
GENOTIPIFICACIÓN Y PERFIL BIOQUÍMICO DE AISLADOS DE *Xanthomonas albilineans* EN VENEZUELA

BEATRIZ ALVEZ, GUILLERMINA ALONSO y MAIRA OROPEZA

RESUMEN

La bacteria *Xanthomonas albilineans* es el agente causal de la escaldadura foliar en caña de azúcar, y se caracteriza por presentar gran variabilidad en su morfología celular, perfil bioquímico y perfil genético, características clave para su identificación. Para diagnosticar a tiempo la infección y evitar pérdidas de gran magnitud, deben establecerse protocolos de identificación del fitopatógeno y evaluar el grado de diversidad genética. En este trabajo se pretende caracterizar aislados venezolanos de *X. albilineans* mediante pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares. Para ello se aislaron bacterias de plantas de caña de azúcar variedades V756, V781 y V99245 con síntomas de escaldadura foliar y se sometieron a crecimiento diferencial en medios selectivos, tinción de Gram, hidrólisis de esclulina,

almidón y gelatina, actividad catalasa y oxidasa. Además, se realizó el análisis molecular mediante amplificación del ADN con iniciadores específicos y análisis ERIC-PCR y REP-PCR. El crecimiento diferencial y los perfiles bioquímicos de los aislados venezolanos LMV02 y LMV08 coinciden con la cepa control de *X. albilineans*. La amplificación del ADN con iniciadores específicos permitió obtener la banda específica de 288 pb aunque igualmente se obtuvieron otras bandas. Con el análisis de los dendrogramas obtenidos con ERIC-PCR y REP-PCR se observó que los aislados presentan una similitud de 50 y 30%, respectivamente. La estrategia de diagnóstico empleada permitió corroborar la identidad de los aislados LMV02 y LMV08 como la bacteria patógena *X. albilineans*, así como evaluar su relación genética.

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo de gran importancia económica en varias regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo, debido a su alta acumulación de sacarosa, la eficiencia en producción de biomasa y sus ventajas para la producción de biocombustibles como el etanol. Las enfermedades de la caña de azúcar constituyen uno de los principales factores negativos para la producción azucarera mundial y, entre ellas, la escaldadura foliar, causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson,

es una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo, por sus efectos sobre los rendimientos agrícolas, la calidad de los jugos y las elevadas pérdidas que ocasiona en su fase aguda, estimadas entre el 90-100% (Ricaud y Ryan, 1989; Hoy y Grisham, 1994, Jiménez y Contreras, 2008, Zardón *et al.*, 2012). En Venezuela, esta enfermedad fue detectada en 1968, en un material proveniente de la Estación Experimental de Barbados (Ordosgoitti *et al.*, 1976).

El Género *Xanthomonas* comprende 24 especies patógenas de plantas,

incluyendo *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson (Tampakaki *et al.*, 2009). *X. albilineans* es un bacilo Gram negativo, aeróbico, con un flagelo polar que le confiere motilidad y propulsión para encontrar un ambiente óptimo y esquivar moléculas tóxicas (Pieretti *et al.*, 2012).

Bajo condiciones naturales, esta bacteria solo ataca la caña de azúcar; sin embargo, se le ha encontrado afectando a malezas gramíneas propias de este cultivo. Se ha demostrado además su transmisión de una planta a otra por contacto de los exudados de las raíces y a

PALABRAS CLAVE / Dendrograma / Diagnóstico Fitopatológico, ERIC-PCR / Hidrólisis de Macromoléculas / REP-PCR, *Xanthomonas albilineans* /

Recibido: 29/10/2014. Modificado: 25/05/2016. Aceptado: 30/05/2016.

Beatriz Alvez. Doctora en Ciencias mención Botánica, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesora-Investigadora, UCV, Venezuela. e-mail: beatriz.alvez@ciens.ucv.ve

Guillermina Alonso. Doctora en Ciencias, mención Biología Celular, UCV, Venezuela. Profesora-Investigadora, UCV, Venezuela. e-mail: guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

Maira Oropeza. Doctora en Ciencias, mención Botánica, UCV, Venezuela. Profesora-Investigadora, UCV, Venezuela. Dirección: Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas, Venezuela. Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041A, Venezuela. e-mail: maira.oropeza@ciens.ucv.ve

través del agua del suelo, aunque al parecer la bacteria es incapaz de sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo (Martín *et al.*, 2000).

La escaldadura foliar se manifiesta en dos fases diferenciadas, la crónica y la aguda, pero muy frecuentemente se presentan fases particulares de latencia y eclipse por largos periodos de tiempo. La forma crónica se caracteriza por la presencia de líneas paralelas a las nervaduras en las hojas; líneas que son inicialmente estrechas pero se extienden gradualmente a lo largo del limbo. Cuando la enfermedad se agudiza, las líneas se ensanchan y el follaje entero puede clorotizarse, tomando una coloración blanquizca. Muchas plantas infectadas no presentan síntomas, o solamente algunas líneas blancas foliares, durante un largo periodo, lo cual se conoce como fase de latencia, la que prevalece en la mayoría de las variedades comerciales que presentan tolerancia, por lo que conviven con el patógeno por años sin manifestar síntomas externos. Al mismo tiempo puede desarrollarse otra fase, llamada fase de eclipse, donde aparecen y desaparecen líneas blancas foliares que dejan de ser visibles después de la senescencia y la muerte de las hojas más viejas, mientras que las hojas nuevas ya no presentan ningún síntoma. Así, una planta puede ser señalada enferma o sana según el momento de la inspección fitosanitaria (Ricaud y Ryan, 1989; Rott, 1995). La existencia de las fases de latencia y de eclipse dificulta notablemente el diagnóstico de la enfermedad, por lo que el desarrollo de métodos de identificación de la bacteria causante es de gran importancia.

El diagnóstico de una enfermedad incluye tanto el reconocimiento de la misma como la identificación de su agente causal. En el pasado, la identificación de bacterias se basaba principalmente en la determinación de las propiedades de patogenicidad (por ejemplo: rango de huéspedes) y las características bioquímicas del patógeno. Las prácticas actuales implican procedimientos polifásicos, incluyendo técnicas moleculares, entre las que destaca el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por su facilidad, exactitud e independencia de las condiciones ambientales (Tampakaki *et al.*, 2009).

El género *Xanthomonas* se ha distinguido por su diversidad fitopatogénica y su contrastante uniformidad fenotípica (Dye, 1962; Van den Mooter y Swings, 1990; Yang *et al.*, 1993). Los estudios relacionados con su taxonomía se han basado en métodos tradicionales como los bioquímicos y fisiológicos, pruebas de patogenicidad y más recientemente los méto-

dos moleculares (Graham *et al.*, 1990; Van den Mooter y Swings, 1990; Palleroni y Bradbury, 1993; Yang *et al.*, 1993; Jansen *et al.*, 1996; Alvez *et al.*, 2011; Arriola *et al.*, 2015). Vauterin *et al.* (1995) elaboraron una matriz de homología determinada por hibridación del ADN, logrando la diferenciación de 20 grupos, considerados como especies genómicas del género *Xanthomonas*, entre las cuales se mantuvo *X. albilineans* como una especie bien diferenciada del resto. Algunos autores han reportado características bioquímicas y fisiológicas del patógeno, tales como la morfología de las células, la utilización de carbohidratos, la hidrólisis de macromoléculas y las proteínas totales de la pared celular, que pueden diferir de los patrones descritos (Yang *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005). Simoes *et al.* (2007) desarrollaron un protocolo de diferenciación de especies de *Xanthomonas* por PCR-RFLP corroborando que *X. albilineans* permanece como una especie distintiva del resto, gracias a la comparación de genes involucrados en la patogenicidad.

Para poder entender la epidemiología de la escaldadura foliar de la caña de azúcar y comenzar a conocer la procedencia de las cepas de la bacteria *X. albilineans* introducidas en Venezuela, en este trabajo se realiza un análisis de variabilidad genética bacteriana mediante genotipificación con la técnica REP-PCR, que amplifica secuencias repetitivas en el genoma bacteriano. Estos estudios generalmente están basados en las características del genoma de las enterobacterias, el cual contiene diversos tipos de secuencias cortas repetidas y esparcidas. Dos de estas secuencias se aplicaron en este trabajo, llamadas ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) y secuencias REP (*repetitive extragenic palindromic*), las que han sido usadas ampliamente en tipificación, análisis genético e identificación de brotes infecciosos bacterianos (Rademarker *et al.*, 1997; Vilchez y Alonso, 2009). Estos análisis están basados en la amplificación de las secuencias de ADN a través de la PCR, usando iniciadores específicos para cada tipo de secuencia. El polimorfismo detectado resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones del ADN. Usando estas secuencias ha sido posible discriminar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie y grupos de cepas relacionadas clonalmente, ya que poseen un gran poder discriminatorio (Versalovic *et al.*, 1991).

Con el propósito de disponer de herramientas para diagnosticar la escaldadura foliar de la caña de azúcar a

tiempo y evitar pérdidas de gran magnitud, en este trabajo se realizó la identificación y caracterización de diversos aislados venezolanos de *X. albilineans* a través de pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.

Metodología

Material vegetal

Se realizaron aislamientos para obtener cultivos puros de *Xanthomonas albilineans* a partir de plantas de las variedades venezolanas de caña de azúcar V756, V781 y V99245 con síntomas de escaldadura foliar, procedentes de las localidades de Chivacoa y Yaritagua, Yaracuy, Venezuela.

Medios de cultivo para el aislamiento, purificación y preservación de la bacteria

Se utilizó el medio D5 selectivo para el género *Xanthomonas*, compuesto por (g·l⁻¹) celobiosa (10), K₂HPO₄ (3), NaH₂PO₄ (1), MgSO₄·7H₂O (0,3) y NH₄Cl (1) (Kado y Heskett, 1970); y el medio YSP, el cual es recomendado para la preservación de *X. albilineans* y está compuesto por (g·l⁻¹) extracto de levadura (5), sacarosa (20), peptona (10) (Schaad *et al.*, 2001). Para solidificar estos medios se añadió agar 15g·l⁻¹.

Aislamiento de *X. albilineans*

A partir de tejido foliar con síntomas de escaldadura foliar, se realizaron cortes y se desinfectaron con NaOCl al 2% durante 2min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se maceraron con 3ml de agua destilada estéril. Se inoculó 0,1ml del macerado en caldo D5 durante 3 días, luego se sembró este caldo en agar D5 por agotamiento (tomado y modificado de Jiménez *et al.*, 2004).

Para todas las pruebas se empleó como control positivo una cepa de *Xanthomonas albilineans* donada por Cenicaña, Cali, Colombia y las cepas *X. campestris* (CVCM 2063), *Erwinia nigri-fluens* (CVCM 2000) y *Escherichia coli* (CVCM 2038), donadas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela.

Pruebas morfológicas

Una vez obtenidos los cultivos puros y las colonias aisladas se procedió a la observación de sus características en los medios de cultivo sólidos. Se observaron la elevación, borde, tamaño y color de las colonias, y producción de

exopolisacáridos, entre otras características que permiten a simple vista separar estos microorganismos (Díaz y Ferrán, 2003).

Se realizaron frotis de los distintos aislados obtenidos de las plantas enfermas, los cuales se sometieron a tinción de Gram y tinción con Rojo Congo.

Pruebas bioquímicas

Los aislados que resultaron ser bacilos Gram negativos se sometieron a las pruebas de actividad de catalasa y de oxidasa, fermentación de glucosa y de lactosa, hidrólisis de almidón y de esculina, licuefacción de gelatina, y producción de mucosidad (Schaad *et al.*, 2001).

Pruebas moleculares

Los aislados se cultivaron en 5ml de caldo YSP con 10% de glicerol, durante 24h a 27°C, para luego extraer el ADN total, centrifugando las células a 13000g durante 5min. El sedimento se resuspendió en 200µl de solución Tris 0,1M y se le añadieron 200µl de solución de lisis (NaOH 0,2N y 1% SDS) a la que se adicionaron 100µl de proteinasa K (1mg·ml⁻¹). Esta mezcla se incubó durante 1h a 55°C. Transcurrido este tiempo se añadieron 700µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se homogenizó y centrifugó durante 10min a 13000g. Luego de esta centrifugación se observaron tres fases y se tomó la fase acuosa. Posteriormente a la fase acuosa se le añadió 700µl de EtOH frío al 95% y se centrifugó a 13000g durante 5min. Luego se lavó con EtOH al 70% y se centrifugó a 13000g durante 5min. Finalmente se descartó el sobrenadante y el precipitado de ADN se secó y se resuspendió en 50µl de agua destilada estéril (modificado de Gomes *et al.*, 2000). La evaluación de la concentración y pureza del ADN se realizó en un espectrofotómetro Genesys 10 Bio, usando la relación 260/280 D.O. (Sambrook y Russell, 2001). Para corroborar la calidad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0,8%, mientras que para la visualización de los productos de PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1,2%. Todos los geles se sometieron a tinción con bromuro de etidio y observación en GelDoc (BioRad).

Todas las PCR se realizaron en un volumen final de 25µl que contenían 1X amortiguador de reacción, 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, 2µM iniciadores, 10ng ADN de la muestra bacteriana y con respecto a la Taq Polimerasa, se emplearon 0,625 U para las PCR con iniciadores específicos y 1 U para las ERIC-PCR y REP-PCR.

Para corroborar la naturaleza procariota de los aislados y evaluar la calidad y cantidad adecuada de ADN para las pruebas de diagnóstico y genotipificación, se realizó la amplificación de la región del ARN ribosomal 16S con los iniciadores universales U1: 5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3' y U2: 5'-ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC-3' (Lu *et al.*, 2000), esperándose productos de 996 pb y de 100 pb.

Para la identificación molecular de *X. albilineans* se realizó la amplificación con iniciadores específicos PGBL1: 5'-CTT TGG GTC TGT AGC TCA GG-3' y PGBL2: 5'-GCC TCA AGG TCA TAT TCA GC-3' (Pan *et al.*, 1999), donde se esperaba un fragmento de 288 pb.

Para la genotipificación, se realizó una amplificación con iniciadores que hibridan con regiones repetidas dispersas en el genoma bacteriano, ERIC1: 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' y ERIC2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3', además de REP1: 5'-GCG CCG ICA TGC GGC ATT-3'. Se siguieron las condiciones de amplificación reportadas por Lopes *et al.*, (2001). El análisis de las amplificaciones ERIC y REP permitió la elaboración de una matriz de similitud basada en el número y ubicación de las bandas y la generación de un dendrograma de distancias genéticas mediante el software Bionumerics 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

Resultados

A partir del macerado de las hojas de las variedades venezolanas de caña de azúcar se realizaron cultivos y se obtuvieron 30 aislados que presentaron pigmentación amarilla, bordes enteros y superficie convexa. De estos 30 aislados, cinco se obtuvieron de la variedad V99245, 9 aislados de V756 y 16 aislados de V781; los cuales se sometieron a las diversas pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares contempladas en este estudio, para la identificación de *X. albilineans*.

La primera prueba que se llevó cabo fue la tinción de Gram, encontrándose ocho bacilos Gram negativos y el resto (22) eran bacilos Gram positivos, cocos Gram positivos, levaduras u hongos filamentosos. Al someter los ocho bacilos Gram negativos a tinción con Rojo Congo se corroboró su morfología de bastón. Las colonias correspondientes a estos bacilos Gram negativos se purificaron, se sometieron a las pruebas bioquímicas y se les asignó un número de serie (LMV02 a LMV09). El aislado LMV02 provino de la variedad V99245 de la localidad de Yaritagua ubicada en el municipio Peña y el aislado LMV08 provino de la variedad

V756 colectada en la localidad de Chivacoa ubicada en el municipio Bruzual. Estas dos localidades del estado Yaracuy están separadas (~30km) por los municipios José Antonio Páez y Urachiche. Los aislados LMV03, LMV04 y LMV05 fueron obtenidos de plantas de la variedad V781 de Chivacoa, así mismo los aislados LMV07 y LMV09 fueron obtenidos de plantas de la variedad V756 de Chivacoa, mientras que el aislado LMV06 se obtuvo de la variedad V99245 de Yaritagua.

Tanto el aislado LMV02 como el aislado LMV08 presentan actividad de la enzima catalasa para protegerse frente al peróxido de hidrógeno, no tienen como aceptor final de electrones la enzima citocromo C oxidasa y son no fermentadores, ya que luego del crecimiento en medio Kligler no se observó acidificación del mismo; es decir, no fermentan glucosa ni lactosa e hidrolizan la esculina, características clave en el perfil bioquímico de *X. albilineans*. Estos dos aislados son microorganismos que forman colonias con pigmentación amarillo claro, bordes enteros, superficie convexa y mucosidad en YDC, mientras que el resto de los aislados mostraron distintas tonalidades del pigmento amarillo y no presentaron mucosidad en YDC.

En cuanto a la fermentación de azúcares en medio Kligler, el aislado LMV07 acidificó por completo el tubo, mientras los aislados LMV03, LMV05 y LMV06 sólo acidificaron el bisel, lo que implica que sólo fermentan lactosa; los aislados LMV04 y LMV09 son no fermentadores. Por su parte, los aislados LMV04 y LMV06 presentan actividad oxidasa. El aislado LMV09 presentó un perfil bioquímico similar a la cepa control; sin embargo, el tiempo de crecimiento en agar D5, la mucosidad de las colonias en agar YDC y la tonalidad del pigmento amarillo difieren de la cepa control. El aislado LMV04 también hidroliza la esculina; sin embargo, no presenta coincidencia con la cepa control en las otras pruebas. Ninguno de los ocho aislados en estudio hidrolizan la gelatina ni el almidón, características también típicas del género *Xanthomonas*. Otro resultado con gran poder discriminatorio fue que los aislados LMV02 y LMV08 presentaron un crecimiento entre 48 y 72h en agar D5, mientras el resto de los aislados crecieron entre 24 y 48h.

Con el método de extracción de ADN empleado, se obtuvo un extracto de alta pureza que permitió la amplificación de la banda de 996 pb (Figura 1a), esperada con los iniciadores universales. Al usar los iniciadores específicos PGBL (Pan *et al.*, 1999), se encontró la amplificación de la banda de 288 pb (Figura 1b), esperada para *X. albilineans*

en los aislados LMV02 y LMV08, además de otras bandas de distintos pesos moleculares tanto en estos dos aislados como en los demás aislados y en las cepas que sirvieron como controles.

Al realizar la PCR con los iniciadores ERIC y REP, los patrones muestran entre 20 y 25 bandas con tamaños que van desde 100 pb hasta ~12000 pb. Los aislados LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07 y LMV09 presentaron un patrón de bandas similar, mientras los aislados LMV02 y LMV08, y los controles, cada uno presentó un patrón de bandas distinto (Figuras 2 y 3).

El análisis con el software Bionumerics 5.0, luego de un proceso de normalización de los datos y comparación con un marcador de tamaño molecular, generó dendrogramas que muestran las distancias genéticas entre estos microorganismos y los posibles grupos genéticos. Se llevó a cabo un análisis basado en lo reportado por Lopes *et al.* (2001) donde encontramos que los aislados analizados (LMV02 a LMV09) se pueden organizar según los resultados ERIC-PCR en cinco grupos genéticos, a saber, A: LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07 y LMV09; B: LMV02 y LMV08; C: *X. albilineans* CC y *E. coli* CVCV 2038; D: *X. campestris* CVCV 206; y E: *E. nigrifluens* CVCV 2000. Con los resultados de REP-PCR también se organizan en cinco grupos genéticos, A: LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07 y LMV09; B: *E. nigrifluens* CVCV 2000 y *E. coli* CVCV 2038; C: LMV02; D: LMV08; y Grupo E: *X. albilineans* CC y *X. campestris* CVCV 2063.

Con ambas técnicas se observó que los aislados LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07 y LMV09, son clonalmente idénticos, ya que en ambos análisis (ERIC y REP) el porcentaje de similitud, según la matriz generada por el software está entre 80 y 100% (grupo A en ambos casos).

Con respecto a *X. campestris*, la similitud con *X. albilineans* está entre 20 y 40% con ERIC (grupos C y D), mientras que con REP está entre 40 y 60% (grupo E). Esto es de esperarse, ya que pertenecen al mismo género bacteriano. De la misma forma se relaciona *X. campestris* con los aislados LMV02 y LMV08, mediante ERIC, compartiendo de 20 a 40% de similitud con LMV02 y de 40 a 60% de similitud con LMV08 (grupos B y D). Sin embargo, con REP la relación entre *X. campestris* con LMV02 y con LMV08 está entre 10 y 30% en ambos casos (grupo E con grupos C y D).

Finalmente, la relación entre los aislados LMV02 y LMV08 iden-

tificados en este estudio como *X. albilineans*, es de 60% con ERIC-PCR y 40% con REP-PCR. Por otra parte, comparten 50 y 30% de similitud respectivamente mediante el análisis con el marcador ERIC (grupos B y C) y 15% mediante el análisis con el marcador REP (grupos C y D con E), con respecto a la cepa control *X. albilineans* de Cenicaña, Colombia.

Discusión

Los aislados LMV02 y LMV08 crecidos en los medios D5 y YSP mostraron diferencias en la velocidad de crecimiento y las características morfológicas, tales como variación en la intensidad del pigmento amarillo y mucosidad de las colonias. Este resultado corrobora lo reportado por Birch (2001) y por Silva *et al.* (2005) con respecto a la gran variabilidad genética incluso a nivel de especie, como una característica importante del género *Xanthomonas*.

Una vez realizada la tinción Gram, las pruebas básicas que permiten diferenciar *X. albilineans* del resto de las bacterias pertenecientes al género son actividad catalasa, actividad oxidasa, utilización de lactosa y glucosa e hidrólisis de esulina. Los resultados obtenidos con estas pruebas permitieron separar los aislados LMV02 y LMV08 del resto de los aislados e identificarlos tentativamente como *X. albilineans*, basándonos en la similitud del perfil bioquímico con el de la cepa control donada por Cenicaña.

De manera similar, el análisis morfológico y bioquímico realizado a los aislados LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07 y LMV09 permitió separarlos, ya que difieren en la mayoría de las pruebas con respecto a la cepa control de *X. albilineans*, y por lo tanto no se puede considerar que pertenezcan a esta especie, aunque pueden ser miembros del género *Xanthomonas*.

Aunque los métodos bioquímicos siguen siendo herramientas esenciales al momento de identificar un microorganismo, el rápido avance de la tecnología y la alta sensibilidad de las pruebas basadas en el ADN están desplazando a la mayoría de las pruebas bioquímicas (Alvarez, 2004). En este sentido se realizó la identificación de los aislados mediante PCR con iniciadores específicos y se comprobó su variabilidad genética mediante ERIC y REP-PCR.

La técnica molecular más empleada para la caracterización, identificación y diagnóstico de patógenos de animales y plantas es la PCR. Para llevar a cabo esta técnica con éxito es necesario obtener un material genético libre de contaminantes proteicos y mantenerlo estable para evitar su degradación. Es por ello que en este estudio se extrajo el ADN de los aislados bacterianos por el método de Gomes *et al.* (2000), el cual fue reportado por Alvez *et al.* (2011) como el método más eficiente, con el cual se obtiene un material genético de calidad y con una pureza que permite llevar a cabo los análisis por PCR.

Una de las aproximaciones más empleada para identificación y diagnóstico de procariontes es la amplificación por PCR del gen del ARN ribosomal 16S. Dicho gen está muy conservado, ya que codifica para la subunidad menor de los ribosomas, lo que permite comprobar la calidad del ADN extraído y verificar que se trata de material genético de procariontes (Figura 1a). Con este resultado es posible asegurar además que los extractos de ADN no contienen inhibidores de la reacción de PCR y se puede proceder a la identificación con iniciadores específicos y a la genotipificación con ERIC y REP.

Los iniciadores PGBL utilizados por Pan *et al.* (1999) para la identificación específica de *X. albilineans* generan un fragmento específico de 288

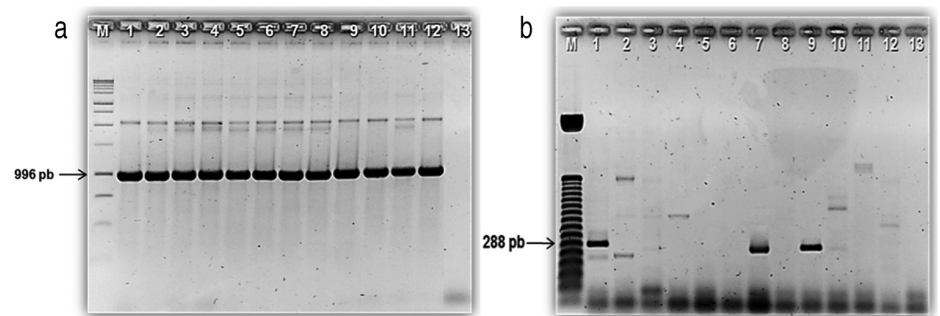


Figura 1. Registro fotográfico de electroforesis de las amplificaciones por PCR. a: iniciadores universales U1 y U2, b: iniciadores específicos PGBL1 y PGBL2. Carril M: marcador de tamaño molecular (Figura 1a: 1Kb ADN Ladder Promega, Figura 1b: 50 pb ADN Ladder Promega). Carriles 1 al 8: LMV02, LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07, LMV08, LMV09; carril 9: control positivo, *X. albilineans* CC; carriles 10, 11 y 12 controles negativos: *X. campestris*, *E. nigrifluens* y *E. Coli*; carril 13: control de reactivos.

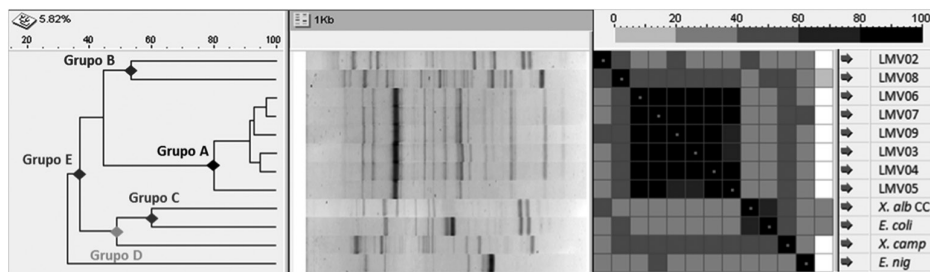


Figura 2. Dendrograma generado por el software Bionumerics 5.0, para los aislados de plantas de caña de azúcar enfermas y los controles empleados en esta investigación, analizados por ERIC-PCR. Grupo A: aislados LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07 y LMV09; Grupo B: LMV02 y LMV08; Grupo C: *X. albilineans* CC y *E. coli* CVCM 2038; Grupo D: *X. campestris* CVCM 2063 y Grupo E: *E. nigrifluens* CVCM 2000.

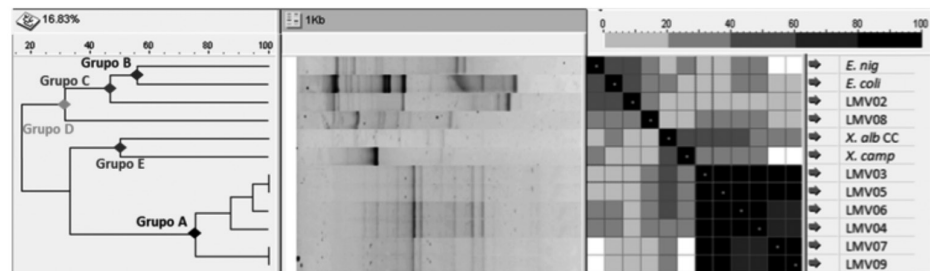


Figura 3. Dendrograma generado por el software Bionumerics 5.0, para los aislados de plantas de caña de azúcar enfermas y los controles empleados en esta investigación, analizados por REP-PCR. Grupo A: LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07 y LMV09; Grupo B: *E. nigrifluens* CVCM 2000 y *E. coli* CVCM 2038; Grupo C: LMV02; Grupo D: LMV08; Grupo E: *X. albilineans* CC y *X. campestris* CVCM 2063.

pb. Estos iniciadores fueron diseñados a partir del clonaje y secuenciación del fragmento de 360 pb, específico para *X. albilineans*, generado por los iniciadores ALA4 y L1 (Pan *et al.*, 1997). La Figura 1b muestra la banda de 288 pb para la cepa control de *X. albilineans*, así como para los aislados LMV02 y LMV08, observándose además la amplificación de bandas de diversos tamaños tanto para los otros aislados de plantas enfermas como para los controles.

Alvez *et al.* (2011) emplearon los iniciadores ALA4 y L1 (Pan *et al.*, 1997) y obtuvieron el fragmento específico de 360 pb; sin embargo, se observaron diversos productos amplificados de forma inespecífica, resultado similar a lo reportado por Arriola *et al.* (2015). Con respecto al iniciador ALA4, su secuencia se encuentra dentro de la región espaciadora entre los tRNAs, por lo que generaría productos de PCR únicos para esta bacteria, mientras que el iniciador L1 presenta una secuencia que es la más conservada del gen 23S, seguida por la secuencia del espaciador. Tal secuencia se obtuvo por la compilación de cinco secuencias del gen 23S de bacterias fitopatógenas y de cuatro secuencias de cloroplastos de plantas. Pan *et al.* (1997) plantearon el uso combinado de los iniciadores ALA4 y L1, estrategia que

permitió observar un patrón característico para la identificación de *X. albilineans*, al amplificar una banda de 360 pb específica para esta bacteria, en conjunto con fragmentos de diferentes tamaños. Observando los inconvenientes generados por los iniciadores ALA4 y L1 debido al polimorfismo encontrado entre las mismas cepas de *X. albilineans*, estos mismos autores (Pan *et al.*, 1999) diseñan a partir del clonaje y secuenciación del fragmento de 360 pb específico para *X. albilineans*, los iniciadores PGBL1 y PGBL2. A pesar de las amplificaciones inespecíficas generadas por los iniciadores ALA4 y L1, debido a su carácter universal, el producto de 360 pb indica que se trata de *X. albilineans* (Arriola *et al.*, 2015). Así mismo en la presente investigación, las pocas amplificaciones inespecíficas encontradas en algunos de los aislados nos permiten asegurar que los aislados LMV02 y LMV08 pertenecen a la especie *X. albilineans*, ya que estos amplificaron el fragmento específico de 288 pb con los iniciadores PGBL1 y PGBL2, igual a la cepa control, y no presentaron amplificaciones inespecíficas.

Para estudiar la variabilidad genética de los aislados LMV02 y LMV08, así como del resto de los aislados y cepas control, se realizaron los análisis ERIC y REP-PCR. Estos análisis

están basados en la amplificación por PCR de secuencias repetidas y han facilitado la tipificación de diversos microorganismos, al reducir los costos y el tiempo de los análisis. La familia de las secuencias cortas repetidas intergénicas ha sido encontrada en bacterias entéricas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Estas secuencias se encuentran dispersas en el genoma, y hoy día se sabe que están en diversas especies bacterianas. Tres familias, no relacionadas a nivel de secuencia de ADN, han sido estudiadas en más detalle; la secuencia llamada 'palindrómica extragénica repetitiva' de 35 a 40 pb (REP), la secuencia de 124 a 127 pb, llamada 'consenso repetitivo intergénico enterobacterial' (ERIC) y la llamada 'elemento BOX', de 154 pb. Estas secuencias tienen el potencial para formar las estructuras conocidas como *stem-loop* ('tallo-vuelta') y pueden jugar un papel importante en la organización del genoma bacteriano. Existe la hipótesis (Rincones, 2009) que si el patógeno tiene una única distribución o arreglo de secuencias repetitivas a lo largo del genoma, entonces se pueden generar huellas digitales del genoma que lo ponen en correlación con un linaje específico.

En el presente trabajo, mediante la utilización de los marcadores ERIC y REP se generaron patrones de bandas definidas y reproducibles, y la mayoría de los aislados analizados fueron polimórficos, ya que no compartían el mismo perfil genético. Esto permitió evaluar la relación entre los aislados obtenidos y otros aislados obtenidos en los trabajos de Lopes *et al.* (2001) y de Silva *et al.* (2005). Así, los aislados LMV02 y LMV08 presentan similitud con los aislados Ad/49037 y Xa/CTC de Brasil, evaluados en el trabajo de Lopes *et al.* (2001), ya que coinciden algunas bandas. Sin embargo, estos aislados no presentan el mismo patrón de bandas en los análisis ERIC y REP. Mediante ERIC están relacionados entre sí en ~50%, mientras que con la cepa control de *X. albilineans* aislada en Colombia, el LMV02 aislado de la variedad de caña de azúcar V99245 de Yaritagua, Yaracuy, tiene una relación de 50% y el LMV08 aislado de la variedad de caña de azúcar V756 de Chivacoa, Yaracuy, tiene una relación de 30% (Figura 2). Por otro lado, mediante el análisis REP, los aislados LMV02 y LMV08 guardan una relación entre sí de 30%, mientras que con *X. albilineans* (control) se relacionan en un 15% (Figura 3). Esto es similar a lo observado por Lopes *et al.* (2001) con los aislados de Brasil, que a pesar de encontrarse en la misma zona geográfica tienen una similitud de ~50%, lo cual demuestra la

gran variabilidad genética que presenta *X. albilineans* y apoya lo reportado por diversos autores (Permaul *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1997; Matos *et al.*, 2003; Huerta *et al.*, 2009). El género *Xanthomonas* se caracteriza por tener gran variabilidad genética, y una de las especies que muestra el mayor grado de variación es *X. albilineans*. Esta es una de las razones que explican por qué esta bacteria es la que causa mayor enfermedad en cultivos de caña.

Cabe destacar que el aislado LMV02 proviene de la localidad de Yaritagua, ubicada en el municipio Peña, mientras que LMV08 proviene de la localidad de Chivacoa, en el municipio Bruzual, dos localidades del estado Yaracuy separadas por ~30km; por ello, los resultados de las pruebas bioquímicas y moleculares en conjunto con los datos de procedencia, permiten decir que se trata de aislados distintos de la misma especie, los que pudieron llegar al estado Yaracuy por distintas vías, ya sea en el material vegetal o a través de las herramientas de cultivo.

En el caso de los aislados LMV03, LMV04, LMV05, LMV06, LMV07 y LMV09, que de acuerdo con nuestros resultados no pertenecen a la especie *X. albilineans*, es posible indicar según los resultados de la genotipificación que están clonalmente relacionados, pudiendo tratarse del mismo microorganismo, el cual se ha diseminado en las plantaciones de caña de azúcar, tanto en la localidad de Chivacoa como en la localidad de Yaritagua.

En general, de estos análisis se aprecia un mayor poder discriminatorio del marcador ERIC sobre el marcador REP, ya que la agrupación generada coincide con los resultados obtenidos con los análisis microbiológicos y con la identificación mediante PCR con iniciadores específicos. Cuando varios aislados son clasificados como genéticamente similares mediante un método de genotipificación, se puede asumir que estos derivaron recientemente de un ancestro común, a través de una cadena de eventos relacionados. Young *et al.* (2008) realizaron un análisis de hibridación ADN-ADN con 53 especies de *Xanthomonas*, que confirmó la alta variabilidad genética de este género bacteriano. En estudios similares, Galvis y Carrillo (2015), realizaron una caracterización molecular con los marcadores MB1 y BOX-PCR, encontrando variaciones en la estructura del genoma entre aislados de *Burkholderia glumae*, evidenciando que existen diversos genotipos en las dos zonas de Colombia analizadas, Cúcuta y El Zulia. Sin embargo, estos marcadores permitieron la agrupación de los aislados de

acuerdo a su distribución geográfica, observándose que los aislados provenientes de El Zulia se organizaron en grupos, mostrando relación entre ellos. Bravo *et al.* (2010), quienes encontraron una alta variabilidad genética en los aislamientos recolectados en Colombia, observaron que los grupos obtenidos lograron correlacionarse con la procedencia geográfica de los mismos. Karki *et al.* (2012) detectaron variaciones genéticas en aislados de *B. glumae* empleando los marcadores BOX-PCR y ERIC-PCR, observando una relación de acuerdo a su procedencia geográfica y presencia de pigmentación.

La REP-PCR es una técnica útil para estudios de variabilidad genética en aislados de *B. thuringiensis* provenientes de diversas fuentes, ya que ofrecen múltiples ventajas, como lo son la universalidad de los cebadores, la reproducibilidad relativa de resultados, y la sencillez en el procedimiento y equipos requeridos (Katara *et al.*, 2012). En el estudio de Galvis y Moreno (2014) la REP-PCR mostró claramente distintos patrones de amplificación para todas las cepas, con pocas bandas comunes entre algunos aislados y controles; el análisis filogenético mostró un índice de similaridad bajo (18%), debido posiblemente a la alta variabilidad genética dentro de este grupo, detectada por este marcador. Lo anterior también ha sido reportado por diversos autores, al observar un alto grado de polimorfismos entre diferentes aislados de *B. thuringiensis*, inclusive en aislados provenientes de un mismo sitio (Katara *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Reyes e Ibarra (2005), donde caracterizaron diferentes variedades de *B. thuringiensis* mediante REP-PCR, obtuvieron una similitud del 12% entre las variedades israelensis y aizawai de *B. thuringiensis*.

Los estudios epidemiológicos en el caso de bacterias patógenas se enfocan en identificar el posible origen común de la infección, estudiando posibles fuentes y vehículos de transmisión, además de monitorear los reservorios de dichos microorganismos. Es necesario contar con métodos altamente confiables, que permitan tipificar y discernir entre aislados y poder señalar a la fuente y a la vía responsable de la infección en estudio, al analizar la relación clonal entre ellos (Chalbaud *et al.*, 2012). Esta es la primera vez que en Venezuela se realiza una genotipificación de aislados de *X. albilineans* y se identificaron dos cepas de la bacteria en dos localidades distintas del estado Yaracuy, causantes de la escaldadura foliar de la caña de azúcar, lo cual es un aporte de importancia para dilucidar la procedencia de las cepas venezolanas y comprender mejor la epidemiología de la

enfermedad. Estas cepas pueden ser usadas en estudios de patogenicidad para discernir entre variedades venezolanas resistentes y susceptibles a la escaldadura foliar de la caña de azúcar, así como estudios de la interacción *X. albilineans*-caña de azúcar para conocer la expresión génica diferencial de plantas de caña de azúcar ante la presencia de la bacteria e identificar genes relacionados con la resistencia a la enfermedad y así avanzar en el mejoramiento de este importante cultivo. Al reforzar la importancia de implementar estrategias de control fitosanitario en el país, el presente estudio contribuirá al desarrollo de las prácticas efectivas para el control de esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen el financiamiento de los proyectos de Grupo CDCH PG03-7327-2008 (Guillermina Alonso) y PEII N° 2012001357 (Maira Oropeza).

REFERENCIAS

- Álvarez A (2004) Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339-366.
- Alvez B, Carballo J, Alonso G, Oropeza M (2011) Diagnóstico molecular de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en Venezuela, agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar. *Agron. Trop.* 61: 27-36.
- Arriola B, Liotta D, Padovan C, Quiroga M (2015) Evaluation of two protocols developed for *Xanthomonas albilineans* molecular detection in sugarcane. *Int. J. Agric. Forest. Fish.* 3: 12-16.
- Birch R (2001) *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant. Pathol.* 2: 1-11.
- Bravo D, Fory P, Aricapa G, Prado G, Torres E, Mosquera G (2010) Caracterización molecular y patogénica de *Burkholderia glumae* causante del añublo bacterial de la panícula del arroz, en Colombia. Conferencia Internacional de Arroz para América Latina y el Caribe, Cali, Colombia. Memorias Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), International Rice Research Institute (IRRI); Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego (FLAR), Cali, Colombia. 1 p.
- Chalbaud A, Redondo C, Fernandez S, Pino Z, Alonso G (2012) Genotipificación bacteriana y epidemiología molecular de las infecciones bacterianas. *Mem. Inst. Biol. Exp.* 6: 41-44.
- Davis M, Rott P, Warmuth C, Chatenet M, Baudin P (1997) Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 87: 316-324.
- Díaz G, Ferrán J (2003) Fundamentos y técnicas de análisis microbiológico. Protocolos de pruebas de identificación bacteriana. Laboratorio de Diagnóstico Clínico. 2° curso (2003-2004). San Fernando de Henares, España. 9 pp.

- Dye D (1962) The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *N. Zeal. J. Sci.* 5: 393-416.
- Galvis F, Carrillo M (2015) Identificación y caracterización molecular de aislados de *Burkholderia glumae*, agente causante del añublo bacterial en el cultivo de arroz. *Inf. Tecnol.* 26: 33-40.
- Galvis F, Moreno L (2014) Caracterización molecular mediante rep-PCR de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*, obtenidos de muestras de suelo. *Agron. Costarric.* 38: 223-229.
- Gomes L, Roncato M, Andriano F, Almeida F (2000) A simple method for ADN isolation from *Xanthomonas* spp. *Sci. Agric.* 57: 553-555.
- Graham J, Hartung J, Stall R, Chase A (1990) Pathological, restriction fragment length polymorphism, and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts. *Phytopathol.* 80: 829-836.
- Hoy J, Grisham M (1994) Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana. *Plant Dis.* 78: 1083-1087.
- Huerta, M, Cárdenas E, Rojas R, López J, Reyes D, Bautista J, Romero O (2009) Oclusión de haces vasculares para evaluar resistencia de caña de azúcar a *Xanthomonas albilineans*. *Interciencia* 34: 247-251.
- Jansen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K (1996) Evaluation of the ADN fingerprinting methods AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiol.* 142: 1881-1893.
- Jiménez O, Contreras N (2008) Detección de *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar usando la técnica de ELISA y medios selectivos. *Bioagro* 20: 209-213.
- Jiménez O, Contreras N, Nass H (2004) *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en los estados Lara y Yaracuy. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 21: 231-243.
- Kado C, Heskett M (1970) Selective media isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- Karki H, Shrestha B, Han J, Groth D, Barphagha I, Rush M, et al. (2012) Diversities in virulence, antifungal activity, pigmentation and DNA fingerprint among strains of *Burkholderia glumae*. *PLoS ONE* 7:e45376.
- Katara J, Deshmukh R, Singh N, Kaur S (2012) Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58: 83-94.
- Lopes S, Damann K, Grelen L (2001) *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on Rep-PCR fingerprint. *Curr. Microbiol.* 42: 155-159.
- Lu J, Perng C, Lee S, Wan C (2000) Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2076-2080.
- Martín D, Pazos V, Peralta E (2000) Detección de infecciones latentes de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en plántulas de caña de azúcar en Cuba. *Rev. Prot. Veg.* 15: 123-130.
- Matos M, Peralta E, Pérez J, Cortegaza L, Santana O, China A, Carvajal O (2003) Evaluación de la presencia de los serovares I y III de *Xanthomonas albilineans* en plantas procedentes de áreas comerciales y vitroplantas de caña de azúcar. *Rev. Prot. Veg.* 18: 159-161.
- Ordosgoitti A, Manzano A, Piñero A (1976) La escaldadura de la caña de azúcar en Venezuela. *Agron. Trop.* 27: 235-249.
- Palleroni N, Bradbury J (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 606-609.
- Pan Y, Grisham M, Burner D (1997) A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 81: 189-194.
- Pan Y, Grisham M, Burner D, Legendre B, Wei Q (1999) Development of Polymerase Chain Reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scalds disease. *Plant Dis.* 83: 218-222.
- Permaul K, Pillay D, Pillay B (1996) Random amplified polymorphic ADN (RAPD) analysis shows intraspecies differences among *Xanthomonas albilineans* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 307-311.
- Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Couloux A, y col. (2012) Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics* 13: 658-681.
- Rademaker J, Louws F, De Brujin F (1997) Characterization of diversity of ecologically important microbes by REP-PCR genomic fingerprinting. En *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer. Dordrecht, Holanda. pp. 1-26.
- Reyes A, Ibarra J (2005) Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* Group-Specific Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1346-1355.
- Ricaud C, Ryan C (1989) Leaf scald. En Ricaud C, Egan BT, Gillaspie AG Jr, Hughes CG (Eds.) *Diseases of sugarcane. Major diseases*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 39-58.
- Rincones L (2009) *Detección y Caracterización Molecular de Xanthomonas campestris Pv phaseoli y Xanthomonas Campestris Pv phaseoli Variedad Fuscans Patógenos en Frijol (Phaseolus Sp. L.), mediante Análisis de Secuencias Consenso Intergénicas Repetidas Enterobacteriales (ERIC) y Secuencias en Mosaico del Elemento Box (BOX)*. Tesis. Universidad Nacional. Colombia. 81 pp.
- Rott P (1995) Leaf scald of sugarcane. *Agriculture and Development*; CIRAD-CA. pp. 51-58.
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EEUU. 1500 pp.
- Schaad N, Jones J, Chun W (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3ª ed. American Phytopathological Society. Minnesota, EEUU. 350 págs.
- Silva M, Bedendo I, Casagrande M (2005) Caracterização molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson agente causal escaldadura da cana de açúcar. *Summa Phytopathol.* 33: 341-347.
- Simoes T, Goncalves E, Rosato Y, Mehta A (2007) Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpfB* and *atpD* genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 271: 33-39.
- Tampakaki A, Hatziloukas E, Panopoulos N (2009) Plant Pathogens, Bacterial. *Pathogenesis* 18: 655-677.
- Van den Mooter M, Swings J (1990) Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 348-369.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski J (1991) Distribution of repetitive ADN sequence in eubacterias and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Ac. Res.* 19: 6823-6831.
- Vilchez G, Alonso G (2009) Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 29: 6-12.
- Yang P, Rott P, Vauterin L, Hoste B, Baudin P, Kersters K, Swings J (1993) Intraspecific variability of *Xanthomonas albilineans*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 420-426.
- Young J, Park D, Shearman H, Fargier E (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. App. Microbiol.* 31: 366-377.
- Zardón M, Gallo A, Mesa J, Arencibia A, Zamora L, Martínez Y, Sautié M, Casas MA, La O ML (2012) Detección de infecciones mixtas en genotipos de caña de azúcar en Cuba. *Rev. Prot. Veg.* 2: 77-84.

GENOTYPING AND BIOCHEMICAL PROFILE OF *Xanthomonas albilineans* ISOLATES IN VENEZUELA

Beatriz Alvez, Guillermina Alonso and Maira Oropeza

SUMMARY

Xanthomonas albilineans, the causal agent of leaf scald in sugarcane, is characterized by a great variability in its cellular morphology, biochemical and genetic profiles, which are key characteristics in its identification. To achieve the early diagnosis of this disease and to avoid losses of great magnitude, identification protocols should be established for the plant pathogen and its genetic diversity must be assessed. This paper aims to characterize isolated Venezuelan *X. albilineans* strains by microbiological, biochemical and molecular tests. Bacteria isolated from sugarcane plants cultivars V756, V781 and V99245 with leaf scald symptoms were subjected to differential growth on selective media, Gram staining, hydrolisis of starch, esculin

and gelatin and, catalase and oxidase activity. In addition, molecular analysis was performed using DNA amplification with specific primers, as well as ERIC-PCR and REP-PCR analysis. The differential growth and biochemical profiles of Venezuelan isolates LMV08 and LMV02 match the *X. albilineans* control strain. DNA amplification with specific primers yielded the 288 bp specific band but other bands were obtained as well. With the analysis of dendrograms obtained with ERIC-PCR and REP-PCR, we observed that the isolates have a similitude of 50 and 30%, respectively. The diagnostic strategy employed corroborated the identity of LMV08 and LMV02 as *X. albilineans*, and also assessed their genetic relationship.

GENOTIPIFICAÇÃO E PERFIL BIOQUÍMICO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas albilineans* NA VENEZUELA

Beatriz Alvez, Guillermina Alonso e Maira Oropeza

RESUMO

A bactéria *Xanthomonas albilineans* é o agente causal da escaldadura das folhas da cana-de-açúcar, e se caracteriza por apresentar grande variabilidade na sua morfologia celular, perfil bioquímico e perfil genético, características chave para sua identificação. Para diagnosticar de forma precoce a afecção e evitar perdas de grande magnitude, devem estabelecer-se protocolos de identificação do fitopatógeno e avaliar o grau de diversidade genética. Neste trabalho se pretende caracterizar isolados venezuelanos de *X. albilineans* mediante provas microbiológicas, bioquímicas e moleculares. Para isto foram isoladas bactérias de plantas de cana-de-açúcar nas variedades V756, V781 e V99245 com sintomas de escaldadura foliar e se submeteram a crescimento diferencial em meios seletivos, colora-

ção de Gram, hidrólise de esculina, amido e gelatina, atividade catalase e oxidase. Além disso, se realizou a análise molecular mediante amplificação do DNA com iniciadores específicos e análise ERIC-PCR e REP-PCR. O crescimento diferencial e os perfis bioquímicos dos isolados venezuelanos LMV02 e LMV08 coincidem com a cepa de referência de *X. albilineans*. A amplificação do DNA com iniciadores específicos permitiu obter a banda específica de 288 pb, embora também foram obtidas outras bandas. Com a análise dos dendrogramas obtidos com ERIC-PCR e REP-PCR se observou que os isolados apresentam uma semelhança de 50 e 30%, respectivamente. A estratégia de diagnóstico empregada permitiu corroborar a identidade dos isolados LM.