II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 9 de septiembre de 1997

por la que se establece un método provisional de pruebas para el diagnóstico, detección e identificación de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith en las patatas

(97/647/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 77/93/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1976, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad [1], cuya última modificación la constituye la Directiva 97/14/CE [2], y, en particular, el apartado 3 de su artículo 15,

Considerando que en la Decisión 95/506/CE de la Comisión, de 24 de noviembre de 1995, por la que se autoriza a los Estados miembros para adoptar temporalmente, en lo que respecta al Reino de los Países Bajos, medidas complementarias contra la propagación de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith [3], modificada por la Decisión 96/599/CE [4], y, en particular, el inciso bb) de la letra a) del apartado 2 de su artículo 1, cuando los Estados miembros lleven a cabo en las patatas pruebas oficiales o controladas oficialmente deben utilizar el procedimiento de cuarentena nº 26 establecido para *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (OEPP) [5] o cualquier otro procedimiento aprobado de acuerdo con el procedimiento establecido en el artículo 16 *bis* de la Directiva 77/93/CEE;

Considerando que el Comité *ad hoc* de expertos en enfermedades bacterianas de las plantas, creado por la Comisión de las Comunidades Europeas bajo los auspicios del Comité fitosanitario permanente, estableció los detalles de un método provisional de pruebas que tiene en cuenta la mejora de los procedimientos de detección y prueba desarrollada desde la publicación del procedimiento de cuarentena nº 26 de la OEPP; que dicho método de pruebas es provisional puesto que se prevé una mayor investigación, especialmente en cuanto a la sensibilidad y la especificidad de las pruebas individuales con objeto de seleccionar y normalizar las mejores pruebas disponibles para poder incluirlas en un método de pruebas actualizado;

Considerando que el método provisional de pruebas previsto por la presente Decisión se ajusta al dictamen del Comité fitosanitario permanente,

[1] DO L 26 de 31. 1. 1977, p. 20.
[2] DO L 87 de 2. 4. 1997, p. 17.
[3] DO L 291 de 6. 12. 1995, p. 48.
[4] DO L 265 de 18. 10. 1996, p. 18.

[5] *Boletín EPPO/OEPP* 20, 255-262 (1990).

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

A efectos de la aplicación del inciso bb) de la letra a) del apartado 2 del artículo 1 de la Decisión 95/506/CE, modificada, el procedimiento de cuarentena nº 26 establecido para *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas se sustituirá por el método provisional de pruebas para el diagnóstico, detección e identificación de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith establecido en el Anexo de la presente Decisión.

Artículo 2

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 9 de septiembre de 1997.

Por la Comisión
Franz FISCHLER
Miembro de la Comisión

ANEXO

CONJUNTO DE PRUEBAS PROVISIONALES PARA DIAGNÓSTICO, DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* (SMITH) SMITH

ÁMBITO DEL CONJUNTO DE PRUEBAS

El conjunto presentado describe los diferentes procedimientos utilizados en:

i) el diagnóstico de la podredumbre parda en plantas y tubérculos de patata;

ii) la detección de *Pseudomonas solanacearum* en muestras de tubérculos de patata;

iii) la identificación de *Pseudomonas solanacearum*.

En los apéndices se facilita información sobre el modo de preparación de los materiales de los test, como, por ejemplo, medios de cultivo, tampones, soluciones y reactivos.

CONTENIDO

Sección I **Aplicación del conjunto de pruebas** 4

1. Diagnóstico de la podredumbre parda en plantas y tubérculos de patata 4
2. Detección e identificación de *Pseudomonas solanacearum* en muestras de tubérculos de patata 6

Sección II **Diagnóstico de la podredumbre parda en plantas y tubérculos de patata** 8

1. Síntomas de la podredumbre parda 8
2. Test de selección rápida 8
3. Proceso de aislamiento 9
4. Pruebas confirmatorias 9

Sección III **Detección e identificación de *Pseudomonas solanacearum* en muestras de tubérculos de patata** 12

1. Preparación de la muestra para el análisis 12
2. Test de inmunofluorescencia (IF) 13
3. Test «Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay» (ELISA) 15
4. Prueba «Polymerase Chain Reaction» (PCR) 15
5. Siembra en medio selectivo 17
6. Prueba de bioensayo 18
7. Prueba de enriquecimiento 18
8. Test de patogenicidad 18

Apéndice 1 Medios nutritivos para el aislamiento y cultivo de *Pseudomonas solanacearum* 19

Apéndice 2 Materiales para la preparación de las muestras 20

Apéndice 3 Materiales para el test IF 21

Apéndice 4 Determinación del nivel de contaminación en el test IF 22

Apéndice 5 Materiales para el test ELISA 23

Apéndice 6 Materiales para el test PCR 24

Apéndice 7 Materiales para la siembra en medio selectivo y test de enriquecimiento 24

Referencias 25

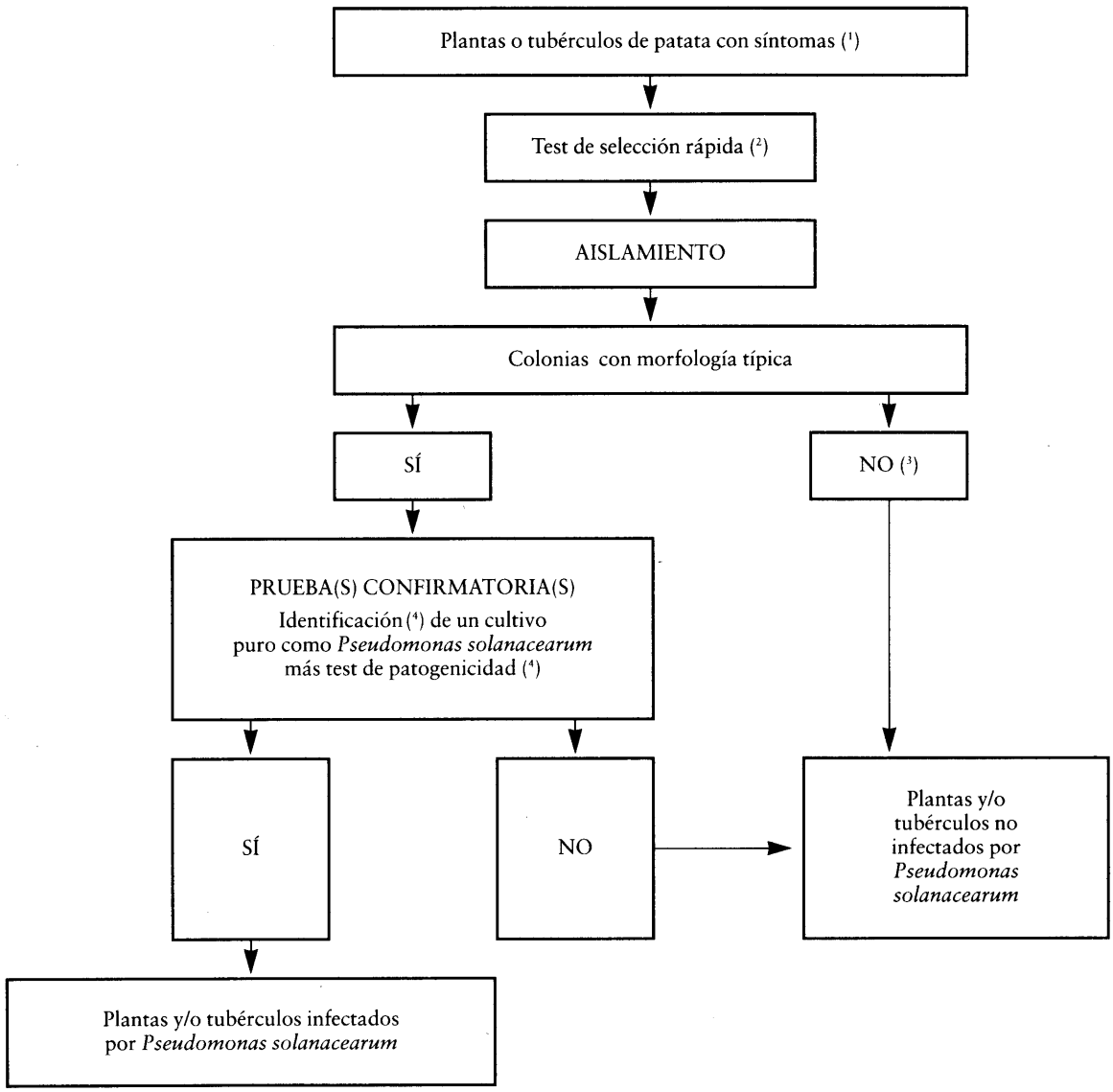
SECCIÓN I

APLICACIÓN DEL CONJUNTO DE PRUEBAS

1. **Diagnóstico de la podredumbre parda en plantas y tubérculos de patata**

El procedimiento de análisis, que se destina a plantas y tubérculos que presenten síntomas típicos de la podredumbre parda o de los que se sospeche que padecen esta enfermedad, incluye un test de selección rápida, el aislamiento del patógeno del tejido vascular infectado en un medio de diagnóstico y, en caso de obtenerse resultados positivos, la identificación del cultivo como *Pseudomonas solanacearum*.

Organigrama



Notas

(1) La descripción de los síntomas se ofrece en el punto 1 de la sección II.

(2) Los tests de selección rápida facilitan un diagnóstico presumible.

Son tests adecuados:
— prueba de exudación del tejido vascular del tallo (punto 2 de la sección II),
— prueba de detección de gránulos de poli-ß-hidroxibutirato (punto 2 de la sección II),
— test IF (punto 2 de la sección III),
— test ELISA (punto 3 de la sección III),
— test PCR (punto 4 de la sección III).

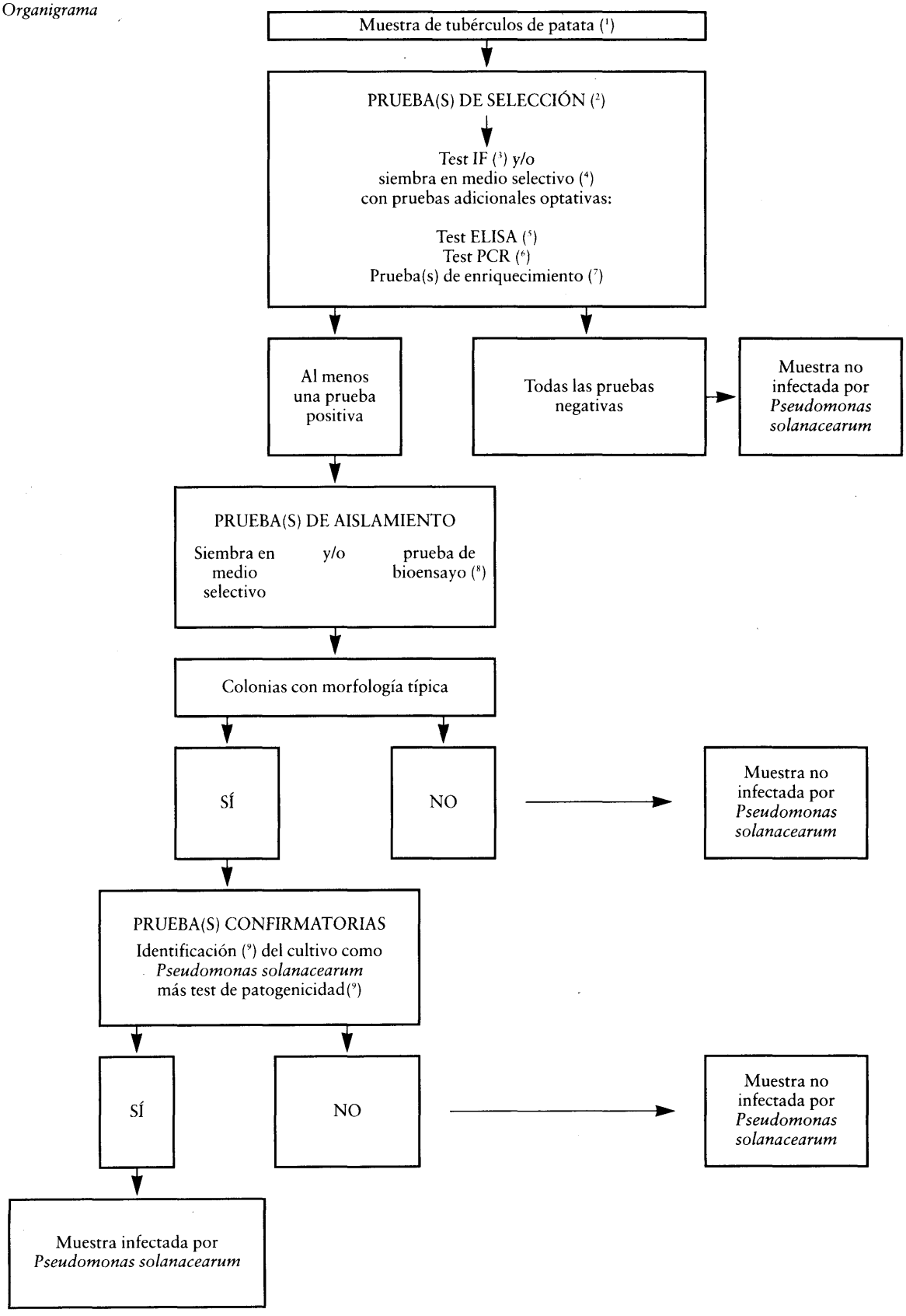
(3) Aunque el aislamiento del patógeno de material vegetal con síntomas típicos es sencillo mediante siembra de diluciones, el cultivo puede fallar en estados avanzados de infección. Las bacterias saprofitas que crecen en el tejido enfermo pueden enmascarar o inhibir el patógeno en el medio de aislamiento. Si el aislamiento es negativo pero los síntomas de la enfermedad son los típicos, deberá repetirse el aislamiento, preferentemente valiéndose de una siembra en medio selectivo.

(4) La identificación fiable de un cultivo puro de *Pseudomonas solanacearum* se consigue utilizando al menos una de las pruebas que se enumeran en el punto 4.1 de la sección II, en combinación con una prueba de patogenicidad (punto 4.3 de la sección II). La caracterización de la cepa es facultativa, aunque se recomienda cada vez que se presente un caso nuevo.

2. **Detección e identificación de *Pseudomonas solanacearum* en muestras de tubérculos de patata**

El procedimiento se destina para la detección de infecciones latentes en tubérculos de patata mediante una o, preferiblemente, varias pruebas de selección que, de ser positivas, se complementan con el aislamiento del patógeno; en caso de aislamiento de colonias típicas, se procede a continuación a la identificación de un cultivo puro como *Pseudomonas solanacearum*.

Organigrama



Notas

(1) Tamaño de la muestra

El tamaño normal de la muestra es de 200 tubérculos. Sin embargo el procedimiento puede adaptarse convenientemente para muestras con menos de 200 tubérculos.

(2) Pruebas de selección

Es posible que una única prueba no sea lo suficientemente sensible o fiable para detectar *Pseudomonas solanacearum* en una muestra. Por ello se recomienda realizar más de un test y que se basen en principios biológicos diferentes.

(3) Test de inmunofluorescencia (IF)

El test IF es una prueba de selección plenamente reconocida, lo que supone una ventaja frente a otras pruebas que aún no han sido puestas a punto o convalidadas completamente. El test se usa para otras muchas bacterias, por ejemplo, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Los parámetros de lectura que se especifican en este método hacen que resulte una prueba sensible (con límites de detección de 10^3-10^4 células por ml de precipitado de extracto de patata).

El factor crítico en que se basa la fiabilidad de los resultados es la calidad del antisuero. Sólo es aceptable un antisuero con un título elevado (2000, como mínimo, para el antisuero crudo) y todas las pruebas deben realizarse con el título del antisuero o con una dilución por debajo de éste. Se prefiere el método indirecto. El método directo puede aplicarse si el test tiene un grado de sensibilidad y especificidad equivalente al del método indirecto.

El test IF presenta la ventaja de la interpretación subjetiva de la morfología de la tinción celular y de la intensidad de la fluorescencia, que facilitan información sobre la especificidad de la reacción. Son frecuentes las reacciones cruzadas producidas por bacterias serológicamente afines procedentes del suelo o asociadas a tejidos de la patata con morfología celular de *Pseudomonas solanacearum*. Aunque el test IF puede utilizarse como única prueba de selección, cuando se sospeche que se han producido reacciones cruzadas convendrá efectuar una prueba de selección alternativa basada en principios biológicos diferentes. En tales casos la siembra en medio selectivo es el test más adecuado.

(4) Siembra en medio selectivo

El medio SMSA modificado y el procedimiento que se especifican en este método hacen que ésta sea una prueba sensible y selectiva para la detección de *Pseudomonas solanacearum*, cuyos resultados pueden conocerse de tres a seis días después de la preparación de la muestra. El agente patógeno se obtiene directamente en cultivo y puede identificarse fácilmente. Para poder aprovechar plenamente el potencial de la prueba, es necesario preparar con cuidado las cuñas para evitar las bacterias secundarias asociadas al tubérculo de la patata que compiten con *Pseudomonas solanacearum* en el medio y pueden afectar el desarrollo del agente patógeno. Algunas cepas pueden crecer insuficientemente, ya que los componentes del medio pueden afectar al organismo buscado. Asimismo, debe tenerse cuidado para diferenciar *Pseudomonas solanacearum* de otras bacterias que pueden desarrollarse en el medio. Aunque la siembra en medio selectivo puede utilizarse como única prueba de selección, cuando se obtengan resultados negativos y se sospeche que se ha producido una inhibición de *Pseudomonas solanacearum* debido a la presencia de otras bacterias en el medio, será conveniente realizar una segunda prueba de selección. En tal caso, la IF será la más apropiada.

(5) Test ELISA

En general, el test ELISA es menos sensible que el IF (límites de detección: 10^4-10^5 células por ml de precipitado de extracto de patata). Se trata de una prueba barata y rápida, que, no obstante, en lo que a resultados se refiere, está en general más expuesta a dar resultados positivos falsos (reacciones cruzadas) y negativos falsos (inhibición causada por moléculas fenólicas presentes en el extracto de patata). El antisuero debe poseer una especificidad muy elevada. El test ELISA no puede utilizarse como única prueba de selección.

(6) Test PCR

Esta prueba posee el potencial necesario para ser utilizada en detecciones muy sensibles. La prueba puede ser inhibida fácilmente por componentes del extracto de planta o tubérculo, con el consiguiente resultado negativo falso. Algunos cultivares de patata contienen más inhibidores que otros, que es necesario eliminar. La inhibición puede reducirse mediante dilución, si bien con ello se diluyen también las poblaciones de *Pseudomonas solanacearum*. Debe tenerse mucho cuidado en todas las fases de preparación de las muestras y del test para evitar contaminaciones que darían lugar a resultados positivos falsos. Falsos positivos pueden ocurrir también debido a secuencias homólogas de otros organismos. De ahí que la prueba PCR directa no pueda utilizarse como única prueba de selección.

(7) Prueba de enriquecimiento

La incubación de muestras de extracto de patata en un caldo semiselectivo, como el caldo SMSA modificado, permite la multiplicación de *Pseudomonas solanacearum* y, lo que es más importante quizás, también diluye los inhibidores potenciales de las pruebas ELISA o PCR. De este modo, *Pseudomonas solanacearum* puede detectarse mediante las pruebas IF, ELISA y PCR en un caldo de enriquecimiento. No recomendamos la realización de cultivos directos a partir de caldos enriquecidos, ya que estos métodos de enriquecimiento no se han ensayado y probado a fondo. Si se incluyen en este apartado es porque poseen un potencial considerable. No obstante, debido a la relativa falta de experiencia que se tiene de ellos, no pueden utilizarse como métodos de detección únicos.

(8) Prueba de bioensayo

La prueba de bioensayo se usa para el aislamiento de *Pseudomonas solanacearum* a partir de extracto de patatas mediante enriquecimiento selectivo de la bacteria en una planta huésped, y puede realizarse en plantas de tomate o en berenjenas. Exige que las condiciones de incubación sean óptimas, como las que se especifican en este método. Es muy probable que las bacterias inhibidoras de *Pseudomonas solanacearum* en medio SMSA no interfieran en esta prueba.

(9) Pruebas confirmatorias

La identificación fiable de un cultivo puro de *Pseudomonas solanacearum* se efectúa mediante alguna de las pruebas que se enumeran en el punto 4.1 de la sección II, en combinación con una prueba de patogenicidad (punto 4.3 de la sección II). Aunque la caracterización de la cepa es optativa, se recomienda en cada caso nuevo.

SECCIÓN II

DIAGNÓSTICO DE LA PODREDUMBRE PARDA EN PLANTAS Y TUBÉRCULOS DE PATATA

1. Síntomas de la podredumbre parda

En la planta

La fase inicial de la infección se caracteriza por un marchitamiento de las hojas en progresión ascendente hacia el extremo superior de la planta, bajo el efecto de las temperaturas diurnas altas, con una recuperación durante la noche. El marchitamiento se hace rápidamente irreversible y ocasiona la muerte de la planta. El tejido vascular de los tallos de plantas marchitadas cortados transversalmente puede volverse pardo, y de la superficie del corte brota un exudado mucoso blanquecino o éste puede extraerse apretando el tallo. Si se coloca verticalmente en agua un tallo cortado, de los haces vasculares salen hilos viscosos.

En el tubérculo

Los tubérculos de patata deben cortarse transversalmente cerca de la parte basal (estolón). En la fase inicial de la infección se produce una decoloración entre amarillo vítreo y pardo claro del anillo vascular, del cual fluye espontáneamente un exudado mucoso crema pálido al cabo de varios minutos o cuando se hace una ligera presión con los pulgares en la piel próxima a la superficie del corte. Posteriormente, la decoloración vascular adquiere un tono pardo más marcado y la necrosis puede extenderse al tejido parenquimático. En las fases avanzadas, la infección progresa desde la parte basal y los ojos, pudiendo dar lugar a que se produzcan en la piel lesiones ligeramente hundidas de color pardo rojizo por las que fluyen bacterias, lo que hace que se adhieran partículas de suelo.

2. Tests de selección rápida

Los tests de selección rápida facilitan un diagnóstico presumible. Realícese uno o más de los siguientes tests:

Prueba de la exudación del tallo

La presencia de *Pseudomonas solanacearum* en tallos de patata marchitos puede evaluarse utilizando la sencilla prueba de presunción que se indica a continuación.

Cortar el tallo justo por encima del nivel del suelo. Colocar la superficie del corte en un vaso de precipitados que contenga agua. Poco después, de los haces vasculares saldrán espontáneamente hilos de flujo bacteriano. Este fenómeno no se producirá con ninguna otra bacteria que cause infecciones vasculares en las plantas de patata.

Detección de gránulos de poli-ß-hidroxibutirato (PHB)

Los gránulos de PHB de las células de *Pseudomonas solanacearum* se visualizan tiñendo con azul Nilo A o negro Sudán B.

Preparar un frotis del exudado o del tejido sospechoso en un portaobjetos, o un frotis de un cultivo de 48 horas en YPGA o SPA (apéndice 1). Preparar frotis de control positivo de una cepa de biovar 2 y raza 3 y, si se considera útil, un frotis de un control negativo. Dejar secar. Pasar con rapidez varias veces por la llama la cara inferior del portaobjetos hasta que el frotis quede fijado.

Prueba del azul Nilo

1. Bañar el frotis fijado con solución acuosa al 1 % de azul Nilo A. Incubar durante 10 minutos a 55 °C.
2. Escurrir la solución de tinción. Lavar suavemente al grifo durante unos instantes. Eliminar el agua sobrante con un pañuelo de papel.
3. Bañar el frotis con ácido acético acuoso al 8 %. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Lavar suavemente al grifo durante unos instantes. Secar con un pañuelo de papel.
5. Humedecer de nuevo con una gota de agua. Tapar con un cubreobjetos.
6. Examinar el frotis tintado con un microscopio epifluorescente a 450 nm con gota de aceite de inmersión, a 1 000 aumentos.

   Observar si se produce la fluorescencia naranja brillante de los gránulos de PHB. Observar también con la luz normal para cerciorarse de que los gránulos son intracelulares y de que la morfología celular es la típica de *Pseudomonas solanacearum.*

Prueba del negro Sudán

1. Bañar el frotis fijado con una solución de negro Sudán B al 0,3 % en etanol del 70 %. Dejar en incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Escurrir la solución de tinción. Lavar suavemente con agua del grifo durante unos instantes. Eliminar el agua sobrante con un pañuelo de papel.
3. Sumergir brevemente el frotis en xilol. Secar con un pañuelo de papel.

   ¡Cuidado! El xilol es un producto nocivo. Trabajar en campana de humos.
4. Bañar el frotis con safranina acuosa al 0,5 % (p/v) y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

   ¡Cuidado! La safranina es un producto nocivo. Trabajar en campana de humos.
5. Lavar suavemente al grifo durante unos instantes. Secar con un pañuelo de papel. Tapar con un cubreobjetos.
6. Examinar la tinción con un microscopio óptico con luz transmitida con aceite de inmersión, a 1 000 aumentos.

   Los gránulos de PHB de las células de *Pseudomonas solanacearum* se tiñen de negro azulado, mientras que las paredes de las células lo hacen de rosa.

Otras pruebas

Otras pruebas adecuadas para una selección rápida son el test IF (punto 2 de la sección III), el test ELISA (punto 3 de la sección III) y el test PCR (punto 4 de la sección III).

3. **Proceso de aislamiento**

3.1. Coger exudado o secciones de tejido decolorado del anillo vascular del tubérculo o de los haces vasculares del tallo. Poner en suspensión en un volumen reducido de agua destilada estéril o en tampón fosfato 50 mM. Dejar reposar de 5 a 10 minutos.

3.2. Preparar series de diluciones decimales de la suspensión 1/10 y 1/100, o más si se considera necesario.

3.3. Añadir un volumen normalizado de la suspensión y de las diluciones a un medio nutritivo general (NA, YPGA y SPA, apéndice 1) y/o a un medio de tetrazolio de Kelman (apéndice 1) y/o a un medio selectivo SMSA (apéndice 7). Extender o hacer estrías con una técnica adecuada de dilución en placas. Si se considera útil, preparar un conjunto de placas distintas con un cultivo de una suspensión celular diluida de una cepa virulenta de *Pseudomonas solanacearum* de biovar 2 y raza 3 que se utilizará como control positivo.

3.4. Dejar en incubación las placas tres días a 28 °C. La incubación puede prolongarse hasta seis días si el crecimiento es lento, pero las colonias en SMSA con frecuencia se vuelven atípicas y mueren.

En un medio nutritivo general, los aislados virulentos de *Pseudomonas solanacearum* desarrollan colonias de color blanco nacarado, planas, irregulares y fluidas, que con frecuencia presentan los verticilos característicos.

En el medio de tetrazolio de Kelman, las colonias típicas de aislados virulentos de *Pseudomonas solanacearum* son crema, planas, irregulares, con anillos de color rojo sangre en el centro. Las colonias avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* son butirosas y de color rojo fuerte.

En el medio SMSA, las colonias típicas de los aislados virulentos de *Pseudomonas solanacearum* son de color blanco lechoso, planas, irregulares y fluidas, que presentan centros de un marcado color rojo sangre.

Las formas avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* desarrollan colonias menos fluidas, cuyo color oscila entre completamente rosa a rojo en el medio SMSA.

3.5. Purificar las colonias de morfología característica mediante subcultivo en un medio nutritivo general. Evitar los subcultivos continuos que pueden dar lugar a una pérdida de virulencia.

4. **Pruebas confirmatorias**

4.1. *Identificación de* Pseudomonas solanacearum

Identificar los cultivos puros de *Pseudomonas solanacearum* mediante uno, como mínimo, de los siguientes procedimientos.

Pruebas nutricionales y enzimáticas

Nota: Incluir los controles adecuados en cada test.

Las siguientes propiedades fenotípicas de *Pseudomonas solanacearum* están universalmente presentes o ausentes:

Pigmento fluorescente	-
Inclusiones de PHB	+
Prueba O/F	O+/F-
Catalasa	+
Oxidasa de Kovacs	+
Reducción de nitratos	+
Utilización de citrato	+
Crecimiento a 40 °C	-
Crecimiento en NaCl al 1 %	+
Crecimiento en NaCl al 2 %	-
Dihidrolasa de arginina	-
Licuación de gelatina	-
Hidrólisis del almidón	-
Hidrólisis de la esculina	-
Producción de levano	-

Los medios y métodos se encuentran en Lelliott y Stead (1987).

Test IF

Preparar una suspensión de 10^6 células por ml del cultivo y de las cepas de control positivo. Preparar una serie de diluciones a 1/2 del antisuero. Aplicar el procedimiento de IF (punto 2 de la sección III). El título IF del cultivo debe ser equivalente al del control positivo.

Test ELISA

Preparar una suspensión de más de 10^6 células por ml del cultivo y de las cepas de control positivo. Aplicar el procedimiento ELISA (punto 3 de la sección III). El valor ELISA del cultivo debe ser equivalente al del control positivo.

Test PCR

Preparar una suspensión de 10^6 células por ml del cultivo y de las cepas de control positivo. Aplicar el procedimiento PCR (punto 4 de la sección III). El producto de la PCR del cultivo debe tener el mismo tamaño y bandas del análisis de la enzima de restricción (REA) que el control positivo.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Preparar una suspensión de 10^6 células por ml del cultivo y de la(s) cepa(s) de control positivo. Aplicar el procedimiento FISH (van Beuningen *et al.*, 1995) con el iniciador OLI-1 PCR (Seal *et al.*, 1993). El cultivo debe mostrar la misma reacción que el control positivo.

Perfiles de proteínas

Las proteínas de células enteras desnaturalizadas se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (Stead, 1992a).

Perfiles de ácidos grasos (FAP)

Mantener el cultivo y la cepa de control positivo en agar de tripticasa de soja durante 48 horas a 28 °C y aplicar el procedimiento FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). El perfil del cultivo debe ser idéntico al del control positivo. En las condiciones especificadas, los ácidos grasos característicos son 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH y 18:1 2OH.

4.2. *Caracterización de las cepas*

La caracterización de las cepas es optativa, pero se recomienda en cada caso nuevo, utilizando al menos unos de los siguientes tests:

Determinación de los biovares

Pseudomonas solanacearum se separa en biovares en función de la capacidad de producir ácido de tres hexosas alcohólicas y tres azúcares (Hayward, 1964 y 1994).

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilización de:					
— maltosa	–	+	+	–	+
— lactosa	–	+	+	–	+
— celobiosa	–	+	+	–	+
— mannitol	–	–	+	+	+
— sorbitol	–	–	+	+	–
— dulcitol	–	–	+	+	–

El biovar 2 se diferencia en subfenotipos mediante pruebas adicionales (Hayward, 1994).

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Utilización de trehalose	–	+	+
Utilización de inositol	+	–	+
Utilización de D-ribosa	–	–	+
Actividad pectolítica	baja	baja	alta

Determinación de las razas

La raza (Buddenhagen *et al.*, 1962) puede determinarse con una prueba de patogenidad en plantas de tomate o en berenjenas y en plantas de tabaco, y mediante una reacción de hipersensibilidad (HR) en hojas de tabaco (Lozano y Sequeira, 1970):

	Raza(*)		
	1	2	3
Reacción en:			
— plantas de tomate/berenjenas	Marchitamiento	Sin reacción	Marchitamiento
— plantas de tabaco	Marchitamiento	Sin reacción	Sin reacción
— hojas de tabaco	Necrosis (48 h) y marchitamiento (7-8 días)	HR (12-24 h)	Clorosis (2-8 días)

(*) La raza 4 (patógena en el jengibre y en algún otro hospedante) y la raza 5 (patógena sólo en el «mulberry») no están incluidas.

La caracterización de la raza a través de tests de patogenicida o hipersensibilidad en hojas de tabaco puede no ser muy fiable, pero podrá ser deducida a partir del biovar y del hospedante natural de origen.

El cultivo puede caracterizarse aún más mediante lo siguiente:

Obtención de la huella dactilar genómica

La diferenciación molecular de las cepas en el complejo de Pseudomonas solanacearum puede realizarse del modo siguiente:

Análisis RFLP (Cook *et al.*, 1989).

PCR de secuencia repetitiva [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995)].

4.3. *Test de patogenicidad*

Esta prueba se destina a confirmar el diagnóstico de *Pseudomonas solanacearum* y comprobar la virulencia de los cultivos identificados como *Pseudomonas solanacearum.*

Preparar un inóculo de 10^6 células por ml del cultivo y una cepa de control positivo. Inocular de 5 a 10 plantas de tomate o berenjenas, preferentemente en la fase de la tercera hoja verdadera o posterior (punto 6 de la sección III). Dejar en incubación hasta dos semanas entre 22 y 28 °C con alta humedad relativa y riego diario. Observar si se produce marchitamiento y/o epinastia, clorosis o enanismo.

Aislar de plantas sintomáticas de la forma siguiente:

— separar secciones del tallo 2 cm por encina del punto de inoculación,

— dilacerar y suspender en un pequeño volumen de agua estéril o en tampón fosfato 50 mM. Sembrar, dejar en incubación y buscar colonias típicas de *Pseudomonas solanacearum.*

SECCIÓN III

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* EN MUESTRAS DE TUBÉRCULOS DE PATATA

Nota: El tamaño normal de la muestra es de 200 tubérculos. Sin embargo, el procedimiento puede adaptarse convenientemente para muestras con menos de 200 tubérculos.

1. **Preparación de la muestra para el análisis**

Observación: El extracto de patata obtenido con este procedimiento puede emplearse también para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Opciones previas al análisis, en caso de considerarlas útiles:

i) incubar la muestra a 25-30 °C durante un período de hasta dos semanas para favorecer la multiplicación de las poblaciones latentes de *Pseudomonas solanacearum*;

ii) lavar los tubérculos con agua corriente utilizando desinfectantes y detergentes apropiados. Secar al aire los tubérculos.

1.1. Quitar la epidermis de la parte basal (ombligo) del tubérculo con un bisturí o un cuchillo limpio y desinfectado, de modo que los tejidos vasculares queden a la vista. Extraer con cuidado una cuña cónica pequeña (de 3 a 5 mm de diámetro) de tejido vascular de la parte basal de cada tubérculo. Extraer el mínimo volumen posible de tejido no vascular. Procesar cada uno de los tubérculos de la muestra.

Observación: El examen visual de los tubérculos (punto 1 de la sección II) puede efecturarse en esta fase. Retirar los tubérculos que presenten síntomas o estén muy podridos y analizarlos individualmente (sección II).

1.2. Colocar las cuñas en un recipiente cerrado. Es conveniente procesarlas inmediatamente. De no ser posible, pueden almacenarse durante un período de 24 horas como máximo o, si se mantienen a 4 °C, que no supere las 72 horas.

1.3. Procesar las cuñas por uno de los métodos siguientes:

i) Colocar las cuñas en un recipiente adecuado.

Añadir solución tampón de maceración (apéndice 2) en cantidad suficiente para que las cubra.

Desmenuzarlas en una trituradora Waring Blender o Ultra Thurrax hasta lograr una homogeneización completa pero no excesiva.

Dejar el macerado en remojo de 15 a 30 minutos.

ii) Colocar las cuñas en un recipiente adecuado.

Añadir solución tampón de maceración en cantidad suficiente para que las cubra.

Colocar el recipiente en un agitador rotatorio.

Incubar a 50-100 rpm durante 4 horas a 20-22 °C o durante 16-24 horas a 4 °C.

iii) Colocar las cuñas dentro de una bolsa de maceración desechable que sea resistente (por ejemplo, una bolsa Stomacher, de 105 x 150 mm, estéril por radiación).

Machacar con cuidado las cuñas valiéndose de un instrumento adecuado, como, por ejemplo, un martillo, hasta lograr una homogeneización completa.

Añadir solución tampón de maceración en cantidad suficiente para que cubra las cuñas.

Dejar asentar el macerado durante 15-30 minutos.

1.4. Extraer las bacterias de las cuñas procesadas mediante uno de los procedimientos siguientes:

i) Decantar suavemente el macerado en un tubo de centrifuga y dejar los residuos en el recipiente o la bolsa. Si el decantado presenta un aspecto turbio, centrifugar a 180 g, como máximo, durante 10 minutos, a una temperatura inferior a 10 °C.

Centrifugar el decantado o el sobrenadante obtenido en la primera centrifugación, a 7 000 g durante 15 minutos o a 10 000 g durante 10 minutos a una temperatura inferior a 10 °C.

Eliminar el sobrenadante sin perturbar el sedimento.

ii) Filtrar el macerado mediante un sistema de filtración cuyos poros tengan un tamaño de 40-100 μm.

Acelerar la filtración utilizando una bomba de vacío.

Recoger el filtrado en un tubo de centrifuga. Lavar el filtro con un tampón de maceración.

Centrifugar el filtrado a 7 000 g durante 15 minutos o a 10 000 g durante 10 minutos a una temperatura inferior a 10 °C.

Descartar el sobrenadante sin perturbar el sedimento.

1.5. Resuspender el precipitado en 1 ml de tampón de precipitado (apéndice 2).

Dividir en dos partes iguales y poner cada parte en un microvial.

Utilizar un solo microvial para la prueba. Conservar el extracto sobrante a 4 °C durante el análisis.

Añadir glicerol estéril al 10-25 % (v/v) al otro microvial. Homogeneizar por agitación. Guardar a - 18 °C (semanas) o a - 70 °C (meses).

2. **Test de inmunofluorescencia (IF)**

Utilizar antisuero para *Pseudomonas solanacearum*, de preferencia para raza 3/biovar 2. Determinar el título en una suspensión de 10^6 células por ml de la cepa homóloga de *Pseudomonas solanacearum* con una dilución apropiada del conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC), según las recomendaciones del fabricante. El antisuero crudo debería presentar un título IF de al menos 1:2 000.

Utilizar portaobjetos de pocillos múltiples, de preferencia con 10 pocillos de 6 mm de diámetro como mínimo.

Incluir en cada portaobjetos un control de conjugado FITC. Deberá repetirse la prueba con el control PBS incluido, si se observa alguna célula positiva en el control FITC.

Preparar en otro portaobjetos controles positivos con una suspensión de 10^6 células por ml de una cepa de raza/biovar adecuados de *Pseudomonas solanacearum*. Incluir un portaobjetos en cada serie de pruebas.

2.1. Preparar los portaobjetos según uno de los procedimientos siguientes:

i) Para precipitados con una cantidad relativamente pequeña de almidón:

Echar con una pipeta un volumen determinado (15 µl es suficiente para pocillos de 6 mm de diámetro; aumentar el volumen si el diámetro es mayor) del precipitado resuspendido en una fila de pocillos. La otra fila puede utilizarse como duplicado o para una segunda muestra, tal como se indica en la figura 1.

ii) Para otros precipitados:

Preparar diluciones decimales, por ejemplo, 1/10, 1/100 y 1/1 000, del precipitado resuspendido en tampón de precipitado. Echar con una pipeta un volumen normalizado medido (15 µl es suficiente para pocillos de 6 mm de diámetro; aumentar el volumen si el diámetro es mayor) del precipitado resuspendido y de cada dilución en una fila de pocillos. La otra fila puede utilizarse como duplicado o para una segunda muestra, tal como se indica en la figura 2.

2.2. Dejar secar las gotitas. Fijar las células bacterianas al portaobjetos calentándolo, flameándolo o mediante etanol del 95 %.

2.3. Procedimiento IF

i) Si el portaobjetos se ha preparado según el inciso i) de punto 2.1:

Preparar un conjunto de diluciones a 1/2 del antisuero en el tampón IF (apéndice 3): 1/4 del título (T/4), 1/2 del título (T/2), el título (T) y dos veces el título (2T).

ii) Si el portaobjetos se ha preparado según el inciso ii) del punto 2.1:

Preparar la dilución de trabajo (DT) del antisuero en el tampón IF. La dilución de trabajo es la dilución del antisuero con especificidad óptima, y normalmente es a la mitad del título.

Figura 1

Preparación del portaobjetos problema según 2.1.i) y 2.3.i)

Dilución normalizada del precipitado resuspendido

(T = título)

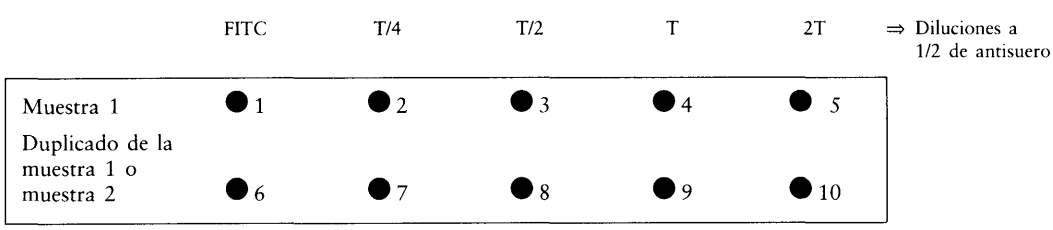
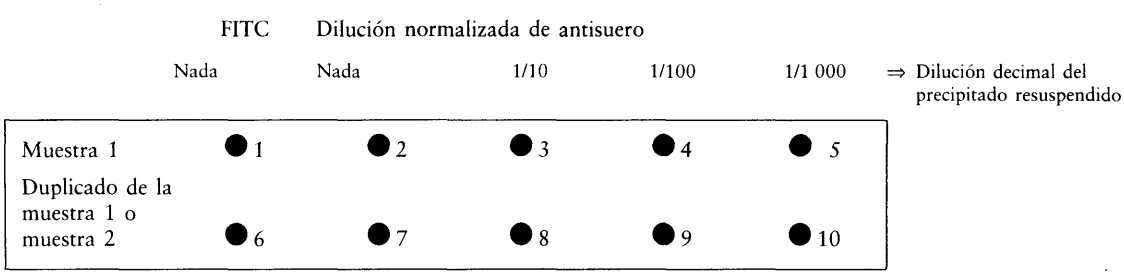


Figura 2

Preparación del portaobjetos según 2.1.ii) y 2.3.ii)



2.3.1. Colocar los portaobjetos en un pañuelo de papel humedecido.

Añadir a los pocillos correspondientes la dilución o diluciones de antisuero. Aplicar PBS en los pocillos FITC. El volumen del antisuero aplicado en los pocillos debe ser equivalente al volumen de extracto aplicado.

2.3.2. Tapar y dejar incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2.3.3. Sacudir las gotitas de antisuero del portaobjectos y enjuagar cuidadosamente los portaobjetos con tampón IF. Lavar durante 5 minutos con tampón IF-Tween. Repetir la operación con tampón IF (apéndice 3). Eliminar cuidadosamente el exceso de humedad.

2.3.4. Colocar los portaobjetos en un pañuelo de papel humedecido.

Cubrir los pocillos problema y el pocillo FITC con la dilución del conjugado FITC utilizado para determinar el título. El volumen de conjugado aplicado en los pocillos debe ser idéntico al volumen de antisuero aplicado.

2.3.5. Tapar y dejar en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2.3.6. Sacudir las gotitas de conjugado del portaobjetos. Enjuagar y lavar como antes (2.3.3). Eliminar cuidadosamente el exceso de humedad.

2.3.7. Echar con una pipeta de 5 a 10 μl de 0,1 M de tampón fosfato glicerol (apéndice 3) o montante similar en cada pocillo y colocar un cubreobjetos.

2.4. Lectura del test IF

Examinar los portaobjetos en un microscopio epifluorescente con filtros adecuados para que se produzca la excitación del FITC, con aceite de inmersión y a 500-1 000 aumentos. Recorrer los pocillos a lo largo de dos diámetros perpendiculares entre sí y alrededor del perímetro.

En primer lugar, comprobar el control postivo. Las células deben ser fluorescentes brillantes y completamente teñidas. *Nota: el test debe repetirse si la tinción es aberrante.*

Leer los portaobjetos. Observar primero la ausencia de células fluorescentes en los pocillos FITC. Si existieran indicaría una unión no específica del conjugado, autofluorescencia o contaminación. *En este caso, repetir el test.*

Comprobar si hay células fluorescentes brillantes con morfología característica de *Pseudomonas solanacearum* en los pocillos problema. La intensidad de la fluorescencia debe ser equivalente a la de la cepa de control positivo a la misma dilución del antisuero. Deberán descartarse las células que presenten una tinción incompleta o cuya fluorescencia sea escasa, a menos que haya muchas células de este tipo (véase la interpretación de las resultadas del test IF).

Interpretación de los resultados del test IF

i) La prueba será negativa si en la muestra no se encuentran células fluorescentes brillantes con morfología característica.

ii) Si se encuentran células fluorescentes brillantes con morfología característica, determinar el número medio de células por campo microscópico y calcular el número de células (N) por ml de precipitado resuspendido (apéndice 4).

Se considera que el límite de detección para el test IF está alrededor de 10^3 células por ml de precipitado resuspendido

— en las muestras con $N > 10^3$ celulas por ml, el test IF se considera positivo;

— en las muestras con $N > 10^3$ células por ml, el test IF puede considerarse positivo;

iii) Si hay un gran número de células (< 10^5 células por ml) incompletamente teñidas o con fluorescencia débil en el título, deberá realizarse un segundo test:

— bien un test basado en un principio biológico distinto,

— bien repetir el IF, ya sea con un segundo antisuero o con una dilución decimal del precipitado.

3. **Test «Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay» (ELISA)**

(Basado en Robinson-Smith *et al*, 1995)

Utilizar antisuero para *Pseudomonas solanacearum*, preferiblemente de la raza 3/biovar 2. Determinar el título en una suspensión de 10^6 células por ml de la cepa homóloga de *Pseudomonas solanacearum*.

Se recomienda utilizar placas de microtitulación NUNC Polysorp.

Incluir un control negativo de extracto de patata y un control de tampón fosfato salino (PBS).

Utilizar una suspensión de más de > 10^6 células por ml de una raza/biovar de *Pseudomonas solanacearum* como control positivo. Procesarlo de la misma manera que la muestra o muestras, pero bien separado de éstas en la placa de microtitulación.

3.1. Echar con una pipeta de 100 a 200 µl del precipitado resuspendido en un microvial. Calentar durante 4 minutos a 100 °C. Colocar el microvial en hielo.

3.2. Añadir un volumen igual de tampón de tapizado de carbonato de doble concentración (apéndice 5). Homogeneizar por agitación.

3.3. Añadir alícuotas de 100 µl a cada uno de dos pocillos, como mínimo, de la placa de microtitulación. Dejar en incubación durante una hora a 37 °C o durante una noche a 4 °C.

3.4. Quitar los extractos de los pocillos. Lavar éstos tres veces con PBS-Tween (apéndice 5), dejando en ellos la última solución de lavado durante al menos 5 minutos.

3.5. Preparar la dilución adecuada de antisuero de *Pseudomonas solanacearum* en tampón de bloqueo (apéndice 5). Echar 100 µl de dilución de antisuero en los pocillos. Dejar en incubación durante una hora a 37 °C.

3.6. Quitar el antisuero de los pocillos. Lavar éstos como en el punto 3.4.

3.7. Preparar la dilución adecuada de conjugado de fosfatasa alcalina en tampón de bloqueo. Echar 100 µl de dilución de conjugado en los pocillos. Dejar en incubación durante una hora a 37 °C.

3.8. Quitar el conjugado de los pocillos. lavar éstos como en los puntos 3.4 y 3.6.

3.9. Preparar la solución de substrato de fosfatasa alcalina (apéndice 5). Echar 100 µl en los pocillos. Dejar en incubación de 30 minutos a una hora en la oscuridad a temperatura ambiente.

3.10. Leer la absorbancia a 409 nm.

Interpretación de la prueba ELISA

La prueba ELISA será negativa si la densidad óptica (DO) de la muestra es < 2×DO del control negativo.

La prueba ELISA será positiva si la DO de la muestra es > 2×DO del control negativo.

4. **Prueba «Polymerase Chain Reaction» (PCR)**

(Basado en Seal *et al, 1993)*

Observación: Deberán utilizarse puntas de pipeta ajustadas con filtro en todas las fases de preparación de la muestra y siempre que haya que manejar PCR.

Preparar una suspensión de 10^6 células por ml de una cepa de *Pseudomonas solanacearum* de raza 3 y biovar 2 como control positivo. Actuar del mismo modo que con la muestra o muestras.

4.1. Echar con una pipeta 100 µl del precipitado resuspendido en un microvial.

Otra alternativa es echar 90 µl del precipitado resuspendido en un microvial que contenga 10 µl de NaOH 0,5 M. Mezclar invirtiendo el vial repetidamente.

4.2. Calentar durante 4 minutos a 100 °C. Colocar el microvial en hielo inmediatamente.

4.3. Preparar por lo menos dos diluciones decimales, por ejemplo, 1/10 y 1/100, o más si se considera útil, en agua destilada estéril o ultrapura (UPW).

4.4. Preparar la mezcla de reacción PCR (apéndice 6) en un vial estéril añadiendo los componentes siguientes en el orden en que se citan:

Volumen de reacción de 50 µl

Componente	Cantidad	Concentración final
Agua destilada estéril o ultrapura	30,8 µl-33,8 µl	
10×tampón PCR	5,0 µl	1×
d-ATP	1,0 µl	0,2 mM
d-CTP	1,0 µl	0,2 mM
d-GTP	1,0 µl	0,2 mM
d-TTP	1,0 µl	0,2 mM
Iniciador OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Iniciador Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Polimerasa Taq (5 U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Volumen total	45-48 µl	

Para más reacciones

Calcular la cantidad de cada componente para el número de reacciones necesario. Mezclar los componentes y poner 45-48µl de la mezcla en viales PCR estériles. Colocar los viales con la mezcla de la reacción PCR en hielo.

Para volúmenes de reacción de 25 µl

Reducir los componentes proporcionalmente.

4.5. Amplificación de la PCR

4.5.1. Optativo: centrifugar con impulsos los viales que contienen la muestra hervida y el control positivo.

Añadir, en el orden indicado, 2-5 µl de la muestra o muestras, el control de agua y el control positivo a los viales que contienen la mezcla de la reacción PCR. Colocar los viales en el calentador del termociclador de ADN.

4.5.2. Aplicar el siguiente programa:

1 ciclo de:
i) 2 minutos a 96 °C: desnaturalización de la cadena molde,

50 ciclos de:
ii) 20 segundos a 94 °C: desnaturalización,
iii) 20 segundos a 68 °C: hibridación de iniciador,
iv) 30 segundos a 72 °C: extensión de la copia,

1 ciclo de:
v) 10 minutos a 72 °C: nueva extensión,

1 ciclo de:
vi) mantenimiento de la temperatura a 4 °C.

Observación: Estos parámetros son para un aparato Perkin Elmer 9600. Para otros termocicladores tal vez se precise una capa de aceite mineral en los viales de la reacción PCR y/o modificar la duración de las fases ii), iii) y iv) de amplificación.

4.5.3. Retirar los viales del termociclador. Analizar el producto de la PCR. Si esta operación no se realiza inmediatamente, almacenar los viales a 4 °C si se van a utilizar el mismo día o a -18 °C si el período de espera va a ser mayor.

4.6. Análisis del producto de la PCR

Los fragmentos de la PCR se detectan mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

4.6.1. Preparar un gel de agarosa apropiado llevando suavemente la agarosa a ebullición en un tampón de tris-acetato para electroforesis (TAE).

4.6.2. Enfriar la agarosa fundida a 50-60 °C, verterla en el molde de la unidad de electroforesis e insertar el peine. Dejar solidificar el gel.

4.6.3. Retirar el peine. Sumergir el gel en TAE de modo que quede cubierto (2-3 mm) con el tampón.

4.6.4. Poner gotitas de 3 µl de tampón de carga en parafilm. Añadir 12 µl del producto de la PCR procedentes de las muestras, del control positivo o del control de agua, y mezclar aspirando suavemente en la punta de la pipeta antes de la carga. Los volúmenes dados pueden modificarse para que se ajusten a la capacidad de los pocillos en el gel de agarosa.

4.6.5. Cargar con cuidado los pocillos del gel. Incluir un marcador ADN apropiado al menos en un pocillo, para que sirva de referencia.

4.6.6. Conectar los cables al generador de electricidad y al equipo de electroforesis. Dejar correr el gel a 5-8 V/cm hasta que la parte delantera del indicador de seguimiento se halle a 1 cm del final del gel.

4.6.7. Cortar el suministro de electricidad. Desconectar los cables de la unidad de electroforesis.

Retirar el gel con cuidado. Sumergirlo en una solución de bromuro de etidio durante un período comprendido entre 30 y 45 minutos.

Observación: Deben llevarse guantes desechables cada vez que se manipule bromuro de etidio, ya que es un mutágeno muy fuerte.

4.6.8. Desteñir en agua destilada durante 10-15 minutos.

4.6.9. Visualizar el fragmento o los fragmentos de ADN amplificados mediante transiluminación UV. El producto de la PCR de *Pseudomonas solanacearum* con el conjunto de iniciadores OLI-1 y Y-2 tiene una longitud de 288 bp. Cotejar con el marcador de ADN y con el control positivo.

Observación: El control de agua debe ser negativo en cualquier caso. De lo contrario, repetir la prueba.

4.6.10. Hacer una fotografía del gel, en caso de necesitarse una prueba permanente.

4.6.11. Confirmar la autenticidad del fragmento amplificado mediante un análisis de la enzima de restricción (REA).

4.7. Análisis de la enzima de restricción (REA)

4.7.1. Echar 8,5 µl del producto de la PCR (4.5.3) en un microvial nuevo. Añadir 1 µl de tampón de enzima 10 × y 0,5 µl de enzima de restricción AvaII.

4.7.2. Mezclar aspirando suavemente en la punta de la pipeta. Si quedan gotas en las paredes del vial, dar un pulso en una microcentrifuga. Dejar incubar durante una hora a 37 °C.

4.7.3. Analizar el fragmento de la PCR digerido mediante electroforesis en gel de agarosa, tal como se indica en el punto 4.6.

Interpretación de los resultados de la prueba PCR

La prueba PCR es negativa si no se detecta el fragmento 288 bp característico y se detecta para la cepa de control positivo de *Pseudomonas solanacearum*.

La prueba PCR es positiva si se detecta el fragmento 288 bp y el análisis REA del fragmento amplificado es idéntico al de la cepa de control positivo de *Pseudomonas solanacearum*.

5. **Siembra en medio selectivo**

(Basado en Elphinstone *et al.*, 1996.)

5.1. Realizar la prueba mediante una técnica de dilución en placas apropiada, como, por ejemplo:

i) Preparar al menos dos diluciones decimales, por ejemplo 1/10 y 1/100, o más si se considera necesario, del sedimento resuspendido en tampón de precipitado. Echar con una pipeta un volumen normalizado medido (50-100 µl) del sedimento resuspendido y de cada dilución en el medio selectivo SMSA modificado (apéndice 7) y extender con una varilla de vidrio por toda la superficie del medio.

Si se considera útil, realizar también una estría de dilución con un asa cargada con 10 µl del sedimento resuspendido. Flamear el asa entre cada siembra.

ii) Poner un volumen estándar medido (50-100 µl) del sedimento resuspendido en el medio selectivo SMSA modificado y extender con una varilla de vidrio por toda la superficie del medio. Pasar la varilla sin flamearla al menos por otras dos placas de SMSA modificado.

5.2. Añadir, mediante la misma técnica de dilución en placas, una suspensión de 10^6 células por ml de una cepa de *Pseudomonas solanacearum* de raza 3 y biovar 2 como control positivo a un conjunto diferente de placas de SMSA modificado.

5.3. Dejar incubar las placas a 28 °C. Iniciar su lectura al cabo de tres días. Si el resultado es negativo, esperar hasta seis días como máximo. Los aislados virulentos de *Pseudomonas solanacearum* desarrollan colonias de color blanco lechoso, planas, irregulares y fluidas, con unos centros de color rojo sangre y que presentan rayas o espirales internas.

5.4. Purificar las colonias de morfología característica mediante subcultivo en un medio nutritivo general (apéndice 1).

5.5. Identificar los cultivos puros (punto 4.1 de la sección II) y confirmar los cultivos de *Pseudomonas solanacearum* mediante una prueba de patogenicidad (punto 4.3 de la sección II).

Interpretación de los resultados de la siembra en medio selectivo

La siembra en medio selectivo es negativa si no se aíslan colonias bacterianas al cabo de seis días ni se aíslan colonias características de *Pseudomonas solanacearum,* siempre que no haya sospechas de inhibición producida por colonias de otras bacterias y que en los controles positivos se encuentren colonias características de *Pseudomonas solanacearum.*

La siembra en medio selectivo es positiva si se aíslan colonias características de *Pseudomonas solanacearum.*

6. **Prueba de bioensayo**

(Basado en Janse, 1988.)

6.1. Utilizar en cada muestra 10 plántulas de tomate o de berenjena sensibles, en la fase de la tercera hoja verdadera. Las plantas no deben regarse durante las 24 horas previas a la inoculación.

6.2. Distribuir entre las plantas 100 µl de sedimento resuspendido, inoculándolo en el tallo, entre los cotiledones, y en uno o varios puntos más.

6.3. Utilizando esta misma técnica, inocular 10 plántulas con una suspensión de 10^6 células por ml de una cepa virulenta de *Pseudomonas solanacearum* de raza 3/biovar 2 como control positivo y con tampón de precipitado como control negativo. Separar las plantas inoculadas con el control positivo de las otras para evitar contaminaciones.

6.4. Dejar que los plantones sigan creciendo hasta 4 semanas a 22-28 °C con alta humedad relativa y riego diario. Comprobar si se aprecian síntomas de marchitamiento, epinastia, clorosis y/o crecimiento reducido.

6.5. Aislar de las plantas infectadas (sección II). Identificar los cultivos puros de morfología característica (punto 4.1 de la sección II) y confirmar los cultivos de *Pseudomonas solanacearum* mediante una prueba de patogenicidad (punto 4.3 de la sección II).

6.6. Si se considera útil, comprobar si se ha producido infección en los lotes que no presenten signos de ella. Separar del tallo de cada planta una sección de 1 cm que esté 2 cm por encima del punto de inoculación. Homogeneizar los tejidos en tampón de maceración. Llevar a cabo la siembra por dilución en placas (punto 5.1 de la sección III). De obtenerse un resultado positivo, identificar los cultivos puros de morfología característica (punto 4.1 de la sección II) y confirmar la presencia de cultivos de *Pseudomonas solanacearum* mediante una prueba de patogenicidad (punto 4.3 de la sección II).

Interpretación de los resultados de la prueba del bioensayo

La prueba del bioensayo es negativa si las plantas no están infectadas por *Pseudomonas solanacearum,* bajo reserva de que la muestra inoculada esté infectada por *Pseudomonas solanacearum.*

La prueba del bioensayo es positiva si las plantas están infectadas por *Pseudomonas solanacearum.*

7. **Prueba de enriquecimento**

(Basado en Elphinstone *et al.,* 1996.)

7.1. Echar 100 µl de sedimento resuspendido en 3 ml de caldo SMSA modificado (apéndice 7).

7.2. Dejar incubar a 28 °C durante 48 horas y, en cualquier caso, durante un máximo de 72 horas, manteniendo el tapón del tubo sin apretar para que haya aireación.

7.3. Ajustar el tapón y mezclar. Hacer partes alícuotas para el test IF (punto 2 de la presente sección), el test ELISA (punto 3 de la presente sección) y/o el test PCR (punto 4 de la presente sección).

8. **Test de patogenicidad**

Véase el punto 4.3 de la sección II.

Apéndice 1

Medios nutritivos para aislamiento y cultivo de *Pseudomonas solanacearum*

Agar nutritivo (NA)

Agar nutriente (Difco)	23 g
Agua destilada	1 l

Preparar volúmenes de $^1/_2$ litro de medio en matraces de un litro.

Disolver los ingredientes.

Esterilizar en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Enfriar hasta 50 °C. Distribuir en placas.

Agar levadura peptona glucosa (YPGA)

Extracto de levadura (Difco)	5 g
Bacto peptona (Difco)	5 g
D(+) glucosa (monohidrato)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Agua destilada	1 l

Preparar volúmenes de $^1/_2$ litro del medio en matraces de un litro.

Disolver los ingredientes.

Esterilizar en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Enfriar hasta 50 °C. Distribuir en placas.

Agar de sacarosa y peptona (SPA)

Sacarosa	20 g
Peptona	5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Agua destilada	1 l

Preparar volúmenes de $^1/_2$ litro de medio en matraces de un litro.

Disolver los ingredientes. Si es necesario, ajustar el pH a 7,2-7,4.

Esterilizar en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Enfriar hasta 50 °C. Distribuir en placas.

Medio de tetrazolio de Kelman

Casamino ácidos (Difco)	1 g
Bacto peptona (Difco)	10 g
Dextrosa	5 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Agua destilada	1 l

Preparar volúmenes de $^1/_2$ litro del medio en matraces de un litro.

Disolver los ingredientes.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Enfriar hasta 50 °C.

Añadir una solución acuosa de cloruro de trifenil tetrazolio (Sigma), esterilizada por filtración, para conseguir una concentración final de 50 mg/l.

Distribuir en placas.

Apéndice 2

Materiales para preparación de las muestras

Tampón de maceración: tampón fosfato 50 mM, pH 7,0

Este tampón se utiliza para macerar tejidos.

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Agua destilada	1 l

Disolver los ingredientes y comprobar el pH. Preparar las alícuotas necesarias.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para la realización del test PCR directo, se recomienda añadir Polivinilpyrolidone-40 000 MWT (PVP-40) al 5 %, para reducir la incidencia de la inhibición de amplificación por moléculas aromáticas presentes en el extracto.

En el caso de utilizarse los procedimientos de homogeneización con Waring Blender o con Ultra Turrax para la maceración de los tejidos de patata, se recomienda la utilización de un defloculante, un agente antiespumante o un antioxidante.

Copos de Lubrol	0,5 g/l
Antiespumante DC silicona	1,0 ml/l
Tetrasodiopirofosfato	1,0 g/l

Esterilizar separadamente en autoclave. Añadir hasta obtener la concentración deseada.

Tampón del precipitado: tampón fosfato 10 mM, pH 7,2

Este tampón se utiliza para la resuspensión y dilución de los precipitados de las cuñas de patata.

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,4 g
Agua destilada	1 l

Disolver los ingredientes y comprobar el pH. Preparar las alícuotas necesarias.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Apéndice 3

Materiales para el test IF

Tampón IF: tampón fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2

Este tampón se utiliza para la dilución de antisueros.

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Agua destilada	1 l

Disolver los ingredientes y comprobar el pH. Preparar las alícuotas necesarias.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tampón IF-Tween

Este tampón se utiliza para lavar los portaobjetos. Añadir 0,1 % de Tween 20 al tampón IF.

Tampón fosfato glicerol 0,1 mM, pH 7,6

Este tampón se utiliza como fluido de montaje en los pocillos de los portaobjetos de IF para aumentar la fluorescencia.

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,15 g
Glicerol	50 ml
Agua destilada	100 ml

Apéndice 4

Determinación del nivel de contaminación en el test IF

Superficie (S) del pocillo del portaobjetos múltiple

$$= \frac{\pi D^2}{4}$$

en que D = diámetro del pocillo. (1)

Superficie(s) del campo del objetivo

$$= \frac{\pi d^2}{4}$$

en que d = diámetro del campo. (2)

Calcular d bien por medición directa bien con las siguientes fórmulas:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \quad (3)$$

en que i = coeficiente de campo (dependiente del tipo del ocular y varía de 8 a 24),

K = coeficiente del tubo (1 o 1,25),

G = aumento (100×, 40×, etc.) del objetivo.

De (2):

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}} \quad (4)$$

De (3):

$$d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$$

Contar el número de células fluorescentes típicas por campo (c).

Calcular el número de células fluorescentes típicas por pocillo (C):

$$C = c \frac{S}{s}$$

Calcular el número de células fluorescentes típicas por ml de precipitado (N):

$$N = C \times \frac{1\,000}{y} \times F$$

en que y = volumen de precipitado en el pocillo,

F = factor de dilución del precipitado.

Apéndice 5

Materiales para el test ELISA

Tampón carbonato fuerza doble para tapizado, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Agua destilada	1 l

Disolver los ingredientes y comprobar el pH. Preparar las alícuotas necesarias.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Si el extracto contiene una alta proporción de moléculas aromáticas, puede añadirse como antioxidante sulfito de sodio con una concentración final de 0,2 %.

Tampón fosfato salino (PBS) 10 ×, pH 7,4

NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29 g
KCl	2 g
Agua destilada	1 l

Disolver los ingredientes y comprobar el pH. Preparar las alícuotas necesarias.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tampón fosfato salino-Tween (PBS-T)

PBS 10 ×	100 ml
Solución al 10 % de Tween 20	5 ml
Agua destilada	895 ml

Tampón de bloqueo (anticuerpos) (debe prepararse en el momento de su utilización)

PBS 10 ×	10 ml
Polivinilpyrolidone-44 000 MWT (PVP-44)	2,0 g
Solución al 10 % de Tween 20	0,5 g
Leche en polvo	0,5 g
Agua destilada	hasta completar 100 ml

Solución de sustrato fosfatasa alcalina, pH 9,8

Dietanolamina	97 ml
Agua destilada	800 ml

Mezclar y ajustar el pH a 9,8 con HCl concentrado.

Completar hasta 1 litro con agua destilada.

Añadir 0,2 g de $MgCl_2$.

Disolver dos pastillas de 5 mg de sustrato fosfatasa (Sigma) por cada 15 ml de solución.

Apéndice 6

Materiales para el test PCR

Secuencia del oligonucleótido iniciador

Iniciador OLI-1	5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'
Iniciador Y-2	5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Para los materiales véase Seal *et al.* 1993.

Apéndice 7

Materiales para la siembra en medio selectivo y test de enriquecimiento

Medio selectivo SMSA (Engelbrecht, 1994, modificado por Elphinstone *et al.*, 1996)

Medio base	
Casamino ácidos (Difco)	1 g
Bacto peptona (Difco)	10 g
Glicerol	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Agua destilada	1 l

Preparar volúmenes de ½ litro del medio en matraces de un litro.

Disolver los ingredientes y comprobar el pH. Si es necesario, ajuste el pH a 6,5 antes de esterilizar. *Pseudomonas solanacearum* no se desarrolla bien con un pH > 7,0.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Enfriar hasta 50 °C.

Añadir los siguientes ingredientes (todos de Sigma) para obtener las concentraciones finales especificadas:

Violeta cristal	5 mg/l	0	
Polimixina B sulfato	100 mg/l	(aproximadamente 600 000 unidades)	Sigma P-1004
Bacitracina (*)	25 mg/l	(aproximadamente 1 250 unidades)	Sigma B-0125
Cloranfenicol	5 mg/l		Sigma C-3175
Penicilina G	0,5 mg/l	(aproximadamente 825 unidades)	Sigma P-3032
Sales de tetrazolio	50 mg/l		

Disolver los ingredientes en etanol del 70 % para obtener las concentraciones indicadas para el volumen de diluyente preparado. Algunos ingredientes, como por ejemplo la polimixina B y el cloranfenicol, exigen un ligero calentamiento y agitación.

Caldo SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Preparar de forma idéntica al medio selectivo SMSA, pero suprimir el agar.

Distribuir en alícuotas de 3 ml, en tubos desechables Universal de 30 ml.

(*) Si se considera necesario, el aumento de la concentración de bacitracina hasta 300 ppm puede reducir la contaminación por bacterias sapófitas sin reducir la recuperación de *Pseudomonas solanacearum*.

Referencias

Buddenhagen, I.W., Sequeira, L. y Kelman, A., 1962. «Description of races in *Pseudomonas solanacearum*». *Phytopathology* 52, 726.

Cook, D., Elizabeth B. y Sequeira L., 1989. «Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons». *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113-121.

Dinesen I.G. y DeBoer, S.H., 1995. «Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers». *American Potato Journal* 72, 133-142.

Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J. y Stead, D.E., 1996. «Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts». *EPPO Bulletin* 26.

Engelbrecht, M.C., 1994. «Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*». *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5.

Hayward, A.C., 1964. «Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*». *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265-277.

Hayward, A.C., 1994. «Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. En: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent,* Pseudomonas solanacearum (eds. A.C. Hayward y G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127-135.

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

Janse, J.D., 1991. «Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis». *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335-345.

Kelman, A., 1954. «The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium». *Phytopathology* 64, 293-695.

Lelliot, R.A. y Stead, D.E., 1987. «Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants (T.F. Preece ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 216 pp.

Louws, F.J., Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. y De Bruijn, F.J., 1995. «Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*». *Phytopathology* 85, 528-536.

Lozano, J.C. y Sequeira, L., 1970. «Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique». *Phytopathology* 60, 838.

Mirza, M.S., Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. y Akkermans, A.D.L., 1993. «Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*». *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029-1034.

Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. y Forde, S.M.D., 1995. «Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum,* the causative agent of bacterial wilt». *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.

Seal, S.E., Jackson, L.A., Young, J.P.W. y Daniels, M.J., 1993. «Differentiation of *Pseudomonas solanacearum,* P. syzygii, P. picketti and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction». *Journal of General Microbiology* 139, 1587-1594.

Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. y Saddler, G.S., 1995. «Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya». *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4262-4268.

Stead, D.E., 1992a. «Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria». In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J.M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76-111.

Stead, D.E., 1992b. «Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles». *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281-295.

Van Beuningen, A., Derks, H. y Janse J.D., 1995. «Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent *in-situ* hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe». Züchtungsforschung 2, 266-269.