

Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Xochimilco  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Producción Agrícola y Animal Licenciatura en  
Agronomía

Proyecto de Servicio Social

Generación del banco de DNA a partir de cepas de la colección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para la producción de controles positivos.

Prestador de Servicio Social:

Orihuela Castañeda Mariana

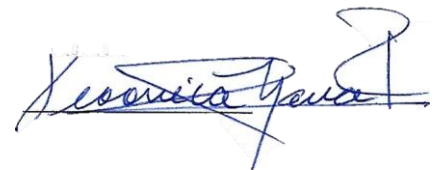
Matrícula: 2193029786

Asesor Interno:

Dra. Verónica María Teresa Nava Rodríguez

Número económico: 18719

Firma



Asesor Externo:

Biol. Ana Abigail Vega Aragón

Cédula Profesional: 11141237

Firma



Lugar de realización:

Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). Carretera Federal México-Pachuca km 37,5, Tecámac, 55740 México.

Fecha de inicio y terminación: 1/marzo/2024-2/sep/2024

## **INTRODUCCIÓN**

El laboratorio de bacteriología ubicado en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) tiene la misión de regular y fortalecer destrezas y habilidades en la identificación de plagas mediante pruebas y ensayos experimentales y la generación de material de referencia de sanidad vegetal, así como ayudar en la respuesta a los problemas fitosanitarios, contribuyendo en la competitividad del sector agropecuario, agroalimentario y agroindustrial de México. Actualmente el laboratorio cuenta con una colección de cepas donde alberga 158 diferentes ejemplares de bacterias fitopatógenas entre ellas se encuentran 8 familias, 19 géneros y 47 especies estas han sido obtenidas de diferentes cultivos nacionales, y de materia de importación, los cuales se encuentran resguardados por dos métodos de preservación liofilización y método lote-semilla a  $-80^{\circ}$  C.

Las bacterias fitopatógenas afectan a diferentes cultivos agrícolas además de infectar árboles, plantas, flores, frutos y semillas.

La colección de bacterias fitopatógenas representa la diversidad biológica de los patógenos que afectan a los cultivos agrícolas del país, además de ser reservorios de recursos genéticos permite utilizarse como material de referencia para la generación de controles positivos para el desarrollo de investigaciones y cumplir con el adecuado diagnóstico de bacterias fitopatógenas de importancia económica y cuarentenaria. El uso de controles positivos se emplea en la estandarización de los ensayos y permiten evaluar posibles falsos negativos.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Continuar generando información sobre el banco de DNA de las cepas de bacterias de la colección del CNRF.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Reactivar cepas de bacterias fitopatógenas de la colección del CNRF.
2. Evaluar la viabilidad de las cepas mediante pruebas bioquímicas y moleculares.
3. Generar una base de datos de la información del banco de DNA.

### **METODOLOGÍA UTILIZADA**

Este trabajo se llevará a cabo en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, Tecámac, 55740 México. A continuación, se muestran las técnicas y metodologías para obtener cada objetivo planteado en este servicio social.

## **1) Reactivar cepas de bacterias fitopatógenas de la colección del CNRF**

### 1.1 Preparar los medios de cultivo

Para el crecimiento de las cepas bacteriológicas utilizaremos como medio de cultivo sustratos sólidos. Los más recomendables para el desarrollo óptimo de bacterias fitopatógenas son B de King (BK) 523 (Kado & Heskett, 1970) y LB (Sambrook, *et al*, 1989).

### 1.2 Sembrar las bacterias.

Una vez que tengamos las cajas petri con los medios de cultivo solidificados y esterilizados procederemos a realizar la siembra de las bacterias por estría cruzada.

### 2.1 Revisar la morfología colonial.

Para la identificación morfológica de las colonias bacterianas se realizará por observación en un microscopio estereoscópico, tomando en cuenta la forma de las colonias bacterianas y comparándolas con las características señaladas en el cuadro de referencia de morfología colonial de Arauz Cavallini (1998)

### 1.3 Purificación

La purificación se realizará a partir del aislamiento de las cepas bacterianas esto con el objetivo de tener únicamente cepas de la bacteria que utilizaremos (SENASICA, 2020).

### 1.4 Realizar pruebas de patogenicidad.

Para realizar las pruebas de patogenicidad, es necesario seleccionar un método de inoculación adecuado, el hospedante y la vía de entrada del patógeno, de este modo se verificará la patogenicidad de la bacteria; se utilizarán las pruebas pudrición del tubérculo de papa e hipersensibilidad en tabaco (SENASICA, 2020).

#### 1.4.1 Tinción de Gram.

Se utilizará la Técnica de tinción de Gram propuesta por Christian Gram 1884 la cual consiste en la tinción de la pared celular de las bacterias, donde se emplean los colorantes cristal violeta y safranina de esta manera es posible identificar el tipo de pared celular de la bacteria en estudio, Gram negativa o Gram positiva.

Para realizar la prueba se deberá colocar sobre un portaobjetos una asada del cultivo bacteriano, es importante mencionar que el cultivo debe de estar puro. Se determinarán como bacterias Gram positivas, aquellas que fijen el color morado y como bacterias Gram negativas aquellas que presenten un color rosado.

#### 1.4.2 Reacción KOH

La prueba de reacción KOH nos ayuda a confirmar los resultados de la prueba tinción de Gram, esta prueba consiste en utilizar solución KOH al 3% y colocarla en un portaobjetos en el caso de las bacterias Gram negativas causará un incremento de viscosidad, y se observará la

presencia de filancia; en el caso de las Gram positivas se observará una consistencia acuosa y sin presencia de filancia (Da Silvia Romeiro, 2001).

#### 1.4.3 Reacción Oxidasa

La oxidasa es una enzima que oxida el citocromo C de la cadena transportadora de electrones. Su detección se realiza empleando tetrametil-p-fenilendiamina (TMFD) (Rodríguez Mejía, 2006). Es necesario trabajar con la cepa pura, un indicador comercial (BD BBL DrySlide) y puntas de plástico estériles. Se tomará un poco del cultivo bacteriano con la punta de plástico y se colocará un punto sobre el indicador BD. Si el indicador vira a un color azul, indica que es Gram positivas (+). Si el cambio de color es amarillo, indica que son Gram negativas (-).

### **2) Evaluar la viabilidad de las cepas mediante pruebas bioquímicas y moleculares**

#### 2.1 Realizar pruebas bioquímicas (Biolog).

Es un sistema de identificación precargado con 94 pruebas bioquímicas; 27 pruebas de carbono y 23 ensayos de sensibilidad química, que se utilizan para identificar el genotipo bacteriano a nivel de especie (SILVERA CIENCIA E INGENIERÍA, 2019). Los resultados se ven reflejados en un cambio de color purpura para indicar que la prueba es positiva e incolora si la prueba es negativa.

#### 2.2 Técnicas Moleculares.

Las técnicas moleculares incluyen dos etapas: amplificación del gen a partir de la cepa bacteriana y determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón mediante electroforesis en gel de agarosa, para asegurar la presencia de un único fragmento, amplificado y el tamaño adecuado (Rodicio, 2004).

##### 2.2.1 Extracción de DNA

#### **Metodología de extracción con el kit DNeasy Blood & Tissue**

1. Macerar en mortero congelado (-80 °C) 0.1 g de tejido vegetal, hasta obtener un polvo fino.
2. Transferir el polvo a un tubo de 2.0 mL y agregar 360 µl de buffer ATL y 20 µl de proteinasa K. Dar vórtex hasta homogenizar la muestra.

#### **Para cepa bacteriana:**

1. Partir de una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC. Tomar 500 µL de la suspensión y transferirlo a un tubo de 2.0 mL, agregar 180 µL de buffer ATL y 20 µl de proteinasa K. Dar vórtex hasta homogenizar la muestra.

2. Incubar los tubos 10 min a 56 °C, mezclar por inversión dos o tres veces durante la incubación.
3. Agregar 400 µL de buffer AL para tejido vegetal y 200 µL de buffer AL para cepa bacteriana. Incubar los tubos 10 min a 56 °C
4. Agregar 400 L de etanol al 100 % para tejido vegetal y 200 µL de etanol al 100 % para cepa bacteriana. Mezclar por inversión.
5. Centrifugar el lisado 5 min a 14 000 rpm.
6. Recuperar 600 µL del lisado y transferirlo a una columna DNeasy Mini spin montada en un tubo colector de 2 mL. Centrifugar a 8 000 rpm durante 2 min. Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2 mL.
7. Para el caso de cepa, recuperar primero 600 µL del lisado, centrifugar, desechar el líquido y recuperar el lisado restante. Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2 mL.
8. Agregar a la columna 500 µL de buffer AW1 y centrifugar 1 min a 8 000 rpm.
9. Transferir la columna a un nuevo tubo colector de 2 mL y agregar 500 µL de buffer AW2. Centrifugar 3 min a 14 000 rpm.
10. Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL y eluir el DNA con 50 µL buffer AE para tejido vegetal y con 50 µL para cepa bacteriana. Incubar los tubos 2 min a temperatura ambiente y centrifugar 3 min a 8 000 rpm.
11. Almacenar el DNA a 4°C o -20°C

### 2.2.2 Revisión de la concentración de DNA

La cuantificación de la concentración de DNA se realizará por medio de espectrofotometría con el programa NanoDrop el cual detecta las concentraciones promedio del ADN y además de la pureza de este (Mancera, 2020).

Se tomaron en cuenta los parámetros de buena calidad del Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN (2024) donde la relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe

tener al menos una relación  $A_{260}/A_{280} \geq 1.6$ .

### 2.2.3 Amplificación

La amplificación se realizará mediante el ensayo de PCR que consiste en la amplificación del gen 16s (Arahal et al. 2008).

### 3) Generar una base de datos de la información del banco de DNA de la colección del CNRF

Para la generación de la base de datos nos apoyaremos del programa informático Excel donde recabaremos la siguiente información:

Número, método de reactivación, fecha de identificación, ID del ejemplar, nombre, acrónimo, hospedante, réplicas, presencia de crecimiento y técnicas utilizadas para su verificación.

### ACTIVIDADES REALIZADAS

#### Marzo 2024

- Se realizaron actividades de apoyo como esterilización y lavado de material, además de la preparación de soluciones como alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 1%, con el objetivo de familiarizarse con el laboratorio, materiales y sustancias.
- Se preparó un litro del medio de cultivo BK porque es un medio semiselectivo que permite la separación de los géneros de bacterias fitopatógenas, y se vació en cajas Petri dentro de una campana de bioseguridad nivel 2 para posteriormente esterilizarlas con ayuda de luz UV.
- El material se sometió a un tratamiento de reactivación, debido a que se encuentra en dormancia se dejó en agitación durante 24 horas, de esta manera reactivar sus genes de patogenicidad, una vez que se tuvo el medio de cultivo estéril dentro de la campana, se realizó la primera siembra por el método de estría cruzada de la bacteria *Erwinia amylovora* spp.
- Una vez que la cepas crecieron, se observó la morfología colonial con la ayuda del microscopio estereoscópico, seleccionando las colonias a fin para después realizar aislados puros, los cuales consisten en tomar parte de la cepa y resembrarlos en una nueva caja Petri con el método de estriado simple, esto con el objetivo de obtener cultivos puros una vez que se obtuvo la cepa purificada, se realizaron pruebas de patogenicidad, en este caso la prueba que utilice fue pudrición en papa, la cual consiste en hacer un corte transversal en el tubérculo y realizar pequeños cortes en el centro del tubérculo, se tomó con ayuda de una asa o espátula, parte de la cepa y se colocó en los cortes que previamente se realizaron en el tubérculo.

- En prueba de KOH se utilizó una solución KOH al 3% y se colocó en un portaobjetos con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una asada de cultivo bacteriano puro, mezclándolo con el reactivo durante unos segundos levanta lentamente el asa, si se forma un hilo se considera resultado positivo y pertenece al grupo de las Gram negativas de lo contrario es Gram positiva.
- La prueba de tinción de Gram y reacción de oxidasa se realizará con ayuda de una placa de BD BBL™ DrySlide™ Oxidase se tomó un poco de la cepa con ayuda de una punta de plástico estéril se colocó dentro de los cuadrantes al observar si tiñe morada indica que el Gram es (+) si se tiñe de rojo es Gram (-).
- Para evaluar la viabilidad de las cepas mediante técnicas moleculares se realizó una extracción de la bacteria *Erwinia amylovora* por medio del protocolo Blood & Tissue kit de la marca Qiagen, una vez que se realizó la extracción cuantifique los valores de extracción en un espectrofotómetro NanoDrop y finalmente realice una prueba de PCR para posteriormente observar la amplificación del gen 16s con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN.
- Se generó una base de datos en Excel donde se tomó en cuenta la siguiente información:
  - Número, método de reactivación, fecha de identificación, ID del ejemplar, nombre, acrónimo, hospedante, réplicas, presencia de crecimiento y técnicas utilizadas para su verificación.
- Llenado de base de datos.
- Llenado del registro de temperatura de refrigeradores e incubadoras del laboratorio.

#### **Abril 2024**

- Se preparó un litro del medio de cultivo BK porque es un medio semiselectivo que permite la separación de los géneros de bacterias fitopatógenas, y se vació en cajas Petri dentro de una campana de bioseguridad nivel 2 para posteriormente esterilizarlas con ayuda de luz UV.
- El material se sometió a un tratamiento de reactivación, debido a que se encuentra en dormancia se dejó en agitación durante 24 horas, de esta manera reactivar sus genes de patogenicidad, una vez que se tuvo el medio de cultivo estéril dentro de la campana, se realizó la primera siembra por el método de estría cruzada de la bacteria *Ralstonia solanacearum* rz.2 y 3.
- Una vez que la cepas crecieron, se observó la morfología colonial con la ayuda del microscopio estereoscópico, seleccionando las colonias a fin para después realizar

aislados puros, los cuales consisten en tomar parte de la cepa y resembrarlos en una nueva caja Petri con el método de estriado simple, esto con el objetivo de obtener cultivos puros una vez que se obtuvo la cepa purificada, se realizaron pruebas de patogenicidad, en este caso la prueba que utilice fue pudrición en papa, la cual consiste en hacer un corte transversal en el tubérculo y realizar pequeños cortes en el centro del tubérculo, se tomó con ayuda de una asa o espátula, parte de la cepa y se colocó en los cortes que previamente se realizaron en el tubérculo.

- En prueba de KOH se utilizó una solución KOH al 3% y se colocó en un portaobjetos con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una asada de cultivo bacteriano puro, mezclándolo con el reactivo durante unos segundos levanta lentamente el asa, si se forma un hilo se considera resultado positivo y pertenece al grupo de las Gram negativas de lo contrario es Gram positiva.
- La prueba de tinción de Gram y reacción de oxidasa se realizará con ayuda de una placa de BD BBL™ DrySlide™ Oxidase se tomó un poco de la cepa con ayuda de una punta de plástico estéril se colocó dentro de los cuadrantes al observar si tiñe morada indica que el Gram es (+) si se tiñe de rojo es Gram (-).
- Para evaluar la viabilidad de las cepas mediante técnicas moleculares se realizó una extracción de las bacterias *Ralstonia solanacearum* rz.2 y 3 por medio del protocolo Blood & Tissue kit de la marca Qiagen, una vez que se realizó la extracción cuantifique los valores de extracción en un espectrofotómetro NanoDrop y finalmente realice una prueba de PCR para posteriormente observar la amplificación del gen 16s con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN.
- Llenado de base de datos.
- Se llenaron cajas con puntas de 10 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Llenado del registro de temperatura de refrigeradores e incubadoras del laboratorio.

#### **Mayo 2024**

- Se preparó un litro del medio de cultivo BK porque es un medio semiselectivo que permite la separación de los géneros de bacterias fitopatógenas, y se vació en cajas Petri dentro de una campana de bioseguridad nivel 2 para posteriormente esterilizarlas con ayuda de luz UV.
- Una vez que se tuvo el medio de cultivo estéril dentro de la campana, se realizó la primera siembra por el método de estría cruzada de la bacteria *Clavibacter michiganensis michiganensis* y *Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis*.
- Una vez que la cepas crecieron, se observó la morfología colonial con la ayuda del

microscopio estereoscópico, seleccionando las colonias a fin para después realizar aislados puros, los cuales consisten en tomar parte de la cepa y resembrarlos en una nueva caja Petri con el método de estriado simple, esto con el objetivo de obtener cultivos puros una vez que se obtuvo la cepa purificada, se realizaron pruebas de patogenicidad, en este caso la prueba que utilice fue pudrición en papa, la cual consiste en hacer un corte transversal en el tubérculo y realizar pequeños cortes en el centro del tubérculo, se tomó con ayuda de una asa o espátula, parte de la cepa y se colocó en los cortes que previamente se realizaron en el tubérculo.

- En prueba de KOH se utilizó una solución KOH al 3% y se colocó en un portaobjetos con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una asada de cultivo bacteriano puro, mezclándolo con el reactivo durante unos segundos levanta lentamente el asa, si se forma un hilo se considera resultado positivo y pertenece al grupo de las Gram negativas de lo contrario es Gram positiva.
- La prueba de tinción de Gram y reacción de oxidasa se realizará con ayuda de una placa de BD BBL™ DrySlide™ Oxidase se tomó un poco de la cepa con ayuda de una punta de plástico estéril se colocó dentro de los cuadrantes al observar si tiñe morada indica que el Gram es (+) si se tiñe de rojo es Gram (-).
- Para evaluar la viabilidad de las cepas mediante técnicas moleculares se realizó una extracción de las bacterias *Clavibacter michiganensis michiganensis* y *Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis* por medio del protocolo Blood & Tissue kit de la marca Qiagen, una vez que se realizó la extracción cuantifique los valores de extracción en un espectrofotómetro NanoDrop y finalmente realice una prueba de PCR para posteriormente observar la amplificación del gen 16s con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN.
- Llenado de base de datos.
- Llenado del registro de temperatura de refrigeradores e incubadoras del laboratorio.

#### **Junio 2024**

- Se preparó un litro del medio de cultivo BK porque es un medio semiselectivo que permite la separación de los géneros de bacterias fitopatógenas, y se vació en cajas Petri dentro de una campana de bioseguridad nivel 2 para posteriormente esterilizarlas con ayuda de luz UV.
- El material se sometió a un tratamiento de reactivación, debido a que se encuentra en dormancia se dejó en agitación durante 24 horas, de esta manera reactivar sus genes de patogenicidad, una vez que se tuvo el medio de cultivo estéril dentro de la campana, se

realizó la primera siembra por el método de estría cruzada de la bacteria *Xanthomonas campestris* y *Curtobacterium flaccumfaciens*.

- Una vez que las cepas crecieron, se observó la morfología colonial con la ayuda del microscopio estereoscópico, seleccionando las colonias a fin para después realizar aislados puros, los cuales consisten en tomar parte de la cepa y resembrarlos en una nueva caja Petri con el método de estriado simple, esto con el objetivo de obtener cultivos puros una vez que se obtuvo la cepa purificada, se realizaron pruebas de patogenicidad, en este caso la prueba que utilice fue pudrición en papa, la cual consiste en hacer un corte transversal en el tubérculo y realizar pequeños cortes en el centro del tubérculo, se tomó con ayuda de una asa o espátula, parte de la cepa y se colocó en los cortes que previamente se realizaron en el tubérculo.
- En prueba de KOH se utilizó una solución KOH al 3% y se colocó en un portaobjetos con ayuda de una asa bacteriológica se tomó una asada de cultivo bacteriano puro, mezclándolo con el reactivo durante unos segundos levanta lentamente el asa, si se forma un hilo se considera resultado positivo y pertenece al grupo de las Gram negativas de lo contrario es Gram positiva.
- La prueba de tinción de Gram y reacción de oxidasa se realizará con ayuda de una placa de BD BBL™ DrySlide™ Oxidase se tomó un poco de la cepa con ayuda de una punta de plástico estéril se colocó dentro de los cuadrantes al observar si tiñe morada indica que el Gram es (+) si se tiñe de rojo es Gram (-).
- Para evaluar la viabilidad de las cepas mediante técnicas moleculares se realizó una extracción de las bacterias, *Xanthomonas campestris* y *Curtobacterium flaccumfaciens* por medio del protocolo Blood & Tissue kit de la marca Qiagen, una vez que se realizó la extracción cuantifique los valores de extracción en un espectrofotómetro NanoDrop y finalmente realice una prueba de PCR para posteriormente observar la amplificación del gen 16s con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN.
- Llenado de base de datos.
- Se llenaron cajas con puntas de 10 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Llenado del registro de temperatura de refrigeradores e incubadoras del laboratorio.

#### **Julio 2024**

- Se preparó un litro del medio de cultivo BK porque es un medio semiselectivo que permite la separación de los géneros de bacterias fitopatógenas, y se vació en cajas Petri dentro de una campana de bioseguridad nivel 2 para posteriormente esterilizarlas con ayuda de luz UV.

- El material se sometió a un tratamiento de reactivación, debido a que se encuentra en dormancia se dejó en agitación durante 24 horas, de esta manera reactivar sus genes de patogenicidad, una vez que se tuvo el medio de cultivo estéril dentro de la campana, se realizó la primera siembra por el método de estría cruzada de la bacteria *Xanthomonas gardneri*, *vesicatoria* y *euvesicatoria*.
- Una vez que las cepas crecieron, se observó la morfología colonial con la ayuda del microscopio estereoscópico, seleccionando las colonias a fin para después realizar aislados puros, los cuales consisten en tomar parte de la cepa y resembrarlos en una nueva caja Petri con el método de estriado simple, esto con el objetivo de obtener cultivos puros una vez que se obtuvo la cepa purificada, se realizaron pruebas de patogenicidad, en este caso la prueba que utilice fue pudrición en papa, la cual consiste en hacer un corte transversal en el tubérculo y realizar pequeños cortes en el centro del tubérculo, se tomó con ayuda de una asa o espátula, parte de la cepa y se colocó en los cortes que previamente se realizaron en el tubérculo.
- En prueba de KOH se utilizó una solución KOH al 3% y se colocó en un portaobjetos con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una asada de cultivo bacteriano puro, mezclándolo con el reactivo durante unos segundos levanta lentamente el asa, si se forma un hilo se considera resultado positivo y pertenece al grupo de las Gram negativas de lo contrario es Gram positiva.
- La prueba de tinción de Gram y reacción de oxidasa se realizará con ayuda de una placa de BD BBL™ DrySlide™ Oxidase se tomó un poco de la cepa con ayuda de una punta de plástico estéril se colocó dentro de los cuadrantes al observar si tiñe morada indica que el Gram es (+) si se tiñe de rojo es Gram (-).
- Para evaluar la viabilidad de las cepas mediante técnicas moleculares se realizó una extracción de las bacterias *Xanthomonas gardneri*, *vesicatoria* y *euvesicatoria* por medio del protocolo Blood & Tissue kit de la marca Qiagen, una vez que se realizó la extracción cuantifique los valores de extracción en un espectrofotómetro NanoDrop y finalmente realice una prueba de PCR para posteriormente observar la amplificación del gen 16s con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN.
- Llenado de base de datos.
- Llenado del registro de temperatura de refrigeradores e incubadoras del laboratorio.

#### **Agosto 2024**

- Se etiquetó el material obtenido y escribí el informe final.
- Llenado del registro de temperatura de refrigeradores e incubadoras del laboratorio.

## METAS ALCANZADAS

- Meta: Continuar generando información sobre el banco de DNA de las cepas de bacterias de la colección del CNRF.

Se logró generar y recopilar información sobre el banco de DNA de las cepas de bacterias del CNRF mediante la generación de la base de datos en Excel. De esta manera, la información es más fácil de encontrar y se puede llevar un registro e inventario del material existente. Además, se reactivaron las cepas ya existentes mediante la siembra y extracción del material genético utilizando el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue, se logró una exitosa amplificación del material genético, su preservación y etiquetado correspondiente con el fin de mantener el material genético en condiciones óptimas para la generación de controles positivos utilizados en los diagnósticos que se realizan día con día.

## RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Los resultados del kit de extracción DNeasy Blood & Tissue fueron los siguientes para *Erwinia amylovora* (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de concentración y calidad de ADN para *Erwinia amylovora*.

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/μL	0	0
1	<i>Erwinia amylovora</i>	ng/μL	30	2.01
2	<i>Erwinia amylovora</i>	ng/μL	17.3	2.03
3	<i>Erwinia amylovora</i>	ng/μL	26.7	1.89
4	<i>Erwinia amylovora</i>	ng/μL	22	2.05
5	<i>Erwinia amylovora</i>	ng/μL	17.2	1.79

Resultados de extracción con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue para *Ralstonia solanacearum* rz. 2 y 3 (ver Cuadro 2 y Cuadro 3).

Cuadro 2. Resultados de concentración y calidad de ADN de la cepa *Ralstonia solanacearum* rz.2.

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/μL	0	0
1	<i>Ralstonia solanacearum</i> rz.2	ng/μL	5.2	2.15
2	<i>Ralstonia solanacearum</i> rz.2	ng/μL	5.9	1.81
3	<i>Ralstonia solanacearum</i> rz.2	ng/μL	6.2	2.26
4	<i>Ralstonia solanacearum</i> rz.2	ng/μL	7.7	1.85
5	<i>Ralstonia solanacearum</i> rz.2	ng/μL	7.5	1.78

Cuadro 3. Resultados de concentración y calidad de ADN de *Ralstonia solanacearum rz.3*

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/μL	0	0
1	<i>Ralstonia solanacearum rz.3</i>	ng/μL	5.5	1.97
2	<i>Ralstonia solanacearum rz.3</i>	ng/μL	6.6	1.67
3	<i>Ralstonia solanacearum rz.3</i>	ng/μL	7.8	1.91
4	<i>Ralstonia solanacearum rz.3</i>	ng/μL	9.2	2.08
5	<i>Ralstonia solanacearum rz.3</i>	ng/μL	8.9	1.95

Resultados de extracción con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue para *Clavibacter michiganensis michiganensis* y *Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis* fueron los siguientes (ver Cuadro 4 y Cuadro 5).

Cuadro 4. Resultados de concentración y calidad de ADN para *Clavibacter michiganensis michiganensis*.

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/μL	0	0
1	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	ng/μL	13.6	1.75
2	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	ng/μL	30.3	1.88
3	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	ng/μL	14.1	1.98
4	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	ng/μL	14.4	2.23
5	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	ng/μL	27.1	2.02

Cuadro 5 Resultados de concentración y calidad de ADN de *Clavibacter michiganensis sub. Nebraskensis*.

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/μL	0	0
1	<i>Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis</i>	ng/μL	18.2	1.98
2	<i>Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis</i>	ng/μL	22.8	1.77
3	<i>Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis</i>	ng/μL	26	1.85
4	<i>Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis</i>	ng/μL	19.8	1.82
5	<i>Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis</i>	ng/μL	12.6	2.03

Resultados de extracción con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue para *Xanthomonas campestris* y *Curtobacterium flaccumfaciens* fueron los siguientes (ver Cuadro 6 y Cuadro 7).

Cuadro 6. Resultados de concentración y calidad de ADN de *Xanthomonas campestris*.

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/ $\mu$ L	0	0
1	<i>Xanthomonas campestris</i>	ng/ $\mu$ L	111.4	2.01
2	<i>Xanthomonas campestris</i>	ng/ $\mu$ L	101.7	2.02
3	<i>Xanthomonas campestris</i>	ng/ $\mu$ L	145.5	1.99
4	<i>Xanthomonas campestris</i>	ng/ $\mu$ L	140.6	1.99
5	<i>Xanthomonas campestris</i>	ng/ $\mu$ L	120.3	2.01

Cuadro 7. Resultados de concentración y calidad de ADN de *Curtobacterium flaccumfaciens*.

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/μL	0	0
1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	ng/μL	84.9	1.92
2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	ng/μL	51.7	1.98
3	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	ng/μL	48.8	1.94
4	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	ng/μL	58.6	2.02
5	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	ng/μL	40.6	1.95

Resultados de extracción con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue para *Xanthomonas gardneri*, *vesicatoria* y *euvvesicatoria* (ver Cuadro 8, Cuadro 9 y Cuadro 10).

Cuadro 8. Resultados de concentración y calidad de ADN de *Xanthomonas gardneri*.

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/μL	0	0
1	<i>Xanthomonas gardneri</i>	ng/μL	121.2	1.97
2	<i>Xanthomonas gardneri</i>	ng/μL	556.8	2.17
3	<i>Xanthomonas gardneri</i>	ng/μL	450.1	2.18
4	<i>Xanthomonas gardneri</i>	ng/μL	555.2	2.16
5	<i>Xanthomonas gardneri</i>	ng/μL	191.2	2.12

Cuadro 9. Resultados de concentración y calidad de ADN de *Xanthomonas vesicatoria*.

Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	ng/μL	0	0
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	ng/μL	53	2.09
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	ng/μL	74.2	2.16
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	ng/μL	78.6	2.19
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	ng/μL	164.1	1.81
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	ng/μL	101.9	2.13

Cuadro 10. Resultados de concentración y calidad de ADN de *Xanthomonas euvesicatoria*

No.	Nombre	Unidades	ADN	260/280
Blanco	Blanco	ng/μL	0	0
1	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	ng/μL	123	2.08
2	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	ng/μL	93.6	2.01
3	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	ng/μL	135.4	2.08
4	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	ng/μL	109	2.02
5	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	ng/μL	136.9	2.06

Una vez obtenidos los resultados se llevó a cabo un ensayo de PCR punto final utilizando los primers 16s1 y 16s2 con el propósito de verificar la amplificación de las muestras.

Visualización de la amplificación del gen 16s los cuales amplifican un producto de 300 pb con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN para *Erwinia amylovora* (ver Fig. 1).

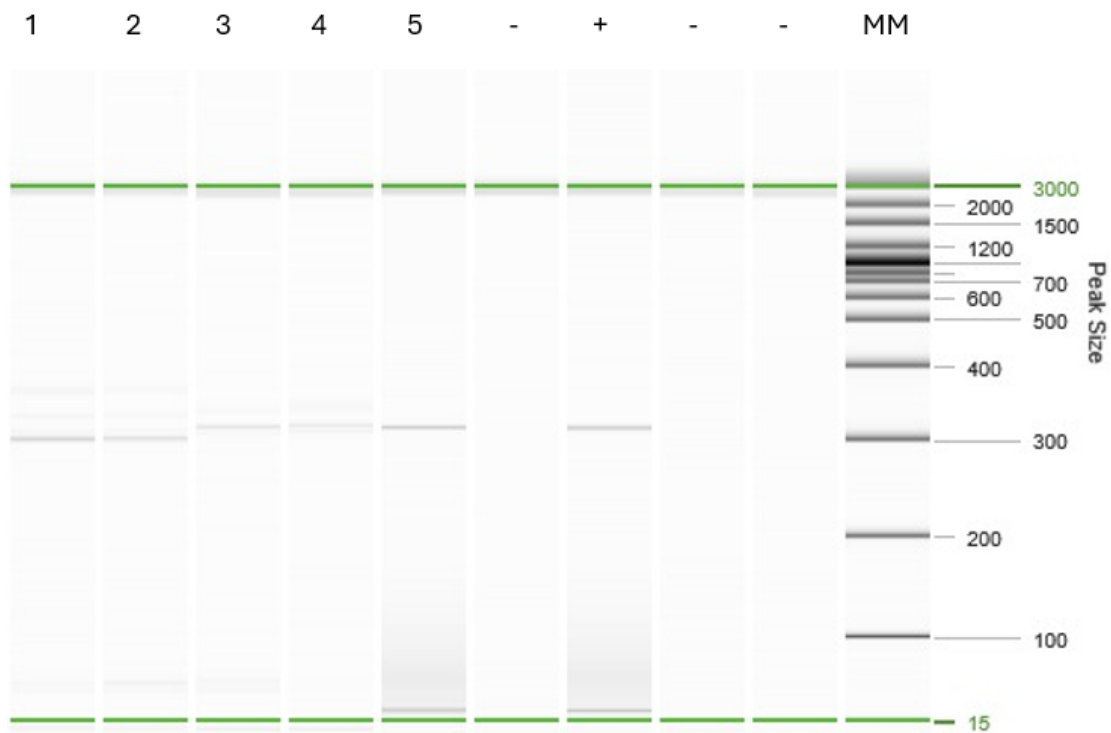


Figura1 Electroforesis capilar de PCR con los primers 16s1 y 16s2 MM: Marcador Molecular 3000pb 1-5: muestras +: control positivo 300pb -: control negativo

Visualización de la amplificación del gen 16s los cuales amplifican un producto de 300 pb con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN para *Ralstonia solanacearum* rz.2 y 3 (ver Fig. 2)

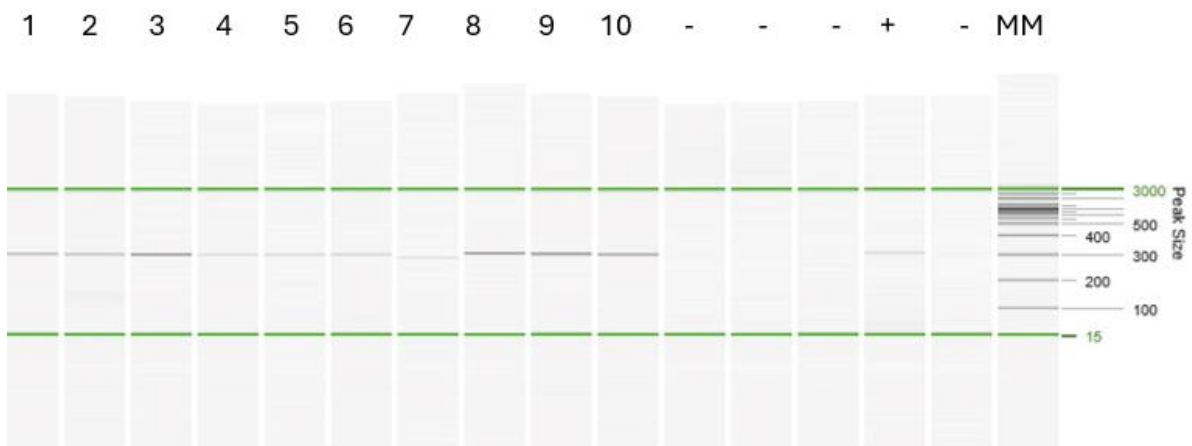


Figura 2 Electroforesis capilar de PCR con los primers 16s1 y 16s2 MM: Marcador Molecular 3000pb 1-5: muestras de *Ralstonia solanacearum* rz.2 y 6-10:muestras de *Ralstonia solanacearum* rz.3 +:control positivo 300pb -:control negativos

Visualización de la amplificación del gen 16s los cuales amplifican un producto de 300 pb con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN para *Clavibacter michiganensis michiganensis* y *Clavibacter michiganensis sub. Nebraskensis* (ver Fig. 3).

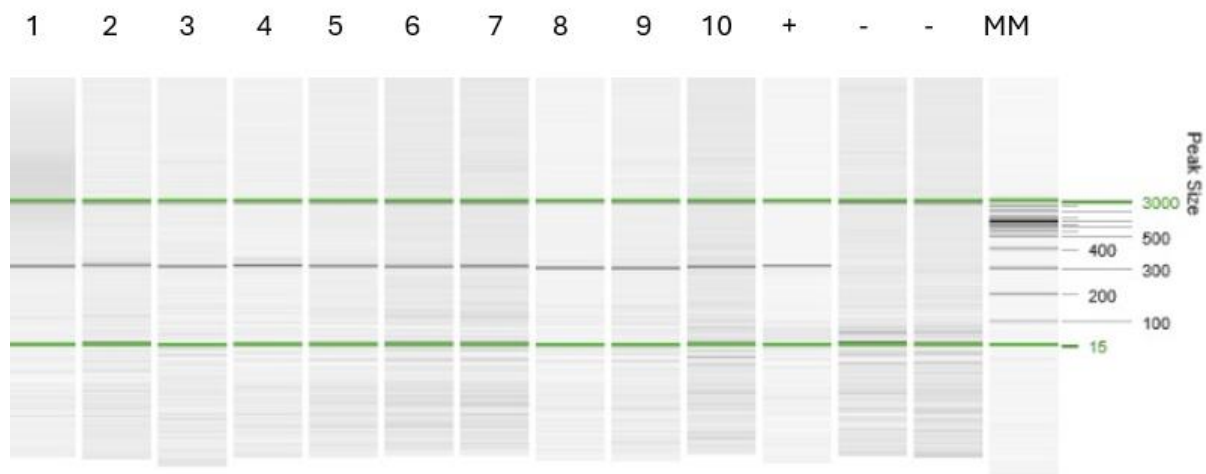


Figura 3 Electroforesis capilar de PCR con los primers 16s1 y 16s2 MM: Marcador Molecular 3000pb 1-5: muestras de *Clavibacter michiganensis michiganensis* y 6-10: muestras de *Clavibacter michiganensis sub. nebraskensis* +: control positivo 300pb -: control negativo

Visualización de la amplificación del gen 16s los cuales amplifican un producto de 300 pb con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN para *Xanthomonas campestris* y *Curtobacterium flaccumfaciens* (ver Fig.4).

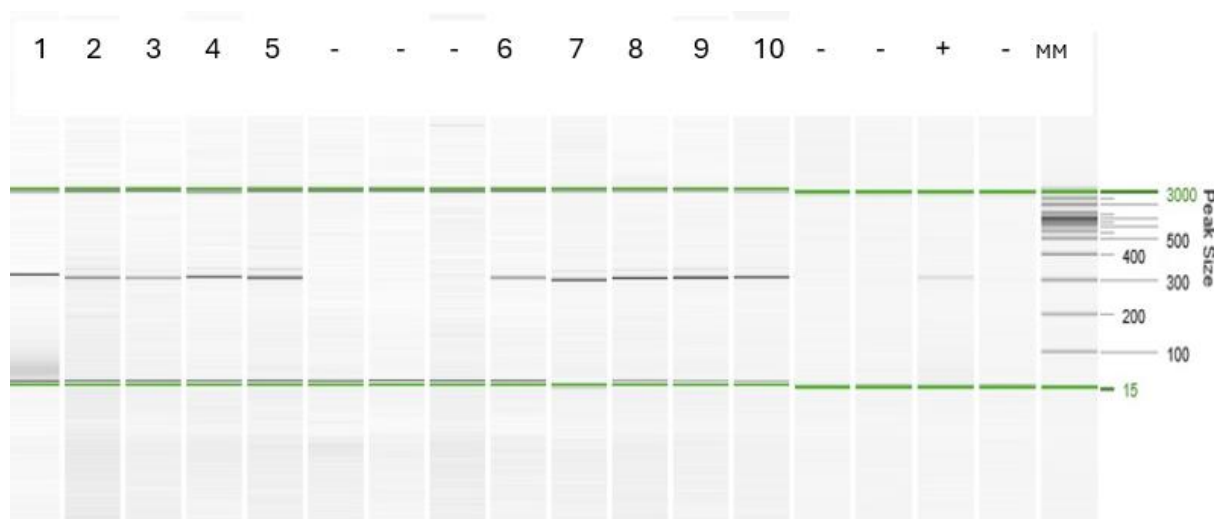


Figura 4 Electroforesis capilar de PCR con los primers 16s1 y 16s2 MM: Marcador Molecular 3000pb 1-5: muestras de *Xanthomonas campestris* y 6-10: muestras de *Curtobacterium flaccumfaciens*. +: control positivo 300pb -: control negativo.

Visualización de la amplificación del gen 16s los cuales amplifican un producto de 300 pb con ayuda del sistema de análisis QIAxcel advance de la marca QIAGEN para *Xanthomonas gardneri*, *vesicatoria* y *euvesicatoria*. (ver Fig. 5).

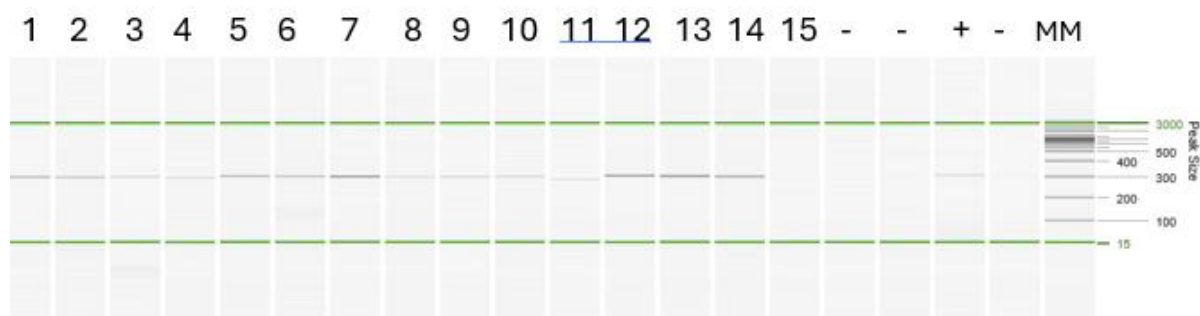


Figura 5 Electroforesis capilar de PCR con los primers 16s1 y 16s2 MM: Marcador Molecular 3000pb 1-5: muestras de *Xanthomonas gardneri*, 6-10:muestras de *Xanthomonas vesicatoria* y 11-15:muestras de *Xanthomonas euvesicatoria* +:control positivo 300pb -:control negativos.

En conclusión, las extracciones llevadas a cabo con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue fueron exitosas, logrando obtener material de alta calidad. Las concentraciones obtenidas, junto con la relación 260/280, indican que el ADN extraído cumple con los estándares necesarios para su posterior análisis, lo que garantiza la fiabilidad de los resultados obtenidos.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda ser observador al monitorear el crecimiento de las colonias y familiarizarse con la morfología colonial, ya que algunas pueden confundirse con otras que no presentan las mismas características. Además, al trabajar con material bacteriano, es esencial utilizar adecuadamente los instrumentos, esterilizarlos correctamente y realizar el trabajo en una campana de bioseguridad para evitar la contaminación de los cultivos. En cuanto a las extracciones, se sugiere seguir las indicaciones del fabricante para prevenir la contaminación cruzada y asegurar buenas concentraciones del material. Por último, es importante reactivar el material al menos una vez cada 2 meses para mantenerlo en condiciones óptimas y poder utilizarlo en investigaciones futuras.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2001). Fitopatología. Ed. Limusa. Méjico. 838 p.
- Arauz Cavallini, L. F. (1998). Fitopatología un enfoque agroecológico (2a Edición). Universidad de Costa Rica.
- Arahall, D. & Sánchez, E. & Macián, M. & Garay, E. (2008). Value of recN sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family "Leuconostocaceae". International microbiology: the official Journal of the Spanish Society for Microbiology. 11. 33-9. 10.2436/20.1501.01.42.
- Banco Nacional de ADN. (2024). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Carlos III (Universidad de Salamanca) en: [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)
- CNRF (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria). (2018), Misión y visión del laboratorio de Bacteriología. México.

- Da Silvia Romeiro, R. (2001). Métodos en bacteriología de plantas. Vicoso, Universidad Federal de Vicoso.279 p.
- Mancera, P. (2020). Cuantificación de Ácidos Nucleicos mediante diferentes técnicas. en: <https://vhir.vallhebron.com/sites/default/files/2022-06/UAT-quantificacio-fluorometrica-acids-nucleics.pdf>
- Rodicio, M. M. M., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr., Fundamento, metodología y aplicaciones en Microbiología Clínica, Enfermedades infecciosas, Microbiología Clínica, Departamento de Biología funcional, Área de Microbiología. S. L:S. N. España.
- Rodríguez Mejía, M. de L. (2006). Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma de Chapingo. p. 114. Texcoco, México.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2020). Ficha Técnica: Aislamiento de bacterias fitopatógenas y pruebas de patogenicidad [Versión 1.0]. México.
- SILVERA CIENCIA E INGENIERÍA SA DE CV (2019). en: <https://www.silveracei.com.mx/equipos/microstation/>
- UAM-X (Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco). Licenciatura en Agronomía Plan de estudios (2023) en: [https://www.uam.mx/licenciaturas/pdfs/78\\_4\\_Licenciatura\\_en\\_Agronomia\\_XOC\\_s526.pdf](https://www.uam.mx/licenciaturas/pdfs/78_4_Licenciatura_en_Agronomia_XOC_s526.pdf)