bacterias. Los formatos más populares y exitosos incluyen aglutinación, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA),

inmunofluorescencia (IF), prueba lateral de tira de flujo y ensayos a través de flujo (Schaad Jones, Chun, 2001).

3.1.4.5.1 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA

ELISA es una técnica que utiliza anticuerpos enzimáticamente marcados para detectar bacterias o secreciones bacterianas y extractos que son unidos a un soporte sólido. Cuando el anticuerpo se une al patógeno que se desea detectar la enzima produce un cambio de color en el sustrato. Si se presentan condiciones favorables, ELISA puede ser utilizada en la detección de bacterias en plantas sintomáticas debido a que estas muestras contienen elevadas poblaciones del patógeno (mayor de 10^5 CFU/ml). Varios protocolos de ELISA han sido mejorados para detectar bacterias a concentraciones tan bajas como 10^3 CFU/ml pero tal sensibilidad no es típica en la mayoría de ensayos de ELISA en la detección de bacterias. A concentraciones bacterianas por debajo de 10^5 , la bacteria debería de ser cultivada primero (Schaad, Jones, Chun 2001).

Esta técnica ha sido utilizada para la detección e identificación de *R. solanacearum* (Machmud, Suryadi 2008), sin embargo esta técnica aun no se ha desarrollado al punto de ser totalmente fiable. Anticuerpos policlonales hechos para células de *R. solanacearum* han representado buena sensibilidad en métodos como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), e inmunofluorescencia es ahora un método aceptado para la detección de tejido vegetal infectado en estado latente. Sin embargo, debido a que se podía presentar una reacción cruzada con

organismos muy relacionados como *R. pickettii*, las muestras positivas deben ser confirmadas por un segundo método. En contraste, casi todos los cuerpos monoclonales producidos son muy selectivos, y no reaccionan con todas las cepas de *R. solanacearum* (Schaad, Jones, Chun 2001).

3.1.4.5.2 Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia utiliza anticuerpos con marcadores fluorescentes para identificación de bacterias. Estos métodos utilizan anticuerpos que reaccionan con las células antígenas de la bacteria las cuales son visualizadas en el microscopio por sus marcadores fluorescentes. Este es el único método que combina inmuno-reconocimiento con la observación directa de las propiedades celulares. IF es regularmente utilizado para confirmar la identidad de bacterias conocidas en cultivos mixtos. Aunque el método consume un tiempo considerable y requiere de un largo entrenamiento, este puede producir ensayos sensibles sustituibles para detectar muestras vegetales negativas. Esta técnica puede ser aplicada a colonias o bien a células individuales (Schaad, Jones, Chun 2001).

En el protocolo de inmunofluorescencia colony-staining (IFC), agar derretido es mezclado con una muestra que contenga células vivas y luego se deja solidificar. Microcolonias se forman después de transcurridas 24 a 72 horas de incubación, tiempo en el cual el agar se seca y forma una película. La película de agar es rehidratada con una conjugación específica de anticuerpos, posteriormente se lava y observa utilizando un microscopio epifluorescente. Colonias positivas son identificadas

por observación fluorescente bajo una baja amplificación (40X). La sensibilidad es mucho mayor debido al paso de enriquecimiento, alcanzando niveles de detección tan bajos como 10E2 CFU/ml. IFC tiene la ventaja de poder diferenciar entre células vivas y muertas debido a que solo las células vivas pueden formar microcolonias y las células muertas son insensibles (Schaad, Jones, Chun 2001).

3.2 MARCO REFERENCIAL

3.2.1 Zonas de muestreo

El trabajo de detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1, fue llevado a cabo mediante un muestreo dirigido, enfocado en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum* L) de la República de Guatemala, en donde el sequevar I ha sido identificado. Estas zonas comprenden el departamento de Chimaltenango en el municipio de Patzún, el cual se ubica en el altiplano central, al igual que en el municipio de Santa María de Jesús que se ubica en el departamento de Sacatepéquez. El trabajo de detección fue realizado dentro de los siguientes municipios o zonas pertenecientes a los departamentos anteriormente descritos.

Cuadro 2. Departamentos y municipios de estudio

Departamento	Municipio
Chimaltenango	Patzún
Sacatepéquez	Santa María de Jesús

3.2.1.1 Patzcía, Chimaltenango

Patzcía pertenece al departamento de Chimaltenango y cuenta con una extensión territorial de 44 kilómetros cuadrados. Se encuentra ubicado entre los 14°37'54'' latitud norte, 90°55'30'' longitud oeste y a una altura de 2130msnm. Limita al norte con Santa Cruz Balanyá, al oeste con Patzún, al este con Zaragoza y al sur con Acatenango y San Andrés Itzapa, todos municipios del departamento de Chimaltenango.

3.2.1.2 Santa María de Jesús, Sacatepéquez

Santa María de Jesús constituye uno de los 16 municipios del departamento de Sacatepéquez, República de Guatemala. Cuenta con una extensión territorial de 34 kilómetros cuadrados. La cabecera municipal se encuentra a 2070 msnm. Latitud de 14° 29' 35'', longitud 90° 42'35''. Colinda con Magdalena Milpas Altas y Antigua Guatemala (Sacatepéquez), al este con Amatitlán (Guatemala), al sur con Palín (Escuintla), al oeste con Antigua Guatemala y Ciudad Vieja (Sacatepéquez).

3.2.2 Laboratorios de investigación

Además de los trabajos en campo, que se realizaron para la detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1, también fueron necesarios algunos trabajos de laboratorio, los cuales fueron llevados a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Edificio T-8, Laboratorio B-12, Ciudad Universitaria, zona 12, Ciudad de Guatemala, Guatemala.

3.2.3 Detecciones realizadas de *Ralstonia solanacearum* a través de distintas técnicas

Según Patrik (2000), en su trabajo de detección de *R. solanacearum* en muestras de tubérculos de papa a través de PCR convencional, se logró la identificación de distintas cepas de *R. solanacearum* utilizando los cebadores PS-1/PS-2 (Cuadro No. 2) los cuales amplifican una región de 553 pares de bases correspondiente a una región parcial del gen 16S rRNA. Así mismo, logró niveles de sensibilidad en un rango de $10E1 - 10E3$ células por mililitro de un homogenizado de papa.

Cuadro 3. Secuencia de los cebadores y tamaño de amplificación de los fragmentos de ADN (Patrick 2000).

Cebador	Secuencia de los cebadores 5' - 3'	Tamaño del producto del PCR
PS-1	agt cga acg gca gcg ggg g	553 pares de bases
PS-2	ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca	

En el trabajo de detección de *R. solanacearum* en muestras de suelo a través de PCR en tiempo real según Huang, Wu, Li, Xiao Wang (2009) se utilizó el gen de la endoglucanasa como secuencia de ADN objetivo para realizar un estudio altamente específico y sensitivo. Los cebadores utilizados fueron R. sol 1 y R. sol 2, mientras que la sonda utilizada fue Rs-pro (Cuadro No. 3) Taq Man y SYBR Green I. La especificidad de los cebadores fue probada a través de una electroforesis en gel de agarosa, mientras que la especificidad de la sonda fue determinada a través de PCR

en tiempo real. Los cebadores R. sol 1 y R.sol 2 amplificaron una segmento de 331 pares de bases. Para evaluar la especificidad, este segmento fue secuenciado y se determino que la región amplificada correspondía al gen de la endoglucanasa de *R. solanacearum*. La sensibilidad alcanzada con PCR convencional fue de 100 fg μl^{-1} , mientras que en el PCR en tiempo real la sensibilidad fue de 2 fg μl^{-1} .

Cuadro 4. Secuencia de los cebadores y sondas, y tamaño de amplificación de los fragmentos de ADN (Huang, Wu, Li, Xiao Wang 2009).

Cebador y sonda	Secuencia de cebador y sonda 5'- 3'	Tamaño del producto del PCR
R.sol 1	ccg aca cca cga ccc tga a	331 pares de bases
R.sol 2	gcg gac gga tag atg tag ttg c	
Rs-pro	acc tgg cat acc ttg gcg aca cc	

Según Pradhanang, Elphistone, Fox (2000), en el trabajo de comparación de diferentes técnicas de detección de *R. solanacearum* en muestras de suelo, utilizó las técnicas de cultivo en medio SMSA modificado pudiendo detectar hasta niveles por debajo de 10^2 CFU por gramo de suelo. A través de la técnica de bioensayo en plántulas de tomate la detección se llevo a cabo con poblaciones de 7.5×10^5 CFU por gramo de suelo. Con la técnica ELISA se detectaron niveles por debajo de 10^4 CFU por gramo de suelo cuando la suspensión fue primeramente incubada en medio SMSA modificado. Por medio de la técnica de PCR anidada los niveles del patógeno detectado fueron similares a los obtenidos con el medio SMSA modificado pero únicamente

cuando las muestras de suelo fueron primeramente enriquecidas en el medio de cultivo SMSA modificado.

4 OBJETIVOS

General

- Determinar si a través de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Q-PCR) es posible la detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1.

Específicos

- Evaluar la especificidad de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (Q-PCR) en la detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1.
- Determinar la efectividad de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real Q-PCR, en la detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1.

5 HIPOTESIS

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, amplificará una región de ADN ubicada dentro del gen de la endoglucanasa, la cual es específica para *Ralstonia solanacearum* sequevar 1, con lo cual se demostrará la especificidad de la técnica en la detección del patógeno.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional, llevada a cabo a partir de colonias cultivadas en el medio Semiselectivo de Sudáfrica Modificado (SMSA), amplificará una región específica de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1 al igual que la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, con lo cual se demostrará la efectividad de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real en la detección del patógeno.

6 METODOLOGIA

6.1 Selección del área a muestrear

Debido al objetivo de la investigación, en la cual se pretendió evaluar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real en la detección del sequevar I de *Ralstonia solanacearum* y no una identificación de las zonas en donde el patógeno se encuentra presente a nivel nacional, se seleccionaron como campos de muestreo los municipios de Patzicía y Santa María de Jesús para realizar un muestreo dirigido, debido a que trabajos realizados anteriormente mostraron la presencia de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1 (Sánchez 2008).

Las muestras de suelo, planta y tubérculo de la plantación de papa, fueron obtenidas del campo de muestreo ubicado en el municipio de Patzicía, mientras que las muestras de suelo y plantas, de campos de cultivo de tomate, fueron obtenidas del campo de muestreo ubicado en Santa María de Jesús,

6.2 Toma y almacenamiento de muestras

6.2.1 Muestras de suelo

Siguiendo la metodología descrita por Priou, Gutarra, Aley (2006), en campos con cultivos de papa, ubicados en Patzicía, se tomaron las muestras en la rizósfera de las plantas. La profundidad de muestreo fue de aproximadamente 5 a 15 cm evitando así áreas de alta fluctuación de humedad y temperatura que pudieron influir en las poblaciones bacterianas. Se colectaron aproximadamente 100 g de suelo por muestra

con una pala de mano, la cual fue desinfectada con hipoclorito de sodio al 0.5% y enjuagada con agua después de la toma de cada muestra. Se recolectaron 5 muestras por cada campo de muestreo para un total de 10 muestras de suelo.

Las muestras colectadas fueron colocadas en bolsas de polietileno, las cuales se mantuvieron abiertas durante el muestreo. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio evitando el exceso de calor. En el laboratorio las bolsas fueron abiertas y almacenadas favoreciendo la ventilación, evitando así la multiplicación de bacterias antagonistas y anaeróbicas. Las muestras que no fueron trabajadas inmediatamente, fueron conservadas por un periodo máximo de una semana en almacenaje frío (temperatura entre 10 y 15°C), manteniendo la humedad de las muestras.

6.2.2 Muestras de tejido vegetal

Para la recolección de estas muestras se identificaron plantas de papa que presentaban el síntoma típico de la marchitez. Se tomaron 5 plantas en el campo de muestreo para un total de 5 muestras. Al momento de realizar la recolección de las muestras se realizó una desinfección de las manos con alcohol al 70%, seguidamente se arrancaron las plantas procurando extraer los tubérculos. Posteriormente, se cortó una porción de tallo de aproximadamente 5 cm. Para el caso de los tubérculos, no se realizó ningún corte, siendo tomadas 5 muestras. Las muestras de tejido de tallo fueron almacenadas en tubos de ensayo estériles, mientras que los tubérculos se almacenaron en bolsas plásticas igualmente estériles evitando la exposición directa al sol.

Para la recolección de plantas de tomate, en su respectivo campo de muestreo, el procedimiento fue el mismo para la toma de muestras de suelo y tallo. Finalmente, se obtuvieron 25 muestras obtenidas de los dos campos de muestreo.

6.3 Preparación y esterilización de las soluciones de extracción

Para la obtención de la bacteria a partir de las muestras de suelo, se procedió a la preparación de una solución de extracción, para la cual se utilizaron 2000 mL de agua destilada, a los cuales se les agregó el contenido el paquete 1, el cual se muestra en el cuadro 5. Se realizó una aplicación de 3.5 mL de hidróxido de sodio a la solución para alcanzar un pH de 7.4 tal y como se establece en la receta de preparación.

La preparación y almacenamiento de la solución de extracción, que fue utilizada para preparar la solución del suelo, se realizó en frascos limpios. La esterilización se realizó por medio de autoclave (20 minutos a 120°C) y se llevó a cabo después de la preparación, posteriormente fue almacenados en una refrigeradora.

Seguidamente se mezclaron 10 g de suelo con 90 ml de la solución de extracción, posteriormente se agitó a 180 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiental. Esta solución se dejó decantar por 40 segundos. De esta solución se tomó una alícuota para realizar el aislamiento de la bacteria y para llevar a cabo el PCR en tiempo real.

Cuadro 5. Materiales para la preparación de la solución del suelo (Priou, Gutarra, Aley 2006).

Paquete	Nombre	Composición química
1	Tampón de extracción pH 7.4	NaCl = 16.0 g KH ₂ PO ₄ = 0.4 g KCl = 0.4 g Na ₂ HPO ₄ = 2.3 g

6.4 Aislamiento y purificación de la bacteria

El medio de cultivo utilizado para llevar a cabo el aislamiento de *R. solanacearum* fue el Medio Semiselectivo Sudáfrica modificado (1 litro): Caseína hidrolizada 1 g, Peptona 10 g, Glicerol 1 ml, Agar 17 g, Triphenyl tetrazolium chloride (TZC) 5 ml (se agrega luego del proceso de esterilización en autoclave). Luego se disolvió en 5 ml de etanol al 70% por 30 minutos cada uno de los componentes siguientes: cristal violeta 5 mg, Polymyxin β sulfato 100 mg, Bacitracina 25 mg, Cloromicetina 5 mg, Penicilina 0.5 mg, Cicloheximida 100 mg. Agregar. Estos fueron disueltos antes de agregarlos al medio autoclaveado (Sánchez P, Mejía, Fegan, Allen 2008).

Luego de la preparación del medio de cultivo se llevó a cabo el aislamiento del patógeno a partir de las muestras de tallo, tubérculo y suelo de la siguiente manera.

1. Los tubérculos fueron lavados con agua eliminando residuos de cualquier procedencia.

2. Se obtuvo una porción de tejido vascular, de aproximadamente 3 gramos, el cual se maceró en un mortero añadiendo 5 ml de agua estéril (2-3 minutos). De igual forma se realizó con el tejido caulinar.
3. De la mezcla obtenida se tomó una alícuota de 15 μ l, la cual fue colocada sobre las placas que contenían el medio SMSA. Seguidamente se realizó un estriado utilizando un asa de inoculación debidamente esterilizada. Para el caso de la muestra de suelo, se tomó una alícuota 15 μ l de la solución obtenida con el tampón de extracción descrita anteriormente, realizando el mismo procedimiento para llevar a cabo el estriado.
4. Los medios de cultivo fueron colocados a temperatura ambiente (28°C) durante 48-72 horas para el desarrollo de las colonias.
5. Por último se realizó la purificación de las colonias. Se seleccionaron las colonias con características propias de *Ralstonia solanacearum*, consistencia mucoide y coloración rojiza para su posterior replicación.

6.5 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

Para llevar a cabo la reacción la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo real (Q-PCR) se utilizaron 8 μ l de la mezcla obtenida por maceración del tejido vascular de tubérculos y tallos, la cual corresponde a la misma mezcla que fue utilizada para llevar a cabo el estriado sobre los medios SMSA. Para el caso de las muestras de suelo, se emplearon 8 μ l de la solución obtenida con el tampón de extracción.

La reacción fue llevada a cabo en tubos Eppendorf de 0.2 ml, colocando 17µl de Master Mix, 8 µl de cada muestra. El Master Mix estuvo compuesto de 25µl de agua esterilizada, 125µl de BioRad SYBR Green supermix, 10µl del cebador delantero 630 y 10µl del cebador de reversa 631.

Los cebadores específicos para la detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1 que fueron utilizados tienen la siguiente secuencia (Weller 2000):

630 (5´-ATACAGAATTTCGACCGGCAC-3´)

631 (5´-AATCACATCCAATTTCGCCTACG-3´)

La amplificación llevada a cabo por el termociclador consistió de los siguientes ciclos: primer ciclo de 10 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 15 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C (Champoiseau, Jones, Allen 2009).

6.6 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional

La Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional se llevó a cabo a partir de las colonias bacterianas empleando para ello tubos Eppendorf de 0.2 ml adicionando ADN molde 40 ng, Amortiguador 10X 2.5 µL, 25 mM MgCl₂ 2.5 mM, 2.5 mM dNTPs 0.25 mM, Taq polimerasa 5 U/µL 0.5u/reacción, Cebador delantero 10 µM 1 µM, Cebador reversa 10 µM 1 µM (Sánchez P, Mejía, Fegan, Allen 2008).

Los cebadores específicos para detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1 que se emplearon poseen la siguiente secuencia (Weller 2000):

630 (5'-ATACAGAATTCGACCGGCAC-3')

631 (5'-AATCACATCCAATTCGCCTACG-3')

La amplificación de las reacciones de PCR se realizó en un termociclador por medio de los siguientes ciclos: 3 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C. La reacción se completara con 5 minutos a 72°C (Sánchez P, Mejía, Fegan, Allen 2008).

6.7 Protocolo de electroforesis

Para efectuar la electroforesis se utilizó un gel de agarosa al 1.5% para el corrido de las cadenas de ADN luego del PCR. El procedimiento fue el siguiente (Rodríguez 2007):

- a. Pesar y preparar la solución de agarosa la cual se fundió en horno microondas.
- b. Se colocó la solución en un molde nivelado horizontalmente y ya también el molde para pozos con el número de celdas a utilizarse.
- c. Se dejó reposar hasta que se solidificó la solución.
- d. Se colocó el gel sólido sobre la cámara de electroforesis y se agregó buffer (TBE a 0.5X).
- e. Se aplicó 2 µL de buffer de carga por muestra de ADN.
- f. Se agregó el marcador de peso.

- g. Se llenaron los pozos con las muestras obtenidas por PCR, evitando la contaminación y mezcla entre las mismas.
- h. Se proveyó la fuente de poder a la cámara para iniciar la electroforesis.
- i. Terminó la electroforesis cuando el color del cargador avanzó aproximadamente $2/3$ partes del gel.
- j. Seguidamente se colocó el gel en la solución de Bromuro de Etidio y buffer para su tinción. Se sumergió el gel con agitación durante 10-15 minutos, tomando las precauciones necesarias para su manejo dado a las características cancerígenas del Bromuro de Etidio.
- k. Finalmente se colocó el gel en un trasiluminador y se observó con luz ultravioleta.
- l. Se observaron los resultados de la corrida de ADN y se archivaron fotos para su posterior análisis.

6.8 Análisis e interpretación de los resultados

Los resultados obtenidos a través del PCR en Tiempo Real, fueron analizados en base a comportamiento de las gráficas obtenidas por medio del termociclador, las cuales mostraron el proceso de amplificación en tiempo real. Las muestras que fueron positivas, mostraron un incremento significativo de la fluorescencia emitida por la sonda alrededor de los primeros 25 ciclos de amplificación; por el contrario, cuando el comportamiento de la emisión de fluorescencia no presentó un incremento durante los primeros 25 ciclos de amplificación, se tomó como una reacción negativa aunque si

presentó un incremento de la fluorescencia al final del proceso. Mediante estos parámetros se evaluó la especificidad de la reacción.

Por otra parte, la información obtenida con el PCR en Tiempo Real, a partir de las diferentes muestras analizadas, fue comparada con los resultados obtenidos con el PCR convencional. Con esta comparación de datos se pudo verificar la efectividad del PCR en Tiempo Real, ya que la técnica convencional ofrece resultados confiables debido a que los protocolos utilizados han sido validados a través de numerosas investigaciones.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de la obtención de las muestras de tejido vegetal y de suelo se procedió a realizar el aislamiento de la bacteria a través del medio SMSA, obteniendo los siguientes resultados.

7.1 Siembra y aislamiento de *Ralstonia solanacearum*

Posteriormente al estriado realizado en las placas con medio SMSA, se observaron crecimientos de colonias bacterianas de forma irregular, las cuales mostraron una consistencia lechosa, mucoide y blanquecina de coloración rojiza al centro, típico del patógeno de estudio. Este crecimiento se observó a partir de 72 horas después de la siembra, presentando una velocidad de crecimiento homogénea para todas las muestras. De la totalidad de aislamientos realizados, se obtuvieron 17 muestras positivas, tanto de suelo como de tejido vegetal.



Figura 8. Aislamiento positivo de *R. solanacearum*

Las muestras identificadas como negativas no mostraron crecimiento bacteriano alguno en el medio SMSA aún después de transcurridos 5 días. Por otra parte, aunque hubo crecimiento de algunas colonias en el medio SMSA, las características morfológicas de las colonias no correspondían a las del patógeno de interés. De esta forma se confirmó la ausencia del patógeno en la muestra analizada.



Figura 9. Aislamiento negativo de *R. solanacearum*

Los resultados del total de muestras analizadas se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 6. Resultados obtenidos de los aislamientos.

	MUESTRA	CRECIMIENTO BACTERIANO	CÓDIGO DE AISLAMIENTO
Patzcía, Chimaltenango	Suelo	Positivo	M1
	Suelo	Positivo	M2
	Suelo	Negativo	M3
	Suelo	Negativo	M4

Continuación Cuadro 6...

Patzcía, Chimaltenango	Suelo	Positivo	M5
	Tallo	Positivo	M6
	Tallo	Negativo	M7
	Tallo	Positivo	M8
	Tallo	Positivo	M9
	Tallo	Positivo	M10
	Tubérculo	Negativo	M11
	Tubérculo	Positivo	M12
	Tubérculo	Positivo	M13
	Tubérculo	Positivo	M14
	Tubérculo	Negativo	M15
Santa María de Jesús, Sacatepéquez	Suelo	Positivo	M16
	Suelo	Positivo	M17
	Suelo	Positivo	M18
	Suelo	Negativo	M19
	Suelo	Negativo	M20
	Tallo	Positivo	M21
	Tallo	Negativo	M22
	Tallo	Positivo	M23
	Tallo	Positivo	M24
	Tallo	Positivo	M25

7.2 Detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1 mediante la técnica de PCR convencional

Partiendo de las muestras positivas obtenidas en el medio SMSA, se procedió a realizar una amplificación mediante PCR convencional para la identificación del sequevar 1 a nivel molecular. Se obtuvieron 12 resultados positivos para la totalidad de las 17 muestras identificadas como positivas en el medio SMSA.

Una vez finalizado el proceso de amplificación se logró la identificación de segmentos amplificados de 307 pares de bases correspondientes a la región específica para el sequevar 1, los cuales fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

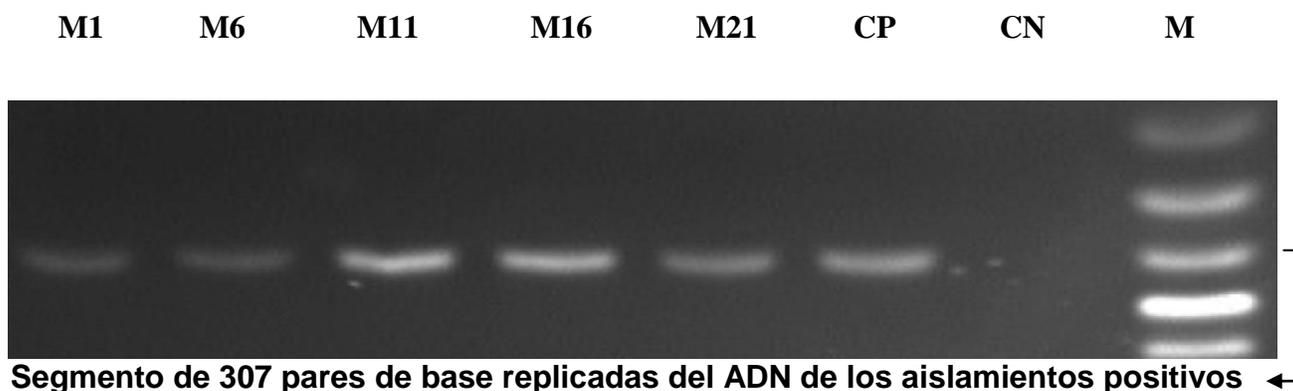


Figura 10. Producto amplificado mediante PCR utilizando los cebadores específicos 630 y 631 para la detección de *R. solanacearum* sequevar 1. CP control positivo, CN control negativo, M marcador de peso molecular.

En las muestras identificadas como negativas, no se obtuvo la amplificación del segmento específico para el sequevar 1. La ausencia de dicha amplificación puede ser

debida a una incorrecta identificación de las colonias obtenidas a partir de la incubación en el medio SMSA (falso positivo), razón por la cual los primers no encontraron el sitio específico de hibridación para poder dar inicio a la amplificación del segmento de interés.

Por otra parte, aunque las colonias identificadas en el medio SMSA si correspondieran a la bacteria *Ralstonia solanaceum*, no necesariamente corresponden al sequevar 1, razón por la cual los primers tampoco encontraron el sitio específico de hibridación para iniciar la amplificación. Una tercera causa pudo haber sido la poca cantidad de ADN bacteriano disponible al momento de iniciar la amplificación por PCR, sin embargo, esta causa puede ser descartada debido a que la cantidad de ADN utilizada para todas las muestras fue la misma, de manera que si la cantidad hubiera sido insuficiente, se hubieran presentado resultados negativos para todas las muestras.

Cuadro 7. Resultado de las muestras analizadas mediante PCR convencional, a partir de colonias obtenidas del medio SMSA.

Código de aislamiento	M1	M2	M5	M6	M8	M9	M10	M12	M13
Amplificación por Q-PCR 307 pb	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Código de aislamiento	M14	M16	M17	M18	M21	M23	M24	M25	
Amplificación por Q-PCR 307 pb	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	

7.3 Detección de *Ralstonia solanacearum* sequevar 1 mediante la técnica de PCR en Tiempo Real

Mediante la amplificación a través de PCR en tiempo real se logró identificar 9 muestras positivas, las cuales mostraron un comportamiento exponencial de la curva de amplificación, atravesando el umbral de ciclo antes de los 25 ciclos de amplificación. Este comportamiento fue debido a la hibridación de los primers en los sitios específicos del ADN bacteriano, formando así segmentos de amplificación bicatenarios, en los cuales el agente intercalante SYBR green se introdujo en la doble hebra de ADN para producir destellos de fluorescencia, los cuales fueron captados por el sensor óptico del termociclador indicando así la presencia del sequevar 1 de *R. solanacearum*.

Por el contrario, las muestras negativas no mostraron un incremento de fluorescencia a lo largo de los ciclos de amplificación, debido a la ausencia de la secuencia específica de ADN para que los primers se hibridaran, estableciendo así la ausencia del sequevar 1. La cantidad inicial de ADN es otra causa por la cual la curva de amplificación atravesó el umbral de ciclo más allá del límite establecido (25 ciclos) pues se necesita de una cantidad mayor de ciclos para que la cantidad de copias del segmento amplificado sean las suficientes para que el destello de fluorescencia, emitido por el SYBR green, sea suficiente para ocasionar un comportamiento exponencial de la curva de amplificación, pues cabe mencionar que la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad copias del segmento amplificado.

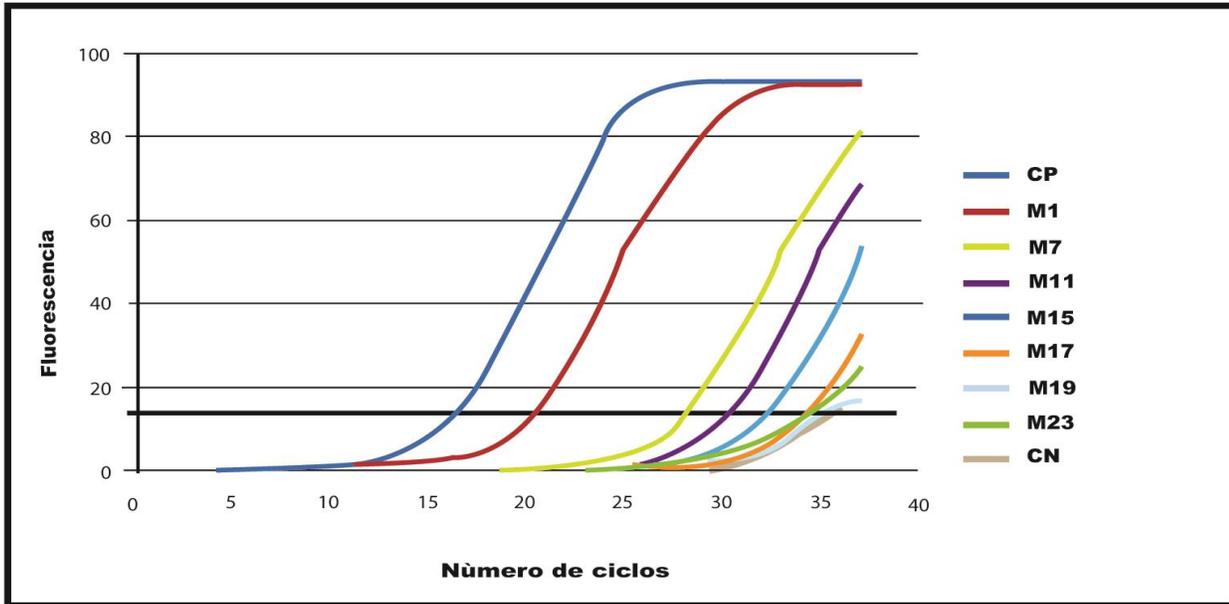


Figura 11. Curvas de amplificación Q-PCR. CP control positivo CN control negativo

Sin embargo, se establece un umbral en el número de ciclos de amplificación, ya que los primers utilizados contienen regiones con secuencias complementarias por lo que podría darse una hibridación entre ellos y como consecuencia el agente intercalante emitiría destellos de luz al ubicarse entre el segmento bicatenario. Esta situación se observó en el control negativo, pues a pesar que se utilizó agua estéril, como producto para la amplificación, la curva de amplificación mostró un comportamiento exponencial a partir de los 35 ciclos, atravesando así el umbral de ciclo a pesar de no contener ADN específico para que se pudiera llevar a cabo la reacción de amplificación.

A continuación se muestran los resultados de las muestras analizadas.

Cuadro 8. Resultados de la amplificación mediante Q-PCR.

SITIO DE MUESTREO	MUESTRA	TC	PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN	CÓDIGO DE LA MUESTRA
Patzcía, Chimaltenango Patzcía, Chimaltenango	Suelo	22	Positivo	M1
	Suelo	35	Negativo	M2
	Suelo	38	Negativo	M3
	Suelo	30	Negativo	M4
	Suelo	32	Negativo	M5
	Tallo	22	Positivo	M6
	Tallo	28	Negativo	M7
	Tallo	30	Negativo	M8
	Tallo	20	Positivo	M9
	Tallo	30	Negativo	M10
	Tubérculo	32	Negativo	M11
	Tubérculo	22	Positivo	M12
	Tubérculo	30	Negativo	M13
	Tubérculo	20	Positivo	M14
	Tubérculo	33	Negativo	M15

Continuación cuadro 8...

Santa María de Jesús, Sacatepéquez	Suelo	20	Negativo	M16
	Suelo	34	Negativo	M17
	Suelo	22	Positivo	M18
	Suelo	34	Negativo	M19
	Suelo	32	Negativo	M20
	Tallo	34	Negativo	M21
	Tallo	20	Positivo	M22
	Tallo	34	Negativo	M23
	Tallo	19	Positivo	M24
	Tallo	20	Positivo	M25

Al realizar la comparación de resultados, entre la técnica de PCR convencional y el PCR en tiempo real, se observó que 5 muestras no fueron coincidentes. Para 4 de estas muestras se presenta una reacción positiva para el PCR convencional pero negativa para el PCR en tiempo real. Esto pudo deberse a la cantidad inicial de ADN utilizado para llevar a cabo la amplificación con el PCR en tiempo real, ya que se necesita de un mayor número de ciclos de para producir un comportamiento exponencial de la curva de amplificación, mientras que en el PCR convencional se dispone de un mayor número de ciclos y no se establece un umbral en el número de ciclos de amplificación, de manera que aunque no se haya obtenido un gran número de copias del segmento de interés, la banda correspondiente a dicho segmento puede ser

observada en el gel de agarosa aunque la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio no sea tan alta.

Para el caso de la muestra identificada como positiva por el PCR en tiempo real y negativa por el PCR convencional, la diferencia en el resultado pudo ser debida a una mala identificación de las colonias bacterianas que crecieron en el medio SMSA (falso negativo) quedando descartada desde este momento, para realizar una amplificación por PCR convencional.

La hibridación de los primers entre sí, quedó descartada debido a que la curva de amplificación atravesó el umbral a los 20 ciclos de amplificación, lo cual indica una alta cantidad de ADN bacteriano inicial en el cual los primers hibridaron al encontrar su secuencia complementaria correspondiente al sequevar 1.

8 CONCLUSIONES

- Es posible realizar la detección de la bacteria *Ralstonia solanacearum* al nivel del sequevar 1 partiendo de muestras de suelo y tejido vegetal utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Q-PCR).
- La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real es capaz de realizar una detección específica para el sequevar 1 de la bacteria *Ralstonia solanacearum*, debido a que mediante el empleo de esta técnica se logró la amplificación de un segmento 307 pares de bases de ADN localizado en la región del gen de la endoglucanasa.
- La efectividad de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real para la detección específica de la bacteria *Ralstonia solanacearum* sequevar 1 se estableció en un 80% al lograr los mismos resultados en 20 de las 25 muestras analizadas mediante las dos modalidades de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

9 RECOMENDACIONES

- Evaluar el uso de sondas de hibridación específicas para evitar los falsos positivos que pueden presentarse mediante el uso de agentes intercalantes. Esto con el fin de realizar una mejor evaluación de la especificidad de la técnica evaluada.
- Ampliar las zonas de estudio para identificar la presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum* sequevar I a nivel nacional.
- Desarrollar nuevos protocolos para el uso de la técnica Q-PCR en la detección de patógenos que afecten a cultivos de interés económico.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Álvarez, B; Vasse, J; Le-Courtois, V; Trigalet-Démery, M; López, M; Trigalet, A. 2007. Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopatology* 98(1):59-68.
2. Buddenhagen, I; Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2:203-229.
3. CABI, UK. 2003. Crop protection compendium (en línea). Wallingford, United Kingdom. Consultado 10 abr 2010. Disponible en: <http://www.cabicompendium.org/cpc>
4. Champoiseau, PG; Jones, JB; Allen, C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties (en línea). *Plant Management Networks*. Consultado 2 mar 2010. Disponible en: <http://www.apsnet.org/online/feature/ralstonia/>
5. Chien, A; Edgar, DB; Trela, JM. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bact.* 174:1550-7.
6. Cimino, GD; Metchette, KC; Tessman, JW; Hearst, JE; Isaacs, ST. 1991. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the PCR. *Nucleic Acids Res.*19:99-107.
7. Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbial. Clin.* 22(5):299-305.
8. DEFRA (Department for Environment, Food and Rural Affairs of United Kingdom, UK). 2003. Plant pathology (en línea). Consultado 10 abr 2010. Disponible en: www.defra.gov.uk/plant/phnews/openday/brown.pdf
9. Elphinstone, J; Hennessey, J; Wilson, J; Stead, D. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of the *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bull.* 26:663-678.
10. ERS (Economic Research Service, US). 2003. Statistical indicators. US, USDA, Economic Research Service Publications. Consultado 7 abr 2010. Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/publications/>
11. Fegan, M; Prior, P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum*” species complex?. St. Paul, MIN, US, APS. p. 449-61.
12. Floyd, J. 2008. New pest response guidelines: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 (en línea). Riverdale, Maryland, US, USDA / APHIS / PPQ / Emergency

and Domestic Programs. Consultado 21 mar 2010. Disponible en: http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/index.shtml

13. Fulladolsa Palma, AC. 2009. Desarrollo de un marcador molecular, basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, para la detección del gen *I-3* de resistencia a la marchitez vascular en el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* raza 3 y servicios realizados en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala, USAC. 115 p.
14. García Pérez, HM. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico* 1(2):31-41.
15. Gardner, EJ; Simmons, MJ; Snustad, DP. 200. Principios de genética. 4 ed. Trad. por Angélica Santana Calderón. México, Limusa. 119 p.
16. Gonzalez, I; Arias, Y; Peteira, B. 2009. Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *Ralstonia solanacearum* – plantas hospedantes. *Rev. Protección Veg.* 24(2):69-80.
17. Gonzalo, M; Díaz, C; Saladrigas-Isenring, V; González Halphen, D. 2003. Glosario-vocabulario de bioquímica y biología molecular (en línea). Argentina. Consultado 24 mar 2010. Disponible en http://www.espanol.pcrlinks.com/variantes/nested_pcr.htm
18. Griep, RA; Van Twisk, JR; Van Beckhoven, JM; Van der Wolf, A. 1998. Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* race 3. *Phytopathology* 88:795-803.
19. Hayward, AC. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265-277.
20. _____. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65- 87.
21. Holland, PM; Abramson, RD; Watson, R; Gelfand, DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 88:7276-80.
22. Huan, J; Wu, L; Li, C; Xiao, C; Wang, G. 2009. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil with quantitative, real-time PCR assays. *J. Appl. Microbiol.* 107:1729-1739.
23. Iowa State University, US. 2005. From Mendel to markers: impact of molecular technologies on animal, plant and human genetics, lesson module II- marker

assisted selection. Iowa, US, Universidad Estatal de Iowa, Oficina de Biotecnología. p. 57-115.

24. Izaguirre De León, LF. 2008. Epidemiología de la marchitez bacteriana *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill, en el oriente de Guatemala. Tesis Ing Agr. Guatemala, USAC. 82 p.
25. Ji, P; Allen, C, Sánchez-Pérez, A; Yao, J; Elphinstone, JG; Jones, JB; Momol, M. 2007. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. Plant Dis. 91:195-203.
26. Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*, a literature review and bibliography. NC. Agric. Exp. Station. 194 p. (Tech. Bull. 99).
27. Lambert, CD. 2002. Agricultural bioterrorism protection act of 2002: possession, use, and transfer of biological; agents and toxins; interim and final rule: (7 CFR Part 331). Federal Register 67:76908-76938.
28. Lee, MA; Squirrell, DJ; Leslie, DL; Brown, T. 2004. Homogeneous fluorescent chemistries. In Real-time PCR; an essential guide UK, Horizon Bioscience. p. 85-102.
29. López Tzoc, JG. 2004. Evaluación del solarizado para el control de *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de tomate *Lycopersicon esculentum*, en la aldea El Tempisque, Agua Blanca, Jutiapa. Tesis Ing Agr. Guatemala, USAC. 43 p.
30. Machmud, M; Suryadi, Y. 2008. Detection and identification of *Ralstonia solanacearum* strains using the indirect ELISA technique. Indonesian Journal of Agriculture 1:13-21.
31. Meiners, U. 2000. Bacterial ring rot: possibilities and limits of insurance coverage (en línea). País, Organización. Consultado 13 mar 2010. Disponible en http://ibws.nexenservices.com/from_july_%2001.htm
32. Moretti, T; Koons, B; Budowle, B. 1998. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. Biotechniques 25(7):16-22.
33. Mullis, KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 262(4):56-61, 65-65.
34. Nakhla, MK. 2004. Seminario: métodos de laboratorio para la detección de patógenos – PCR. In Métodos moleculares para el diagnóstico de patógenos y mejoramiento para resistencia en vegetales. Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Agronomía. 15 p.

35. Opina, N; Tavner, F; Hollway, G; Wang, JF; Li, TH; Maghirang, R; Fegan, M; Hayward, AC; Krishnapilai, V; Hong, WF; Holloway, BW; Timmis, J; 1997. A novel method for development of species and strains-specifics DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*) Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotch 5:19-30.
36. Osma, M; Querci, M. 2007. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos: electroforesis en gel de agarosa, sesión no. 5 (en línea). EU, OMS, Oficina Regional para Europa. Consultado 10 mar 2010. Disponible en: <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesion5.pdf>
37. Ozakman, M; Schaad, NW. 2003. A real-time bio-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tuber. J. Plant Pathol. 25:232-238.
38. Padilla P, CA; Diez D, J; Martínez G, E; Bárcena R, JA; García A, C. 2006. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa: aislamiento y caracterización electroforética de ADN plasmídico (en línea). Córdoba, España, Universidad de Córdoba, Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Consultado 26 mar 2010. Disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimicabiolmol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>
39. Pstrik, K; Maiss, E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology. 148:619-626.
40. Poussier, S; Prior, P; Luisetti, J; Hayward, AC; Fegan, M. 2000. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. Syst. Appl. Microbiol. 23:479-486.
41. Pradhanang, P; Elphinstone, J; Fox, R. 2000. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. Plant Pathol. 49:414-422.
42. Priou, S; Gutarra, L; Aley, P. 2006a. An improved enrichment broth for de sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovar 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. Plant Pathol. 55:36-45.
43. _____. 2006b. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. Plant Pathol. 49:414-422.
44. Sánchez P, A; Mejía, L; Fegan, M; Allen, C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. Plant Pathology 57:320-331.

45. Schaad, N; Jones, J; Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. St. Paul, MN, US, American Phytopathological Society. p. 151-163.
46. Vinueza, C. 2009. Real time PCR: the new age of cellular genetic information. REDVET (Revista Electrónica de Veterinaria, ES) 10(2):1-13.
47. Weller, SA; Elphinstone, JG; Smith, NC; Boonham, N; Stead, DE. 2000a. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. J. Appl. Environ. Microbiol. 66:2853-2858.
48. Yabuuchi, E; Kosato, Y; Yano, I; Hotta, H; Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two Burkholderia and an Alacligenses species to Ralstonia gen. nov.: proposal of Ralstonia pickettii (Ralstonia, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1986) comb. nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. Immunol 39:897-904