Métodos de Detección de Bacterias Fitopatógenas en Semillas

Ing. Sandra Moya Hernández, Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Guillermo Pérez Valenzuela 127, Col. Del Carmen Coyoacán, México, D.F., CP 04100, México. Correspondencia: lourdes_2111@hotmail.com

El medio principal para propagar la vida de la mayoría de las especies vegetales son las semillas, sin embargo, en su misión de ser portadoras de las características genéticas, agronómicas y morfológicas pueden servir también de vehículo para transportar patógenos que pueden producir pérdidas en la producción agrícola.

Las semillas infectadas son un importante medio de diseminación de bacterias fitopatógenas tanto a nivel local como a largas distancias, representando de esta manera una amenaza real de introducirlas en aéreas consideradas libres y la introducción de nuevos aislamientos o razas más virulentos en áreas de producción de cultivos.

Considerando la importancia económica internacional del rubro de producción de semillas, el diagnóstico de bacterias tiene gran trascendencia para que la producción de las diferentes especies llegue a buen término y en condiciones económicas favorables. El análisis de las semillas permite la detección oportuna de los microorganismos asociados a ellas; los tratamientos permiten protegerlos de dichos patógenos y, en algunos casos, erradicarlos.

Potencialmente cualquier bacteriosis puede ser transmitida por semilla, generalmente las bacterias se encuentran infestando la superficie de las semillas, pero las que causan infecciones vasculares o sistémicas se encuentran frecuentemente infectando las cubiertas u otros tejidos internos de la semilla. Las bacterias que infestan semillas pueden mantenerse vivas durante un periodo limitado de tiempo, mientras que las bacterias presentes en el interior de las semillas son extraordinariamente longevas.

La detección de bacterias representa un filtro muy importante por ello es necesario que el diagnóstico englobe varios métodos de detección que agoten las posibilidades para determinar la presencia o ausencia de bacterias.

Particularmente la detección y diagnóstico de bacterias en semillas es un proceso difícil, ya que en muchas ocasiones la cantidad de material resulta insuficiente aunado a que el inóculo se encuentra en bajas cantidades infestando o infectando la semilla, generalmente los porcentajes de semilla contaminada son de 0.1 % o menos, complicando así su aislamiento o detección.

Actualmente se han desarrollado métodos de detección muy sensibles que ayudan en gran medida a la detección de bacterias aunque estas se presenten en bajas concentraciones, particularmente métodos moleculares y serológicos, sin embargo, en diversas ocasiones, ciertos factores y características propias de las semillas, como el contenido de almidones y carbohidratos, pueden ocasionar la obtención de falsos negativos. De allí que la detección y diagnóstico debe abarcar técnicas que permitan obtener preferentemente a las cepas bacterianas en cuestión para asegurar o descartar la presencia.

Dentro de los métodos utilizados se encuentran las técnicas tradicionales como lo son el aislamiento de las bacterias y su caracterización fisiológica y bioquímica; técnicas serológicas, particularmente ELISA y técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación del producto resultante.

El aislamiento de bacterias a partir de semillas depende del porcentaje de recuperación de las mismas, de su liberación y de la reducción al mínimo de organismos saprofitos. Desafortunadamente, para muchas bacterias, los datos sobre las densidades de inóculo naturales en las semillas y número de semillas infectadas necesario para el desarrollo de la enfermedad en campo no están disponibles, lo que hace más difícil lograr la obtención de la bacteria.

Los métodos de aislamiento se deben enfocar en lograr el crecimiento de la bacteria aun teniendo un reducido número de células bacterianas. Para tal objetivo se utilizan diferentes medios para la obtención de las células bacterianas como el agua destilada estéril, soluciones salinas a diferentes concentraciones y buffers enriquecidos con medio de cultivo y detergentes. Una vez obtenidas las cepas bacterianas en cuestión, la caracterización se logra a través de medios selectivos y de caracterización bioquímica.

Otro método utilizado para el diagnóstico de bacterias fitopatógenas es la técnica de ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay") o Ensayo de inmunoadsorción con enzimas conjugadas), la cual se basa en la detección directa o indirecta de un antígeno sobre una fase sólida mediante proteínas conocidas como anticuerpos, que en presencia de determinado sustrato producen una reacción de color que puede ser medida espectrofotométricamente. La técnica ELISA es confiable y rápida para la detección de fitopatógenos debido al alto grado de sensibilidad que posee. Sin embargo, durante la realización de la técnica se deben tener precauciones ya que pueden presentarse reacciones con residuos vegetales o bacterias saprofitas derivando en falsos positivos, además de que su límite de detección es de 10^5 bacterias por gramo de muestra. De igual manera los residuos de los agroquímicos con los que vienen tratadas pueden interferir en el resultado.

Finalmente la PCR actualmente es una de las técnicas más empleadas y es conocida porque el análisis es a partir de una muestra de ADN que contiene una secuencia que se desea amplificar. La cantidad de ADN necesaria para realizar tal amplificación es muy pequeña, de allí su principal ventaja. En el diagnóstico por PCR a partir de semillas, se deben cuidar varios aspectos tales como la extracción de ADN, ya que en muchas ocasiones la reacción puede ser inhibida por compuestos como el almidón procedente del mismo material, para tales casos cada muestra de ADN debe ser purificada o bien, realizar dicha extracción de ADN a partir del germinado de la misma semilla o de la bacteria aislada y purificada.

Referencias Bibliográficas

- Rodríguez M. M .L. 2006 Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. De México.
- Saetler, A.W., Schaad N.W. and Roth D.A. 1989. Detection of Bacteria in Seed and other Planting Material. APS Press. St. Paul Minnesot. 122 pp.
- Schaad et al, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third edition. APS PRESS.
- Zillinsky, F. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. CIMMYT. El Batán, México. 141 pp.
- <http://repiica.iica.int/docs/bv/agrin/b/f03/XL2000600205.pdf>