

Informe final* del Proyecto JC004
Elaboración de la base de datos de la colección de cepas de bacterias fitopatógenas de la
Dirección General de Sanidad Vegetal

Responsable: Biól. Bárbara Hernández Macías
Institución: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
Dirección General de Sanidad Vegetal
Dirección: Guillermo Pérez Valenzuela No. 127, Col. Del Carmen, Coyoacán, México,
D. F. C.P. 04100
Correo electrónico: barbara.hernandez@senasica.gob.mx
Teléfono/Fax: (55) 50 90 30 00 Ext. 51333
Fecha de inicio: Agosto 15, 2014.
Fecha de término: Agosto 22, 2017.
Principales resultados: Bases de datos, fotografías, informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Hernández Macías B. 2017. Elaboración de la base de datos de la colección de cepas de bacterias fitopatógenas de la Dirección General de Sanidad Vegetal. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. **Informe final SNIB-CONABIO, Proyecto No. JC004.** Ciudad de México.

Resumen:

El Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), tiene la misión de preservar la sanidad vegetal de nuestro país. Para el área de diagnóstico, el centro cuenta con laboratorios especializados, entre los cuales se encuentra el laboratorio de Bacteriología

La Colección Bacteriológica de la Dirección General de Sanidad Vegetal (CNRF-B-DGSV), se encuentra en estado inicial, por su importancia biológica y económica, las cepas que se tienen se han aislado de material vegetal de importación, así como recientemente de material nacional, son de importancia para la agricultura, por ser consideradas como plagas.

Por su distribución y presencia en el territorio se les conoce como plagas de importancia económica, cuando no están presente en país se les nombra como plaga cuarentenada, siendo esta última la de mayor relevancia por el costo económico y como contaminante biológico. El aumento del intercambio de productos con otros países y la actividad turística, favorecen la posible entrada de plagas cuarentenadas, por consiguiente, es importante tener información relacionada con la biología, distribución, hospedantes, además de tener ejemplares debidamente identificados que sirvan como material de referencia o como consulta para los investigadores.

La CNRF-B-DGSV cuenta con 25 cepas, de diverso origen.

La forma de preservación de la colección es a través del uso de agua destilada estéril a temperatura ambiente, agua destilada estéril a 4°C y en medio de cultivo con aceite mineral.

Con la intención de contribuir al conocimiento cada vez más preciso de las bacterias que afectan a los vegetales, sus productos y subproductos, la Dirección General de Sanidad Vegetal-SAGARPA, ha fijado las bases para establecer un Sistema de Diagnóstico Fitosanitario, cuyas acciones básicas es la caracterización de bacterias fitopatógenas y de aquí la importancia de una Colección de Cepas Bacterianas organizada para permitir un eficiente sistema de consulta.

De ahí la importancia de crear una base de datos adecuada para facilitar la ubicación exacta de cada ejemplar y la información básica y esencial para corroboraciones posteriores de bacterias fitopatógenas.

Para el desarrollo de la base de datos de la Colección Bacteriológica de la DGSV, por el número de ejemplares que la integran, el proyecto se desarrollara en cuatro etapas, Acervo de la Colección

La colección cuenta hasta el momento con un total de 25 cepas bacterianas. La colección está enfocada principalmente a bacterias de importancia cuarentenaria y económica de origen nacional e internacional

La Colección está compuesta por los siguientes géneros de importancias agrícola:

Clavibacter

Curtobacterium

Dickeya

Pantoea

Pseudomonas

Ralstonia

Stenotrophomonas

Xanthomonas

- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
- ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

CUARTO INFORME DEL PROYECTO JC004

**“ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS DE LA
COLECCIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS
FITOPATÓGENAS DE LA DIRECCIÓN GENERAL
DE SANIDAD VEGETAL”**

CUARTO INFORME DEL PROYECTO JC004

“ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS DE LA COLECCIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL” (CNRFB-DGSV)

INSTITUCIÓN: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA),
Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV),
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRFB),
Laboratorio de Bacteriología

DIRECCIÓN: Km. 37.5, Carretera Federal México-Pachuca, Tecámac, Edo. de México.
CP 55740

RESPONSABLE: Biol. Bárbara Hernández Macías

TELÉFONO: (55) 59051000 ext. 51314 y 51333

CORREO ELECTRÓNICO: barbara.hernandez@senasica.gob.mx

FECHA DE INICIO: 15 de junio del 2016

FECHA DE TÉRMINO: 31 de diciembre del 2016

ELABORARON: Biol. Blanca Lorena Peña García.
Biol. Ana Abigail Vega Aragón.

CURADORA: M. en C. María de Lourdes Rodríguez Mejía.

RESUMEN

El Proyecto JC004 correspondiente a la digitalización de la información de la Colección de cepas de Bacterias fitopatógenas, perteneciente al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRFB-DGSV) del SENASICA, concluye con este último y cuarto informe. En el cual se cumple con los objetivos propuestos, entre ellos el registro digital de la información correspondiente a cada una de las cepas bacterianas, por lo que actualmente se cuenta con el registro y la captura total de **ciento cincuenta y cuatro registros** correspondientes a ocho familias, diecinueve géneros y cuarenta y ocho especies de bacterias, de los cuales **ciento cuarenta y tres registros corresponden a bacterias fitopatógenas**. Para la identificación de los ejemplares se utilizaron las diferentes metodologías estandarizadas y empleadas en el Laboratorio de Bacteriología del CNRF como lo son: la activación y siembra de las cepas en medios de cultivo artificiales, el aislamiento a partir de material infectado, la purificación de las cepas, pruebas de patogenicidad, pruebas bioquímicas, y la prueba serológica ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), pruebas moleculares PCR (Polymerase Chain Reaction) y en algunos casos la secuenciación y el análisis bioinformático de las secuencias amplificadas de ADN(Ácido Dexosiribonucleico) de las bacterias analizadas. Dichas técnicas fueron suficientes para la identificación de la mayoría de los ejemplares a nivel de especie.

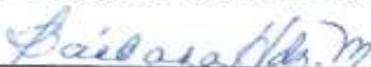
En la actualidad las cepas de la colección se encuentran identificadas, etiquetadas y preservadas por diferentes métodos aprobados por la World Federation for Culture Collections (WFCC) y por técnicas sugeridas en la literatura consultada.

En cuanto a la captura de imágenes, la base de datos concluye con un total de cincuenta y cuatro imágenes, correspondientes a la morfología colonial bacteriana de las diferentes especies presentes en la base de datos.

PALABRAS CLAVE

Colección, bacteriología, Sanidad Vegetal, bacterias, cepa, cultivos agrícolas, bioquímicas, anticuerpos, ADN, ELISA, PCR, liofilización, secuenciación.

RESPONSABLE DEL PROYECTO



Biol. Bárbara Hernández Macías
Coordinadora del Laboratorio de Bacteriología

INTRODUCCIÓN

El CNRF realiza las actividades de diagnóstico y referencia con oportunidad, transparencia y sustento científico, tiene como misión servir de referencia en la detección de plagas vegetales de manera oportuna, preservando la sanidad vegetal del país. Dentro de los principales fitopatógenos que afectan los cultivos se encuentran las bacterias, las cuales están distribuidas en todas las regiones agrícolas del mundo. Estos microorganismos atacan árboles, plantas, flores, frutos, semillas, etc., y se diseminan a través de material propagativo.

Con la finalidad de proporcionar un diagnóstico eficaz y confiable, el Laboratorio de Bacteriología cuenta con distintas técnicas de caracterización de cepas bacterianas aisladas de diversos cultivos nacionales e internacionales, sin embargo, no se cuenta con un registro digitalizado que permita una mejor consulta y manejo de la información biológica. Por lo que el principal objetivo de éste Proyecto es generar un registro de datos en el Sistema Nacional BIÓTICA 5.0, teniendo como base los datos correspondientes a la colección bacteriológica resguardada en el Laboratorio de Bacteriología, ya que estas cepas son de suma importancia biológica, agrícola y económica. Esta colección servirá como material de referencia y de consulta, para personal relacionado con el diagnóstico e investigadores cuyos estudios contribuyan al manejo de plagas dentro del país.

ANTECEDENTES DEL PROYECTO

La preservación de bacterias fitopatógenas es de suma importancia, ya que permite la óptima supervivencia del ejemplar por diferentes periodos de tiempo sin alterar sus características morfológicas y biológicas (Fahy, Persley y South, 1983) de ahí surge la necesidad de contar con un cepario que sirva como material de referencia, para un adecuado diagnóstico de bacterias fitopatógenas de importancia económica y cuarentenaria, que pudieran estar presentes en el país, o que representen un riesgo de introducción a través de material vegetal importado de otros países. Por consiguiente el Laboratorio de Bacteriología, además de sus actividades de diagnóstico, se ha dado a la tarea de crear un cepario con aislamientos obtenidos de diferentes cultivos nacionales, y de material de importación.

OBJETIVOS

El objetivo primordial de la colección es crear un banco de información, que sirva de apoyo para la referencia de bacterias fitopatógenas que afectan a la agricultura,

además pretende almacenar información sobre los hospedantes y la distribución de las especies.

- Establecer la base de datos computarizada de los ejemplares depositados en la colección.
- Digitalización de imágenes de los ejemplares de importancia económica y cuarentenaria más representativos para la sanidad vegetal.
- Contar con mayor accesibilidad a la información sobre los ejemplares de la colección.

ÁREA DE ESTUDIO

Las actividades competentes al Proyecto JC004 “ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS DE LA COLECCIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL (CNRFB-DGSV) del cuarto periodo, se han realizado en el Laboratorio de Bacteriología ubicado en la Unidad Integral de Servicios, Diagnóstico y Constatación (UISDC), localizada en el Km 37.5 de la Carretera Federal México-Pachuca, Tecámac, Estado de México.

METODOLOGÍA

Son varios los métodos empleados para la identificación de bacterias fitopatógenas que se realizan en el Laboratorio de Bacteriología, como lo es el aislamiento de las bacterias para la obtención del cultivo puro (Rodríguez, 2006) y la caracterización por pruebas bioquímicas, estas técnicas determinan los requerimientos nutrimentales y condiciones físicas del medio que favorece el desarrollo de una bacteria en particular (Schaad *et al.* 2001). Algunas de las técnicas para la identificación rápida y confiable de bacterias fitopatógenas, demuestran un mayor grado de sensibilidad y precisión, estas son las técnicas serológicas y moleculares, pero no se debe restar importancia a las pruebas que involucran directamente la fisiología y bioquímica de las bacterias fitopatógenas (Figuroa, 2002), para ello se han realizado pruebas de patogenicidad rápidas, como la infiltración de la bacteria en tejido de hoja de tabaco dando una reacción de hipersensibilidad en el tejido inoculado y la prueba de pudrición de tejido de papa.

Algunas de las cepas fueron reclasificadas mediante el análisis de secuencias genéticas y el uso de los métodos antes mencionados, cabe mencionar que para la mayoría de los casos fue corroborada nuevamente su identidad. Una vez curadas las cepas por la M. en C. María de Lourdes Rodríguez Mejía, fueron capturadas en el sistema BIÓTICA 5.0 con sus respectivos datos (grupo biológico,

información taxonómica, hospedero, área geográfica, procedencia, número de registros, etc.).

I. Aislamiento, purificación, patogenicidad y pruebas bioquímicas

Para la reactivación de las cepas bacterianas conservadas en tubos con diferentes medios (con agua destilada estéril y caldo nutritivo), conservadas a temperatura ambiente, 4°C y -20°C (Fig. 1), se utilizó la técnica por estría cruzada y de vaciado de placa en medios de cultivo artificiales (Fig. 2), posteriormente se hizo la resiembra para obtener cultivos puros en medios selectivos y específicos (Fig.3) para cada género.

Consecutivamente se realizaron pruebas de patogenicidad (hipersensibilidad en tabaco y pudrición de tejido de papa) que indican si la bacteria es fitopatógena, es decir, si aún conserva sus genes de patogenicidad (Fig. 4). Estas pruebas deben realizarse previamente al análisis bioquímico de cada cepa.

Para caracterizar las colonias puras se realizaron pruebas bioquímicas tradicionales ver Fig. 5 (Rodríguez 2006, Schaad *et al.* 2001 y T. Goszczynska *et al.* 2000) y también se procesaron por el Sistema Internacional BIOLOG (GEN III MicroPlate). El cual es un sistema de identificación microbiana muy usado para la determinación rápida de especies bacterianas Gram-negativas y Gram-positivas, así como de hongos y levaduras. Para ello la cepa se incubó en una placa sensibilizada con 94 sustratos químicos, dando una reacción de color, la cual es evaluada visualmente a las 24 horas (Fig.6), los resultados se capturan y son analizados por un software, permitiendo obtener información correspondiente al metabolismo y fisiología de cada una de las bacterias fitopatógenas analizadas, teniendo un resultado aproximado de la identidad de la bacteria.

II. Técnica serológica ELISA para la identificación de algunas especies

La técnica ELISA (Ensayo de inmunoadsorción con anticuerpos ligados a una enzima) es un inmunoensayo basado en la reacción antígeno – anticuerpo, en la cual el antígeno es en este caso la bacteria fitopatógena que se detecta mediante un juego de antisueros, empleando placas de poliestireno para llevar a cabo el procedimiento, en donde por lo general se adsorbe un primer anticuerpo para capturar la bacteria, agregando posteriormente un segundo anticuerpo conjugado a una enzima, que es capaz de detectar el patógeno y generar un producto, obteniendo una reacción de color, considerándose positiva cuando está presente la bacteria (anticuerpo + antígeno + anticuerpo-enzima + sustrato = color), la evaluación de la reacción de color es mediante un espectrofotómetro o lector de

placas de ELISA, obteniendo valores de absorbancia para emitir un resultado cuantitativo y cualitativo (Cruz y Frías, 1997) (Fig. 7 A y B). Para el análisis de las cepas se emplearon juegos de antisueros producidos comercialmente para cada género y/o especie.

Cuadro 1. Lista de juegos o kits de antisueros empleados en la identificación de las cepas.

Acronimo	Nombre de la bacteria	Compañía y número de catálogo del Kit
<i>Aac</i>	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> .	Adgia SRA14800
<i>Bg</i>	<i>Burkholderia glumae</i>	Agdia BRA 62100
<i>Dchy</i>	<i>Dickeya chrysanthemi</i> (<i>Erwinia chrysanthemi</i>)	Adgen phytodiagnosics 1080
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Adgia SRA44000
<i>Cmn</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Adgen phytodiagnosics 1236
<i>Cff</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Adgen phytodiagnosics 1178
<i>Pstw</i>	<i>Pantoea stewartii</i> .	Adgia 52000
<i>Pcar</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> .	Agdia PBK90500
<i>Pss</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Adgen 1089
<i>Rs</i>	<i>Ralstonia solanaceum</i>	Agdia SRP 33900
<i>Xan</i>	<i>Xanthomonas</i>	Agdia BRA14600
<i>Xaph</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Agdia SRA 36101
<i>Xfr</i>	<i>Xanthomonas fragariae</i>	Adgen phytodiagnosics 1100
<i>Xv</i>	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Adgen phytodiagnosics 1099
<i>Xf</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	Kit LOEWE 071195

III. Técnicas moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento particular de ADN (Ácido Desoxirribonucleico), partiendo de una cantidad mínima de éste. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las polimerasas del ADN para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí, tras cada fase de replicación, y a continuación, dejar que vuelvan a unirse a las polimerasas para duplicarlas (Fig. 8 A y B).

En forma general los pasos a seguir en el procedimiento son los siguientes:

- **Extracción** de ADN por lisis con Buffer CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) de todas las cepas (Doly & Doly 1987 y Tapia & Magaña, 2009).
- **Cuantificación** de ADN por espectrofotometría en Nanodrop versión 2000 (www. DNA 2015).
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** con oligonucleótidos (Mullis, 1983) para el gen 16s y primers o iniciadores específicos para cada género o especie, en caso de contar con el Protocolo estandarizado y los iniciadores. La visualización de las bandas amplificadas se realizó en geles de agarosa (Fig. 9B).
- **Secuenciación.** Una vez que se corroboró la presencia de las bandas específicas amplificadas, lo cual indica la obtención de un fragmento de ADN de la bacteria analizada, ese producto de PCR se envió a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del CNRF.
- **Filogenias y Multilocus:** en algunas de las bacterias fue posible construir las filogenias para la correcta asignación y clasificación genética de las especies, además de la amplificación de más de dos genes por género para la construcción de multilocus y análisis bioinformático.

Respecto a las filogenias y análisis bioinformático de las secuencias de algunas cepas cabe mencionar que es información reservada del SENASICA.

IV. Técnicas de preservación de cepas

La refrigeración, la congelación y la deshidratación son los métodos más empleados para la preservación de microorganismos (Fig. 9 A y B) y van a estar determinados por sus características y el tiempo de almacenaje deseado. Dependiendo del método elegido, deberán incluirse diversas sustancias en el medio artificial que favorezcan su viabilidad.

En el caso de esta colección, se decidió utilizar métodos previamente reportados en la literatura, puesto que se ha comprobado que mantienen la viabilidad de la mayoría de las cepas, escogiendo aquellos que se pudieron realizar con los reactivos y condiciones con las que se cuenta en el Laboratorio de Bacteriología.

a. Almacenaje en agua destilada

La suspensión de colonias maduras de bacterias en agua destilada a temperatura ambiente o en refrigeración a 4°C permanece viable durante meses o en algunos casos pueden vivir durante años.

A partir de un cultivo bacteriano puro y previamente identificado, en condiciones asépticas, se toma una asada bacteriana y se suspende en agua destilada, posteriormente se mezcla hasta obtener una suspensión turbia. Esta mezcla se conserva en tubos eppendorf® etiquetados y almacenados a temperatura ambiente y a 4°C (en refrigeración).

b. Congelación en suspensión

Este proceso puede dañar las células; sin embargo, muchos microorganismos son muy resistentes, mientras que otros son más sensibles como las bacterias que requieren de agentes protectores como el glicerol o el dimetilsulfoxido (DMSO) para prevenir el daño intracelular.

A partir de un cultivo puro y previamente caracterizado, en condiciones asépticas, con una asa bacteriológica se toma una gota de la suspensión bacteriana y se resuspende en medio LB (Luria Bertani) y/o en caldo nutritivo, posteriormente se mezcla hasta obtener una suspensión turbia e inmediatamente se agrega glicerol previamente esterilizado y nuevamente se mezcla por vortex. Esta suspensión se conserva en tubos eppendorf ® etiquetados y se almacenan a -20°C (en congelador), -40°C y/o -80°C (ultracongelador).

c. Preservación por liofilización

Liofilización es la deshidratación de un microorganismo por sublimación, es decir, la desecación del producto congelado mediante alto vacío. Es un magnifico procedimiento para conservar productos biológicos como bacterias durante largos periodos de tiempo, sin pérdida de viabilidad y características morfológicas y genéticas.

En condiciones asépticas y partiendo de una cepa pura, se toma una asada del cultivo bacteriano, se suspende en medio de sucrosa-peptona al 7%, se deja sedimentar la mezcla y se decanta. El pellet obtenido es transferido a un tubo de ensayo con leche baja en grasa disuelta en agua al 10%, se mezcla por pipeteo se transfiere a una ampolleta especial, una vez listas todas las ampolletas se colocan en el dispositivo de la liofilizadora, para que se lleve a cabo el proceso de liofilización, al término de éste se desmontan las ampolletas y se sellan con calor. (Fig. 10 y Fig. 11 A y B).

RESULTADOS

La cuarta y última fase del Proyecto tuvo su inicio el día 15 de junio del 2016 y concluyó el 31 de diciembre del 2016. La bitácora de las actividades desarrolladas durante los dos años del Proyecto JC004 se muestra en el Anexo I. Dentro de este periodo se continuó con la activación, caracterización, identificación y aislamiento de ejemplares de reciente detección, las cepas se analizaron empleando cada una de las metodologías antes descritas (Fig. 12 A y B), también se llevó a cabo la preservación de las bacterias en diferentes condiciones (caldo nutritivo, agua estéril y medio LB) y diferentes temperaturas de almacenaje. Se terminó el proceso de liofilización de los géneros de las cepas faltantes, con lo cual se cumple con el 100% de lo comprometido (Anexo II).

Imágenes de algunos ejemplos de las técnicas empleadas en la identificación y curación de las cepas bacterianas

I. Reactivación, aislamiento y purificación de las cepas bacterianas.



Figura 1. Cepas bacterianas conservadas en agua para su posterior caracterización y curación.



Figura 2. Siembra por estría cruzada en medios de cultivo artificiales.

III. Siembra en diferentes medios de cultivo.



Figura 3. Cepas bacterianas pertenecientes a diferentes géneros desarrollados en medios de cultivos artificiales semiselectivos y listas para ser analizadas bioquímicamente.

IV. Pruebas de patogenicidad.



Figura 4. Pruebas de patogenicidad: **A)** Hipersensibilidad en tabaco. **B)** Pudrición de tejido de tubérculo de papa.

V. Pruebas bioquímicas tradicionales.



Figura 5. Suspensiones bacterianas y pruebas bioquímicas tradicionales para la caracterización metabólica de cada especie.

VI. Caracterización bioquímica por el sistema BIOLOG.

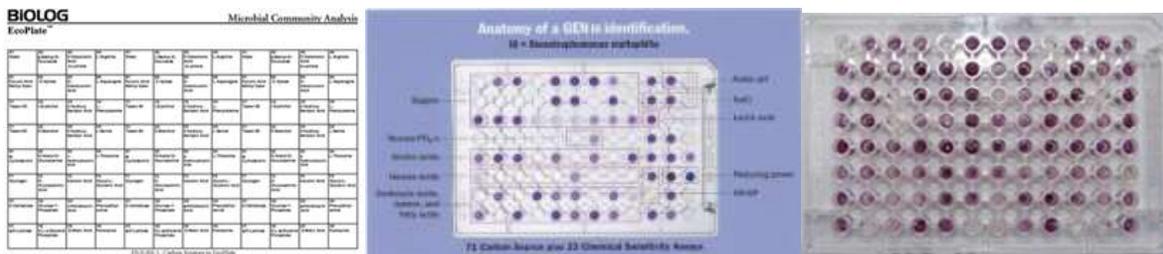


Figura 6. Sistema BIOLOG para análisis bioquímico de las cepas bacterianas, reacción de color en la placa sensibilizada, que indica la utilización de los diferentes sustratos químicos.

VII. Técnica serológica ELISA.

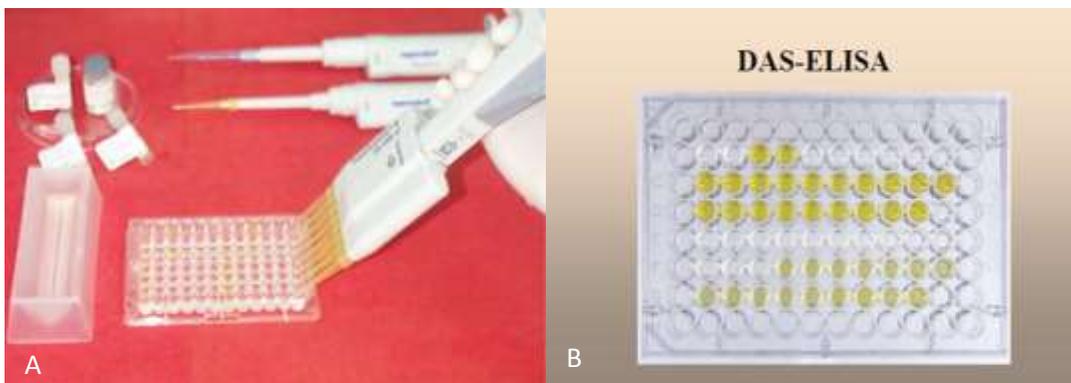


Figura 7. Técnica de ELISA: Material (A) (Juego de antisueros, soluciones amortiguadoras placa de poliestireno, micropipetas, puntas) y (B) resultados de un ensayo, placa con las cepas evaluadas mostrando reacción de color (positiva) confirmando la identidad de las cepas analizadas.

VIII. Técnicas moleculares.



Figura 8. Técnica de PCR. A) Preparación de reacción, termociclador, B) carga de geles y visualización de fragmentos de ADN amplificado en gel de agarosa.

IX. Métodos de preservación de los ejemplares y etiquetado.



Figura 9. A) Preservación de ejemplares en diferentes medios líquidos y temperaturas: en agua destilada estéril, LB/glicerol y caldo nutritivo/glicerol a temperatura ambiente, 4°C, -20°C, -40°C y -80°C. B) Ejemplares liofilizados.



Figura 10. Procedimiento de liofilización: soluciones crioprotectoras, ampolletas en preparación, Liofilizadora, ampolletas terminadas y selladas.



Figura 11. Etiquetado de ejemplares: **A)** Tubos con diferentes cepas en medio líquido, **B)** Ampolletas con las cepas liofilizadas.

X. Trabajo de laboratorio realizado por personal del proyecto.

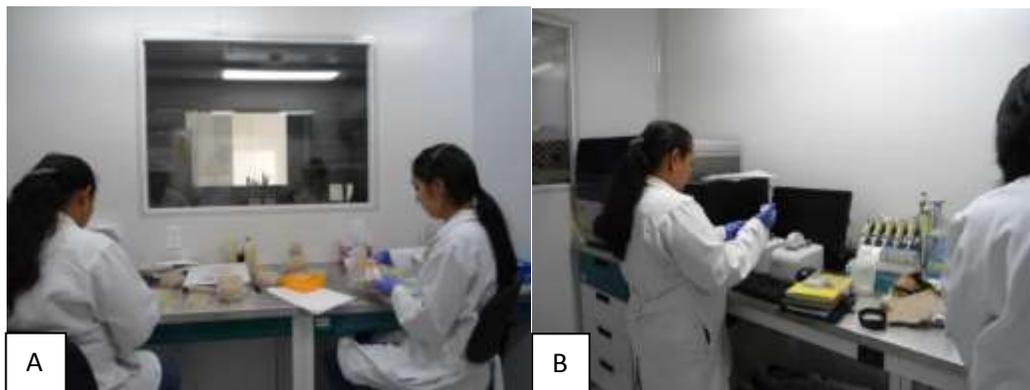


Figura 12. Trabajo de laboratorio; A) Curación de cepas, B) Análisis del ADN bacteriano

X. Digitalización. Base de Datos

Para concluir con el registro de los taxones, se capturó la información que faltaba en la base de datos del Sistema de Información BIÓTICA 5.0, para ello se digitalizaron los datos correspondientes a cada cepa, su información biológica, así como la información correspondiente al material vegetal del cual se aislaron, datos que en su mayoría se encuentran también registrados en la base de datos del Sistema Nacional de Laboratorios (SINALAB) del SENASICA, es la base de los registros de todas las muestras que se reciben en los diferentes laboratorios de análisis que pertenecen al SENASICA.

La base de datos del Sistema BIOTICA 5.0 cumple con las características descritas en el instructivo para la conformación de datos taxonómico-biogeográficos, que es compatible con el Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB). Los campos obligatorios para el registro de ejemplares son los siguientes:

- **Información:** Nombre de la colección, Número de catálogo y Procedencia de la muestra.
- **Colecta/Observación:** Grupo de colecta o colector, Fecha inicial, Número de individuos (repeticiones del ejemplar con los mismos datos de la etiqueta).
- **Información geográfica:** Regiones de colecta (país, estado, municipio, localidad y coordenadas geográficas)
- **Determinación:** Grupo de determinadores, Fecha de determinación y Tipo.
- **Restricciones de uso:** Información restringida, Mes de término, Año de término y Motivos (se da una breve explicación de las condiciones de uso de la información generada durante el periodo de elaboración de la base de datos).
- **Información asociada:** Datos de la muestra, Datos para diagnóstico y procedencia de la muestra.

Por lo que la captura de la información en la base de datos se concluye con un total de ciento cincuenta y cuatro registros (Figura 13) los cuales en su mayoría cumplen con los requisitos previamente citados. Cabe mencionar que el proyecto inició con 143 cepas bacterianas fitopatógenas de importancia agrícola (Cuadro 2),

al caracterizarlas nuevamente y curarlas, se constató su patogenicidad por lo que algunas de ellas perdieron su viabilidad y tuvieron que darse de baja del cepario, sin embargo se tienen nuevas cepas supliendo los registros originales, cumpliendo con el 100% de los registros comprometidos en el convenio. También informamos que la colección inicialmente contaba con 6 ejemplares georreferenciados y actualmente se ha concluido con un total de 96 ejemplares con la información geográfica correspondiente (Cuadro 3).

The screenshot shows the 'Información de:' window in the BIOTICA 5.0 software. It displays a table of taxonomic categories and their counts, along with capture statistics and relationships between taxa.

Categoría Taxon...	Taxones	Indiv...	Registros en Eje...
Reino	1		
phylum	3		
clase	5		
subclase	1		
orden	7		
suborden	1		
familia	8		
género	19	4	4
especie	47	700	110

Número de ejemplares capturados (registros): 154

Datos de georreferenciación:

- Número de Localidades: 67
 - Ejemplares con localidad: 154
 - Ejemplares con localidad distinta de ND: 65
- Número de sitios: 97
 - Ejemplares con sitio: 154
 - Ejemplares con sitio distinto de ND: 95

Relaciones entre taxones:

- Sinónimo - 1860
- Basónimo / Nombre original - 178
- Equivalencia - 0
- Parental - 0

Tamaño de la base de datos: 9.11 MB

Figura 13. Imagen del Sistema BIÓTICA 5.0 con el número de registros capturados.

Cuadro 2. Cepas comprometidas en el Proyecto JC004 (Anexo 1 del proyecto)

Número de registros	acrónimo	Nombre científico y común de la Enfermedad
3	Br	<i>Brenneria rubrifaciens</i>
36	Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> corrig. (Smith 1910) Davis et al. 1984 Cáncro del tomate
3	Cmn	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> (Vidaver and Mandel 1974) Davis et al. 1984.
20	Cff	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>
6	Dch	<i>Dickeya chrysanthemi</i> = <i>Erwinia chrysanthemi</i>
3	Dchz	<i>Dickeya chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
1	Dp	<i>Dickeya paradisiaca</i>
4	Pswt	<i>Pantoea stewartii</i>
3	Pag	<i>Pantoea agglomerans</i>
2	Pc	<i>Pseudomonas cichorii</i>
1	PSCO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coriandricola</i>
4	PSSy	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
2	Psm	<i>Pseudomonas marginalis</i>
1	Psv	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
14	Rs-r2	<i>Ralstonia solanacearum</i> Raza 2
2	Rs-r?	<i>Ralstonia solanacearum</i> Raza 1
1	Sm	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
6	Xafr	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>
1	Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
24	Xfr	<i>Xanthomonas fragariae</i>
3	Xvm	<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>musacearum</i>
3	Xv	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
Total=143		

Cuadro 3. Nombre de las cepas bacterianas capturadas en Biótica 5.0 y número de identificación (Id).

Bacteria (Género)	Especie	Subsp./pv/Rz	Acrónimo	Id CONABIO	No. de Registro
Acidovorax	<i>citrulli</i>		Ac	61	1
	<i>citrulli</i>		Ac	64	2
	<i>citrulli</i>		Ac	5	3
	<i>sp.</i>		A	74	4
	<i>sp.</i>		A	75	5
Rhizobium	<i>radiobacter</i>		Rhra	72	6
	<i>radiobacter</i>		Rhra	70	7
	<i>rhizogenes</i>		Rhrhi	110	8
Burkholderia	<i>glumae</i>		Bglu	84	9
	<i>cepacea</i>		Bce	117	10
Brenneria	<i>rubrifaciens</i>		Brr	85	11

Bacteria (Género)	Especie	Subsp./pv/Rz	Acrónimo	Id CONABIO	No. de Registro
Clavibacter	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	37	12
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	39	13
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	40	14
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	41	15
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	42	16*
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	43	17
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	45	18
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	46	19
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	47	20
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	49	21
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	50	22
	<i>michiganensis</i>	<i>michiganensis</i>	Cmm	158	23
	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	29	24
	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	34	25
	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	38	26
	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	43	27
	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	48	28
	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	120	29
	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	121	30
	<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	135	31
<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	136	32	
<i>michiganensis</i>	<i>nebraskensis</i>	Cmn	137	33	
Curtobacterium	<i>flaccumfaciens</i>		Cff	18	34
	<i>flaccumfaciens</i>		Cff	19	35
	<i>flaccumfaciens</i>		Cff	89	36
	<i>flaccumfaciens</i>		Cff	90	37
	<i>flaccumfaciens</i>		Cff	139	38
	<i>flaccumfaciens</i>		Cff	140	39
Dickeya	<i>chrysanthemi</i>		Dchy	35	40
	<i>chrysanthemi</i>		Dchy	118	41
	<i>chrysanthemi</i>		Dchy	144	42
	<i>chrysanthemi</i>		Dchy	153	43
Erwinia	<i>amylovora</i>		Ewa	67	44
	<i>amylovora</i>		Ewa	68	45
	<i>amylovora</i>		Ewa	69	46
Gibbsiella	Sp.		Gsp	162	47
Pantoea	<i>agglomerans</i>		Pagg	14	48
	<i>agglomerans</i>		Pagg	95	49
	<i>agglomerans</i>		Pagg	99	50
	<i>agglomerans</i>		Pagg	100	51
	<i>agglomerans</i>		Pagg	105	52
	<i>agglomerans</i>		Pagg	112	53
	<i>agglomerans</i>		Pagg	146	54
	<i>ananatis</i>		Pana	73	55
	ananatis		Pana	78	56

Bacteria(Género)	especie	Subsp./pv/Rz	Acrónimo	Id CONABIO	No. de Registro
Pantoea	<i>ananatis</i>		Pana	97	57
	<i>ananatis</i>		Pana	116	58
	<i>dispersa</i>		Padi	79	59
	<i>anthophila</i>		Paanth	80	60
	<i>stewartii</i>	<i>indologenes</i>	Pstw in	76	61
	<i>stewartii</i>	<i>indologenes</i>	Pstw in	94	62
	<i>stewartii</i>	<i>indologenes</i>	Pstw in	122	63
	<i>stewartii</i>	<i>indologenes</i>	Pstw in	123	64
	<i>stewartii</i>	<i>indologenes</i>	Pstw in	124	65
	<i>stewartii</i>	<i>indologenes</i>	Pstw in	125	66
	<i>stewartii</i>	<i>indologenes</i>	Pstw in	126	67
	<i>stewartii</i>	<i>stewartii</i>	Pstw stw	98	68
	Sp.		Pstw	83	69
	Pectobacterium	<i>carotovorum</i>		Pcar	111
<i>carotovorum</i>			Pcar	152	71
Pseudomonas	<i>aeruginosa</i>		Psau	3	72
	<i>aeruginosa</i>		Psau	20	73
	<i>aeruginosa</i>		Psau	91	74
	<i>argentinensis</i>		Psarg	21	75*
	<i>argentinensis</i>		Psarg	24	76*
	<i>cichorii</i>		Psci	36	77
	<i>cichorii</i>		Psci	141	78
	<i>enthomophila</i>		Psen	8	79*
	<i>enthomophila</i>		Psen	62	80*
	<i>fluorescens</i>		Psfl	96	81
	<i>fluorescens</i>		Psfl	107	82
	<i>fluorescens</i>		Psfl	109	83
	<i>fluorescens</i>		Psfl	145	84
	<i>ludensis</i>		Pslu	9	85*
	<i>marginalis</i>		Psmar	15	86
	<i>marginalis</i>		Psmar	27	87
	<i>marginalis</i>		Psmar	28	88
	<i>palleroniana</i>		Pspall	102	89
	<i>putida</i>		Pspu	22	90*
	<i>putida</i>		Pspu	23	91*
	<i>rizosphaera</i>		Psriz	2	92*
	<i>rizosphaera</i>		Psriz	25	93*
	<i>syringae</i>		Pssyr	17	94
	<i>syringae</i>		Pssyr	86	95
	<i>syringae</i>		Pssyr	133	96
	<i>taiwanensis</i>		Pstaiw	10	97*
	<i>taiwanensis</i>		Pstaiw	11	98*
<i>taiwanensis</i>		Pstaiw	12	99*	
<i>viridiflava</i>		Psvir	157	100	

Bacteria (Género)	Especie	Subsp./pv/Rz	Acrónimo	Id CONABIO	No. de Registro
Ralstonia	<i>solanacearum</i>		Rs	1	101
	<i>solanacearum</i>		Rs	6	102
	<i>solanacearum</i>		Rs	7	103
	<i>solanacearum</i>		Rs	77	104
	<i>solanacearum</i>		Rs	119	105
	<i>solanacearum</i>		Rs	142	106
	<i>solanacearum</i>		Rs	143	107
	<i>solanacearum</i>		Rs	154	108
	<i>solanacearum</i>		Rs	155	109
	<i>solanacearum</i>		Rs	166	110
Serratia	<i>marcescens</i>		Semar	71	111
Spiroplasma	<i>citri</i>		SpCit	87	112
	<i>kunkelii</i>		Spkun	88	113
Stenotrophomonas	<i>maltophilia</i>		Strmalt	159	114
Tatumella	<i>citrea</i>		Tatcit	108	115
Xanthomonas	<i>albilineans</i>		Xalb	114	116
	<i>albilineans</i>		Xalb	128	117
	<i>albilineans</i>		Xalb	134	118
	<i>albilineans</i>		Xalb	161	119
	<i>arboricola</i>		Xarfr	30	120
	<i>arboricola</i>		Xarfr	92	121
	<i>arboricola</i>		Xar	93	122
	<i>axonopodis</i>		Xaph	32	123
	<i>axonopodis</i>		Xax	101	124
	<i>axonopodis</i>		Xax	113	125
	<i>axonopodis</i>		Xax	127	126
	<i>axonopodis</i>		Xax	129	127
	<i>axonopodis</i>		Xax	130	128
	<i>axonopodis</i>		Xax	131	129
	<i>axonopodis</i>		Xax	160	130
	<i>campestris</i>		Xc	138	131
	<i>campestris</i>		Xc	156	132
	<i>euvesicatoria</i>		Xcv	31	133
	<i>euvesicatoria</i>		Xcv	66	134
	<i>fragariae</i>		Xfr	52	135
	<i>fragariae</i>		Xfr	53	136
	<i>fragariae</i>		Xfr	54	137
	<i>fragariae</i>		Xfr	55	138
	<i>fragariae</i>		Xfr	57	139
	<i>fragariae</i>		Xfr	58	140
	<i>fragariae</i>		Xfr	59	141
	<i>fragariae</i>		Xfr	60	142
	<i>fragariae</i>		Xfr	106	143
	<i>fragariae</i>		Xfr	147	144

Bacteria (Género)	Especie	Subsp./pv/Rz	Acrónimo	Id CONABIO	Nó. de Registro
Xanthomonas	<i>fragariae</i>		Xfr	148	145
	<i>fragariae</i>		Xfr	149	146
	<i>fragariae</i>		Xfr	150	147
	<i>melonis</i>		Xme	16	148
	<i>sacchari</i>		Xsa	65	149
	<i>sacchari</i>		Xsa	104	150
	<i>translucens</i>		Xtr	51	151
	<i>translucens</i>		Xtr	56	152
	<i>translucens</i>		Xtr	115	153
Xylella	<i>Xylella</i>	<i>fastidiosa</i>	Xyff	81	154
	<i>Xylella</i>	<i>multiplex</i>	Xyfm	82	155

* Bacterias no fitopatógenas

XI. Banco de Imágenes

Las fotografías de los ejemplares fueron capturadas con un equipo digitalizado que consta de un microscopio estereoscópico Carl Zeiss ZEN, modelo Stemi 2000-C con cámara digital Mod. AxionCam ERc5S con una resolución de 5 mega píxeles, un software de Montaje Carl Zeiss ZEN 2012 lite versión Blue edition, cumpliendo con los criterios establecidos por la CONABIO según los lineamientos para la entrega de fotografías e ilustraciones digitales 2011.

Las imágenes tienen una resolución de 96 ppp y una dimensión de 2560 x 1920 píxeles.

Para esta Cuarta fase del proyecto se capturaron veinte imágenes de las cepas bacterianas representativas, mismas que fueron rotuladas de acuerdo a su nombre científico (género y especie) del ejemplar, se anexa en el archivo Excel la relación de las imágenes agregadas para dicha fase.

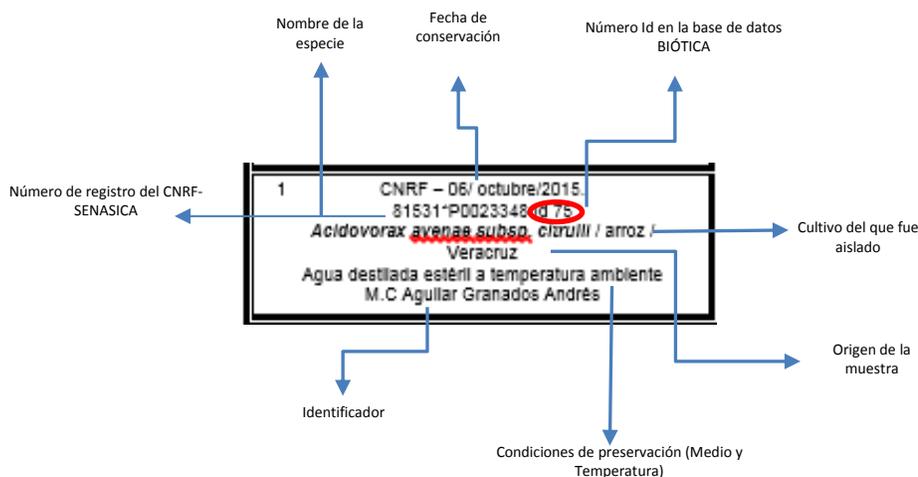
En total se asociaron cincuenta y cuatro imágenes de las cuales 27 fueron tomadas por Peña García Blanca Lorena y 27 por Vega Aragón Ana Abigail.

XII. Preservación de cepas

El último grupo de cepas analizadas y cuya información fue integrada a la base de datos, también fueron preservadas mediante las diferentes técnicas convencionales mencionadas en la metodología, realizadas en función de las

características de cada ejemplar, esto debido a que la sensibilidad o requerimientos de cada uno de estos ejemplares es diferente. Cabe recordar que estas técnicas de conservación las recomienda la WWFC, organismo que apoya el desarrollo de colecciones de cultivos de microorganismos y líneas celulares dándoles continuidad, apoyo, asistencia y asesoramiento en el establecimiento de nuevas colecciones. En base a las pruebas de preservación y activación que se han venido realizando con los diferentes aislamientos, se tiene el registro que para algunos casos resulta mejor mantenerlas a bajas temperaturas, otras prefieren la temperatura ambiente, mientras que la mayoría conservan sus características al ser liofilizadas.

Cabe mencionar que todas las cepas se encuentran etiquetadas, en donde se ilustran los datos de cada ejemplar: nombre de la especie, fecha de conservación, número de registro en la base de datos en CNRF, Id de la base de datos BIÓTICA 5.0, material vegetal del que fue aislado, origen, condiciones de conservación y nombre del identificador:



XIII. VISITA A INSTITUCIONES QUE CUENTAN CON COLECCIONES DE MICROORGANISMOS.

En cuanto a las visitas a instituciones que cuentan con colecciones de microorganismos y que fueron programadas en el convenio, se informa que se visitó la Facultad de Química de la UNAM que cuenta con un cepario que resguarda material empleado para investigación y prácticas de laboratorio, los detalles de esta visita fueron entregados en el Tercer informe.

En éste último semestre se realizó la vista al Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas

y Pecuarias) ubicado en Blvd. De la Biodiversidad No. 400, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, con la finalidad de cumplir con ésta meta y conocer la colección de microorganismos del Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos a cargo del Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay, Investigador Titular y Responsable, la información correspondiente se detalla en el Anexo no. II, con lo cual quedan cubiertas las dos visitas programadas para conocer colecciones y que fueron comprometidas dentro de las actividades del Proyecto.

En lo que se refiere a las correcciones del Tercer Informe enviadas por CONABIO, se trabajaron durante los meses correspondientes a la cuarta fase del proyecto y se enviaron junto con este informe.

CONCLUSIONES

Con éste último y cuarto informe se cumple con los objetivos propuestos en Proyecto JC004, en donde se llevaron a cabo las actividades realizadas durante el periodo comprendido por dos años, por las Biólogas Peña García Blanca Lorena y Vega Aragón Ana Abigail. Las actividades realizadas se desarrollaron en el Laboratorio de Bacteriología del CNRF y se concluyen al 100%, las cuales corresponden principalmente a la captura de la información de cada uno de los ejemplares comprometidos (143) ingresando un total de 154 registros en el Sistema Biótica 5. 0. Como se menciona en la introducción de este reporte, la base de datos se incrementó a un número superior de familias (8), géneros (19) y especies (48) respecto de las comprometidas en el Proyecto.

En cuanto a las imágenes se cumple al 100% con un total de cincuenta y cuatro, estas imágenes ejemplifican las características morfológicas que desarrollan las cepas en los diferentes medios de cultivo generales y selectivos, muy importantes para la oportuna caracterización y diagnóstico de especies fitopatógenas, por lo que este material servirá como apoyo a Instituciones dedicadas a la investigación, a los laboratorios aprobados para el diagnóstico oportuno y confiable de enfermedades fitopatógenas en México, así como a estudiantes y personas interesadas en el tema.

El acervo de la colección contaba con 143 cepas bacterianas preservadas con agua destilada estéril a temperatura ambiente y a 4°C, así como en medio de cultivo con aceite mineral a -20°C; por lo que el proyecto permitió ampliar el conocimiento en los requerimientos de cada una de las cepas, actualmente la colección de bacterias fitopatógenas del CNRF cuenta con 154 cepas, la cual se encuentra en su totalidad conservada bajo tres diferentes métodos como lo

establece la WWFC y actualmente todos los ejemplares se encuentran correctamente etiquetados lo que en un futuro facilitara el manejo y uso del cepario.

Finalmente es relevante destacar la importancia del desarrollo de proyectos y convenios establecidos entre instituciones en beneficio del país, el presente proyecto SENASICA-CONABIO permitió conformar la primera colección oficial, preservada y digitalizada de cepas fitopatógenas nacionales e internacionales, documentada en México hasta el momento. La cual servirá como una herramienta de gran utilidad, de consulta tanto para el SENASICA como para otras instituciones, laboratorios y grupos de investigación, ofreciendo información que permita tener mayor certeza en la determinación de las especies bacterianas según sea el caso, ya que se cuenta con información biológica de cada una de ellas, los cultivos agrícolas que afectan y en la mayoría de los casos su georreferenciación. Toda esta información se obtendrá a través de la consulta digital de sus ejemplares en la página electrónica de la CONABIO.

REFERENCIAS

- BIOLOG, Inc 2011 Hayward, CA 94545 USA 21124 Cabot Blvd www.biolog.com
- Cruz, F. M. y Frías, T. G. 1997. Guía ilustrada de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. Comisión Nacional de Sanidad Vegetal. SAGAR. México. 22 pp.
- Duveiller E., Fucikovski L., Rudolph K. (1997). The Bacterial Disease of Wheat. Concepts and Methods of Disease Management. *CIMMYT*. México D.F. 77pp.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of freshleaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Fahy, P., Persley, S. 1983. Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Academic Press. Sponsored. Australasian Plant Pathology Society.
- Figuroa Mejía V. A. (2002). Detección de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en semilla de sandía mediante reacción en cadena de la polimerasa. Universidad Autónoma Chapingo. 64pp.

- Gerhardt, P., Murray, R., Willis, A. 2005. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Goszczyńska, T., Serfontein, J. J & Serfontein, S. (2000). *Introduction to Practical Phytobacteriology*. Bacterial diseases unit ARC-PPR. South Africa. 82pp.
- Klement Z., Rudolph, K., Sands, D. 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest. H. Stillman Publishers.
- Lelliott, A., Otead, D. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. *Methods in Plant Pathology Volume 2*. International Maize and Wheat Improvement Centre.
- Tapia Russell R. y Magaña Gomez J. (2009). *Protocolos para la detección molecular de fitopatógenos y organismos genéticamente modificados*. Centro de investigación Científica de Yucatán, México. GEMBIO. 92pp.
- Mullis, Kary (1983). "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Scientific American* 262 (4): 56–61, 64–5.
- Rodríguez, M. M. de Lourdes. (2006). *Manual para la identificación de Bacterias Fitopatógenas*. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola. 145pp.
- Rodríguez, M. M. de Lourdes. (2010). *Enfermedades Bacterianas en Hortalizas*. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola. 306pp
- Schaad, N.W., J, B. Jones & W, Chun. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS PRESS. U.S.A.260pp.
- <http://joseangelalonso.blogspot.mx/mx/2012/12/blog-post4273.html> Cuantificación de DNA, visto en el 2015.

ANEXOS

ANEXO 1. BITACORA DE ACTIVIDADES

En los siguientes cuadros se muestran los periodos y fechas en las que desarrollaron las actividades y técnicas empleadas para el análisis de cada cepa, indicando el género y las especies, la toma de fotografías y el número con el que quedaron capturadas en la base de datos. La información se muestra en orden regresivo, el siguiente es el último y cuarto periodo:

Calendario de actividades de la **cuarta fase** del Proyecto.

PERIODO	ACTIVACIÓN Y PURIFICACIÓN	PATOGENICIDAD	BIOQUÍMICAS	EXTRACCIÓN DNA	PCR	ELISA	Id EJEMPLAR
JUNIO 2016	<i>Xanthomonas/ axonopodis/ albilineans / translucens/ campestris</i> Toma de imágenes	Xaxo Xalb Xt Xc	Xaxo Xalb Xt Xc	Xaxo Xalb Xt Xc	Xaxo Xalb Xt Xc	Xaxo Xalb Xt Xc	113 a 115 127 a 131 134 138 156, 160
JULIO 2016	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Clavibacter michiganensis</i> <i>Stenotrophomonas Dickeya</i> CORRECCIONES EN BIÓTICA Toma de imágenes	Bc Cmm Dchy	Bc Cmm Dchy	Bc Cmm Dchy	Bc Cmm Dchy	Bc Cmm Dchy	117 158 159 118,144 153
AGOSTO 2016	<i>Ralstonia solanacearum / Xanthomonas fragariae</i> <i>Pectobacterium carotovorum</i> CAPTURA BIÓTICA Y REPORTE DE CORRECCIONES	Rs Xfr Pca	Rs Xfr Pca	Rs Xfr Pca	Rs Xfr Pca	Rs Xfr	119,142 143,154, 155 147 a 150 152
SEPTIEMBRE 2016	<i>Pantoea agglomerans/ ananatis/ indologenes</i> CAPTURA BIÓTICA Y REPORTE DE CORRECCIONES Toma de imágenes	Pgg Pa Pidol	Pgg Pa Pidol	Pgg Pa Pidol	Pgg Pa Pidol	Pgg Pa Pidol	146 116 122 a 126
OCTUBRE 2016	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>Clavibacter m. nebraskensis</i> <i>Pseudomonas fluorescens/ syringae/viridiflava/ chichorii</i> Toma de imágenes CAPTURA BIÓTICA, REPORTE DE CORRECCIONES Y ELABORACIÓN DEL 4° Y ÚLTIMO INFORME	Cf Cmn Psf Psy Psv Psc	Cf Cmn Psf Psy Psv Psc	Cf Cmn Psf Psy Psv Psc	Cf Cmn Psf Psy Psv Psc	Cf Cmn Psf Psy Psv Psc	139,140 120,121 135 a 137 145 133 157 141
NOVIEMBRE- DICIEMBRE 2016	Liofilización de cepas. Segunda visita a Institución que cuenta con colección microbiana. Elaboración del informe correspondiente. CORRECCIONES Y ENTREGA DEL 4° Y ÚLTIMO INFORME DEL PROYECTO						

Calendario de actividades de la **tercera fase** del Proyecto

PERIODO	ACTIVACIÓN Y PURIFICACIÓN	PATOGENICIDAD	BIOQUÍMICAS	EXTRACCIÓN DNA	PCR	ELISA	IMAGENES	SECUENCIAS	Id EJEMPLAR	
DICIEMBRE 2015	<i>Pantoea stewartii</i> / <i>ananatis</i> / <i>dispersa</i> / <i>anthophila</i> / / sp.	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>		<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	98	
		<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	<i>Pana</i>		<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	78	
		<i>Padi</i>	<i>Padi</i>	<i>Padi</i>	<i>Padi</i>		<i>Padi</i>	<i>Padi</i>	76	
		<i>Paan</i>	<i>Paan</i>	<i>Paan</i>	<i>Paan</i>		<i>Paan</i>	<i>Paan</i>	80	
		<i>sp</i>	<i>sp</i>	<i>sp</i>	<i>sp</i>		<i>sp</i>	<i>sp</i>	83	
ENERO 2015	<i>Pantoea stewartii</i> / <i>ananatis</i> / <i>dispersa</i> / <i>anthophila</i> / / sp. CORRECCIONES EN BIÓTICA	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>		<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	98	
		<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	<i>Pana</i>		<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	78	
		<i>Padi</i>	<i>Padi</i>	<i>Padi</i>	<i>Padi</i>		<i>Padi</i>	<i>Padi</i>	76	
		<i>Paan</i>	<i>Paan</i>	<i>Paan</i>	<i>Paan</i>		<i>Paan</i>	<i>Paan</i>	80	
		<i>sp</i>	<i>sp</i>	<i>sp</i>	<i>sp</i>		<i>sp</i>	<i>sp</i>	83	
FEBRERO 2015	<i>Xyllela/ fastidiosa/ multiplex</i> <i>Brenneria rubrifaciens</i> <i>Burkholderia glumae</i> <i>Pseudomona fluorescens</i> <i>/aeruginosa</i> CAPTURA BIÓTICA Y REPORTE DE CORRECCIONES	<i>Xsf</i>	<i>Xsf</i>	<i>Xsf</i>	<i>Xsf</i>	<i>Xsf</i>		<i>Xsf</i>	81	
		<i>Xsfm</i>	<i>Xsfm</i>	<i>Xsfm</i>	<i>Xsfm</i>	<i>Xsfm</i>		<i>Xsfm</i>	82	
		<i>Br</i>	<i>Br</i>	<i>Br</i>	<i>Br</i>	<i>Br</i>		<i>Br</i>	85	
		<i>Bgl</i>	<i>Bgl</i>	<i>Bgl</i>	<i>Bgl</i>	<i>Bgl</i>		<i>Bgl</i>	84	
		<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	<i>Psf</i>		<i>Psf</i>	96	
		<i>Psaeru</i>	<i>Psaeru</i>	<i>Psaeru</i>	<i>Psaeru</i>	<i>Psaeru</i>	<i>Xsf</i> <i>Bgl</i>		<i>Psaeru</i>	91
MARZO 2015	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> / <i>arboricola</i> / <i>Spiroplasma citri</i> / <i>kunkelii</i> <i>Pantoea agglomeras</i> <i>Pantoea ananatis</i> CAPTURA BIÓTICA Y REPORTE DE CORRECCIONES	<i>Xaeu</i>	<i>Xaeu</i>	<i>Xaeu</i>	<i>Xaeu</i>		<i>Xaeu</i>	<i>Xaeu</i>	31,36	
		<i>Xaar</i>	<i>Xaar</i>	<i>Xaar</i>	<i>Xaar</i>		<i>Xaar</i>	<i>Xaar</i>	92,93	
		<i>Spci</i>	<i>Spci</i>	<i>Spci</i>	<i>Spci</i>		<i>Xaeu</i>	<i>Xaar</i>	87	
		<i>Spku</i>	<i>Spku</i>	<i>Spku</i>	<i>Spku</i>		<i>Pgg</i>	<i>Pgg</i>	88,100	
		<i>Pgg</i>	<i>Pgg</i>	<i>Pgg</i>	<i>Pgg</i>		<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	95,99	
		<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	<i>Pana</i>	<i>Pana</i>				97	
ABRIL 2015	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> / <i>luteum</i> <i>Pantoea indologenes</i> <i>Pantoea Stewartii</i> <i>Rhizobium rhizogenes</i> <i>Tatumella citri</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> CAPTURA BIÓTICA, REPORTE DE CORRECCIONES Y ELABORACIÓN DEL INFORME	<i>Cf</i>	<i>Cf</i>	<i>Cf</i>	<i>Cf</i>		<i>Cf</i>	<i>Cf</i>	89,90	
		<i>Cl</i>	<i>Cl</i>	<i>Cl</i>	<i>Cl</i>		<i>Cl</i>	<i>Cl</i>	103	
		<i>Pstindol</i>	<i>Pstindol</i>	<i>Pstindol</i>	<i>Pstindol</i>		<i>Pstindol</i>	<i>Pstindol</i>	94	
		<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>		<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	98	
		<i>Rhir</i>	<i>Rhir</i>	<i>Rhir</i>	<i>Rhir</i>	<i>Cff, Cl</i>	<i>Pstw</i>	<i>Pstw</i>	110	
		<i>Taci</i>	<i>Taci</i>	<i>Taci</i>	<i>Taci</i>		<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	108	
		<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	<i>Psf</i>				109	
MAYO 2015	<i>Ps fluorescens</i> / <i>palleroniana</i> <i>Xantomonas sacchari</i> <i>Pantoea aglomeras</i> <i>Xanthomonas fragariae</i> <i>Pectobacterium carotovorum</i> CAPTURA BIÓTICA, Y ELABORACIÓN DEL INFORME	<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	<i>Psf</i>		<i>Psf</i>	<i>Psf</i>	107	
		<i>Pspa</i>	<i>Pspa</i>	<i>Pspa</i>	<i>Pspa</i>		<i>Xan</i>	<i>Pspa</i>	102	
		<i>Xasac</i>	<i>Xasac</i>	<i>Xasac</i>	<i>Xasac</i>			<i>Xasac</i>	104	
		<i>Pagg</i>	<i>Pagg</i>	<i>Pagg</i>	<i>Pagg</i>		<i>Xfr</i>	<i>Pagg</i>	105	
		<i>Xfr</i>	<i>Xfr</i>	<i>Xfr</i>	<i>Xfr</i>			<i>Xfr</i>	106	
		<i>Pca</i>	<i>Pca</i>	<i>Pca</i>	<i>Pca</i>				111	

Calendario de actividades de la **segunda fase** del Proyecto

	ACTIVACIÓN Y PURIFICACIÓN	BIOQUÍMICAS	EXTRACCIÓN DNA	PCR	ELISA	FOTOGRAFÍAS
MAYO / JUNIO 2015	<i>Ralstonia solanacearum</i> <i>Xanthomona</i> CAPTURA/BIOTICA	Rs/Xanm	Rs/Xanm	Rs/Xanm	Rs/Xanm	Rs/Xan
JULIO 2015	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> / subsp. <i>nebraskensis</i> / <i>flacufaciens</i> CAPTURA/BIOTICA	Cmm/Cmn/Cff	Cmm/Cmn/Cff	Cmm/Cmn/Cff		Xan
AGOSTO 2015	<i>Pseudomonas</i> <i>Xanthomona</i> <i>fragariae/vesicatoria/</i> <i>arboricola/transluce</i> <i>ns/axonopodis/</i> <i>Acidovorax/</i> <i>Agrobacterium/</i> <i>Dickeya</i> CAPTURA/BIOTICA Y CORRECCIONES	Ps/Xan/Acc Erw/Dchy/At	Ps/Xan/Acc Erw/Dchy/At	Ps/Xan/Acc Erw/Dchy/At		Cmm/Cmn/ Cff <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescentes/</i> <i>syringae</i>
SEPTIEMBRE 2015	<i>Xanthomona</i> <i>fragariae/vesicatoria/</i> <i>arboricola/transluce</i> <i>ns/axonopodis</i> <i>Pantoea stewartii/</i> <i>Erwinia amylovora</i> CAPTURA/BIOTICA Y CORRECCIONES	Xan/ Pstw/Erw	Xan/ Pstw/Erw	Xan/ Pstw/Erw		Ps/Xan/Acc Erw/Dchy/At/ Pstw/Erw
OCTUBRE 2015	<i>Xanthomona</i> <i>sacchari/Serratia</i> <i>macenses/Erwinia</i> <i>amylovora</i> CAPTURA/BIOTICA, CORRECCIONES Y ELABORACIÓN DE INFORME	Xan/Sert Pstw/Erw	Xan/Sert Pstw/Erw	Xan/Sert Pstw/Erw		Ps/Xan/Acc Erw/Dchy/At/ Pstw/Erw Sert Pstw/Erw
NOVIEMBRE 2015	CAPTURA/BIOTICA, CORRECCIONES Y ELABORACIÓN DE INFORME					

Calendario de actividades de la **primera fase** del Proyecto

	ACTIVACIÓN Y PURIFICACIÓN	BIOQUÍMICAS	EXTRACCIÓN DNA	PCR	ELISA	SECUENCIA
NOVIEMBRE/DICIEMBRE 2014	<i>Dickeya chrysanthemi</i> / <i>Ralstonia solanacearum</i>	Dchy/Rs	Dchy/Rs	Dchy/Rs	Rs	Dchy/Rs
NOVIEMBRE/DICIEMBRE 2014	<i>Ralstonia solanacearum</i> / <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> / <i>Xanthomonas melonis</i>	Rs/Aac, Xanm	Rs/Aac, Xanm	Rs/Aac, Xanm	Aac	Rs/Aac/Xm
ENERO/FEBRERO 2015	<i>Pseudomonas fluorescens/syringae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/syri ngae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens/sy ringae</i>	<i>Pseudom onas fluorecent es/syringa e</i>		
MARZO/ ABRIL 2015	<i>Clavibacter michiganesis</i> subsp. <i>michiganesis</i> / subsp. <i>nebraskensis</i> / <i>Curtobacterium</i> <i>flaccumfaciens</i> subsp. <i>flaccumfaciens</i>	Cmm/Cmn/Cff	Cmm/Cmn/ Cff	Cmm/Cm n/ Cff	Cmm/Cmn / Cff	Cmm/Cmn/ Cff
ABRIL 2015	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> subsp. <i>flaccumfaciens</i>	Cff	Cff	Cff		
ABRIL 2015	CAPTURA/BIÓTICA					

ANEXO 2. Material liofilizado de la colección

Liofilizado por Género	Especie	N° total de ampollitas
<i>Clavibacter</i>	<i>michiganensis</i>	15
<i>Curtobacterium</i>	<i>flaccumfaciens</i>	15
<i>Dickeya</i>	<i>chrysanthemi</i>	15
<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	15
	<i>stewartii</i>	15
<i>Pseudomonas</i>	<i>syringae</i>	15
	<i>marginalis</i>	15
<i>Ralstonia</i>	<i>solanacearum</i>	15
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	15
<i>Xanthomonas</i>	<i>fragariae</i>	15
	<i>translucens</i>	15
	<i>euvesicatoria</i>	15
<i>Breneria</i>	<i>arboricola</i>	15
	<i>rubrifaciens</i>	15

ANEXO 3

INFORME DE LA VISITA AL CENTRO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS (INIFAP)

El Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) tiene como objetivo salvaguardar la diversidad genética del país debido a que es un organismo especializado en la conservación del germoplasma de varios tipos de material como son las semillas, plantas, gametos, embriones, esporas, ADN y cepas; de esa forma proporciona mayor seguridad agroalimentaria y contribuye en el uso adecuado y sustentable de dichos recursos.

Debido a la gran experiencia del CNRG en la preservación de cepas, los objetivos de la visita estuvieron enfocados en el procesamiento, manejo y conservación de la Colección de Microorganismos del Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos que ahí resguardan, misma que se encuentra a cargo del Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay. En esta visita se reforzaron los puntos críticos para la adecuada conservación, manejo y mantenimiento de la colección de cepas del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF).

El Dr. Arteaga y su equipo de trabajo dirigieron la visita y compartieron información que a continuación se describe. Indican que los principales métodos para preservar microorganismos hasta ahora, son el ultra congelamiento y la liofilización, los criterios para seleccionarlos están en función de las características de cada organismo.

A. El congelamiento en general resulta ser un método adecuado para la mayoría de los microorganismos, sin embargo se ha visto que la actividad bioquímica de algunas especies de bacterias Gram-negativas, al parecer presenta más cambios en condiciones de estrés por congelamiento que las observadas para bacterias Gram positivas. Este fenómeno está relacionado con la conformación química de su membrana.

B. En el caso de la liofilización, este método es casi universal para todos los microorganismos, aunque existen algunas especies de hongos que no toleran las condiciones empleadas para liofilizar. En el caso de las bacterias se ha visto que en general se mantienen estables y en óptimas condiciones al ser liofilizadas.

El Dr. I. Ramón Arteaga Garibay hizo énfasis en que existen aspectos importantes que deben ser considerados para salvaguardar una colección en óptimas condiciones, como son la concentración del inoculo y el número de resiembras, ya que constituye una posibilidad de cambio en el comportamiento fenotípico y genotípico de las bacterias, así como la conservación de los genes de patogenicidad (para fines de la colección de bacterias fitopatógenas) que aseguren su estabilidad genética, por lo que existen tres puntos críticos de vital importancia para evaluar la confiabilidad del proceso de conservación que son:



Figura 1. Puntos críticos para la conservación correcta.

El titular nos mencionó que lo que realmente es relevante, no es conservar por conservar, si no mantener estables las características de cada microorganismo por largos periodos de tiempo, lo que asegurará que el organismo que se aísla y el que se conserve, sea el mismo todo el tiempo y realmente pueda servir como un material de referencia confiable.

Algunas de las medidas que nos compartió para lograr esto mediante la congelación, es emplear el método del sistema “Lote-Semilla” el cual se basa en hacer varias réplicas de la cepa original. En este caso la cepa original debe estar siempre bajo condiciones de congelamiento (-80 °C o 196 °C) en un ultracongelador exclusivo para la colección de cepas originales manteniendo estable su temperatura a fin de evitar daños o pérdida de las mismas. Las cepas “replicas” pueden ser útiles para la constatación del correcto diagnóstico, estas

pueden estar en mayor movimiento a diferencia de las cepas originales, esto sin modificar los tres puntos clave que se ilustran en la figura 1.

Un punto valioso en este caso es controlar la velocidad de congelamiento de las muestras, si es muy lenta, los cristales que se forman a partir del líquido contenido en las células serán muy grandes y pueden romper la membrana celular, para evitar el daño celular existen algunas sustancias, como el glicerol o el dimetilsulfóxido que ayudan a proteger los microorganismos durante el proceso de congelación, conocidos como crioprotectores. Estas sustancias tienen un punto de congelación bajo, lo cual ayuda a reducir la velocidad de congelación de los componentes de la célula microbiana. El correcto uso de esta técnica ayudara a la estabilidad de la mayoría de las características de cada ejemplar.

La liofilización es otro método de conservación y nos dieron algunas recomendaciones, es considerada como la técnica más adecuada para la preservación de microorganismos como es el caso de las bacterias, durante largos periodos de tiempo. La técnica involucra el congelamiento de un cultivo que debe ser embebido en sustancias crioprotectoras como leche, que ha resultado ser muy efectivo para la conservación de bacterias, posteriormente el pellet de leche debe ser secado a bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja de liofilizar es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo se mantiene fácilmente a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad o a bajas temperaturas. En este caso también es de crucial importancia la selección adecuada de un crioprotector que asegure la supervivencia del organismo de interés.

A continuación se ilustra que organismos son recomendables conservar por liofilización:

SI	NO
<ul style="list-style-type: none">• Bacterias• Hongos (levaduras)• Algas (específicas)	<ul style="list-style-type: none">• Células animales• Hongos• Algas (específicas)

La elección del método de conservación utilizado debe permitir mantener las características del microorganismo.

En conclusión no existe un modelo único de conservación general para todas las especies, esto dependerá del organismo y sus características, sin embargo la preservación adecuada de cada especie bacteriana es necesaria para resguardar el potencial biotecnológico que cada una alberga en su genoma. Las bacterias fitopatógenas que constituyen el cepario del CNRF son de gran importancia, ya que constituyen un acervo dentro de la agricultura, una de sus funciones principales e iniciales es que fungen como controles positivos para actuales y futuros análisis que se realizan en el laboratorio, de ahí la importancia de integrar y mantener la colección. El éxito en la preservación de los cultivos microbianos será esencial para el desarrollo de actividades de investigación, referencia, consulta y diagnóstico confiable, basadas en las características de cada uno de los diferentes microorganismos.

También es importante hacer mención que el Dr. I. Ramón Arteaga Garibay considera que es necesario que haya personal dedicado al manejo de las colecciones y éste debe estar en constante formación dirigida hacia la conservación de microorganismos, por lo que ofreció la estancia para capacitación de por lo menos un mes de estancia en su laboratorio.

Aunado a esto, mencionó que se debe llevar una regulación estricta del material biológico, tal es el caso de las cepas bacterianas, principalmente cuando un microorganismo es donado a otras instituciones o investigadores para diversos fines, a manera de tener rastreabilidad sobre el material y ante alguna situación adversa que pudiese presentarse, se tenga conocimiento de ¿quién? o ¿qué generó? la liberación de dicha cepa que pudiese ser un peligro o una amenaza para la inocuidad de los alimentos y la producción de los mismos.



Figura 2. Entrada a las instalaciones del CNRG-INIFAP. Visita atendida por las Biólogas Lorena Peña G. y Abigail Vega A.



Figura 3. Área de trabajo del Laboratorio de Microbiología y termocicladores para la determinación molecular de los ejemplares



Figura 4. A) Clasificación de los ejemplares mediante pruebas bioquímicas y conservación en viales liofilizados y tubos especiales para la crio conservación. B) Contenedores de nitrógeno líquido para mantener las colecciones.