

Protocolos de *Ralstonia solanacearum*

Liliam Gutarra y Juan Herrera

Contenido

Procedimiento	Página
1. Colección de muestras de tallos de papa con síntomas de marchitez para aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	2
2. Aislamiento y mantenimiento de las colecciones de <i>R. solanacearum</i>	3
3. Prueba de patogenicidad	6
4. Extracción de ADN de <i>R. solanacearum</i>	7
5. Identificación molecular de <i>R. solanacearum</i> por PCR	10
6. Determinación de biovars	12
7. Determinación de filotipos de cepas de <i>R. solanacearum</i>	15
8. Amplificación del gen endogluconasa de cepas de <i>R. solanacearum</i> para determinación de secuevars	19
 Apéndice	
1. Preparación del tampón de extracción o tampón citrato pH 5.6 (1000 ml)	24
2. Preparación del medio Kelman con TZC	24
3. Preparación del medio para diferenciación de biovars.....	25
4. Preparación del TE ⁻¹	26
5. Preparación del TBE 10X (pH 8).....	26
6. Preparación del GEL red 1/10 (proteger de la luz).....	26

Referencias

1. COLECCIÓN DE MUESTRAS DE TALLOS DE PAPA CON SÍNTOMAS DE MARCHITEZ PARA AISLAMIENTO DE *RALSTONIA SOLANACEARUM*

1.1. Materiales

- Papel toalla y bolsas de papel
- Un marcador para identificar las muestras en las bolsas,
- Tijeras de podar
- Hipoclorito de sodio (NaOCl)
- Plantas de papa de aproximadamente 40 días después del brotamiento

1.2. Procedimiento

- Colectar uno de los tallos principales de la planta con síntomas de marchitez. Para ello cortar un fragmento de aproximadamente 15 cm de longitud de la base de la planta, con una tijera de podar. Desinfectar la tijera entre muestras de tallos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% de producto activo.
- Limpiar el fragmento de tallo con papel toalla.
- Envolver cada muestra en una hoja de papel toalla y guardar dentro de una bolsa de papel.
- Colocar las muestras de tallos en una caja de cartón, tecnopor o cooler.
- Analizar el mismo día o guardar dos días como máximo en un lugar fresco (alrededor de 15°C) pero no en la refrigeradora.



Figura 1. Colecta de plantas con síntomas de marchitez

2. AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS COLECCIONES DE (RS)

2.1. Materiales

- Bolsas de plástico para lavar, desinfectar y macerar las muestras de plantas
- Hipoclorito de sodio (NaOCl)
- Un mechero Bunsen para desinfectar las herramientas
- Tijeras de podar
- Un martillo o un rodillo de madera para moler los fragmentos de tallo
- Una probeta graduada de 1000 ml y dos Erlenmeyers o botellas de 1 litro para preparar el tampón de extracción y el medio Kelman
- Placas Petri
- Tubos de prueba con tapas de rosca
- Agua destilada
- Un ph metro
- Una incubadora

2.2. Procedimiento de lavado y desinfección

- Lavar individualmente los fragmentos de tallos con agua de caño y dejarlos secar sobre papel toalla limpio.
- Eliminar los extremos de los trozos de tallos dejando aproximadamente de 5cm de tejido con ayuda de una tijera de podar. Desinfectar la tijera con alcohol y flamearlo entre cada muestra.
- Desinfectar cada muestra en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % de producto activo contenido en un vaso de precipitación o bolsa de plástico durante 1 minuto; eliminar la lejía y enjuagar una vez con agua destilada y a continuación añadir alcohol al 70%, y enjuagar nuevamente dos veces con agua destilada estéril o agua hervida.
- Procedimiento de preparación del extracto de tallo.
- Eliminar nuevamente los extremos del trozo de tallo (de aproximadamente 5cm) dejando aproximadamente 3cm de tejido de cada uno. Desinfectar la tijera de podar con alcohol y flamearlo entre cada muestra de tallos.

- Colocar el fragmento de tallo en una bolsa de plástico nueva y pesarlo.
- Agregar 3ml de tampón citrato (ver en el Apéndice 1) por gramo de tejido.
- Macerar con un martillo o rodillo de madera.
- Colocar la bolsa de plástico en forma vertical sobre hielo picado (no más de una hora) para evitar la oxidación de los fenoles.

2.3 . Aislamiento de *R.solanacerum* en medio Kelman con TZC

- Poner 20 ul de la suspensión de cada muestra en placas conteniendo medio Kelman con TZC (la composición del medio se describe en el Apéndice 2) y sembrar por estriado.
- Incubar las placas a 30 ° C durante 48 h.
- Después de 48 h, las colonias de *R. solanacearum* tipo silvestre son de forma irregular, fluida y de color blanco cremoso con los centros rosados.

2.4. Almacenamiento de Rs en agua

- Coger una colonia de la bacteria del medio Kelman con TZC y sembrar en medio Kelman sin TZC. Incubar la placa a 30°C durante 48 h.
- Coger dos ansadas de bacterias de un compuesto de alrededor de seis colonias individuales.
- Poner las bacterias en 10 ml de agua destilada estéril contenida en tubos con tapa de rosca. Chequear las bacterias cada seis meses sembrándolas nuevamente en medio Kelman con TZC. Volver a purificar si hay presencia de mutantes (Colonias redondas de color guinda con borde transparente).



Figura 2. Aislamiento y mantenimiento de *Ralstonia solanacearum*.

3. Prueba de patogenicidad

- Coger una colonia de la bacteria del medio Kelman con TZC (French et al., 1995) y sembrar en medio Kelman sin TZC. Incubar la placa a 30°C durante 48 h.
- Preparar una suspensión de *R. solanacearum* de aproximadamente 10^8 células/ml.
- Inocular plántulas de papa (cualquier variedad susceptible a la marchitez bacteriana) de 10 a 15 cm de altura, inyectando 20 μ l de la una suspensión en la axila de la tercera hoja superior, con ayuda de una jeringa hipodérmica.
- Mantener las plantas bien regadas en un ambiente con temperaturas entre 25 a 30°C durante un mes con 80-90% de humedad relativa y con luz natural del día. Si el aislamiento inoculado es una cepa virulenta de *R. solanacearum* los síntomas aparecerán a partir de los cinco días.
- Realizar la prueba del flujo vascular del tallo de la planta con síntomas de marchitez y re-aislar la bacteria de la suspensión obtenida.



Figura 3. Prueba de patogenicidad: A) Inoculación de la bacteria *R. solanacearum*; B) Síntomas de marchitez 7 días después de la inoculación.

4. EXTRACCIÓN DE ADN DE *R. SOLANACEARUM*

4.1. Extracción de ADN a partir de un cultivo puro

- A partir de un cultivo de la bacteria *R. solanacearum* en medio Kelman sin TZC, coger de 1 a 2 colonias con un ansa de siembra estéril o un tip.
- Resuspender las colonias en 100 μ L de agua libre de nucleasas (NFW) estéril contenido en un tubo eppendorf de 1.5 ml y homogenizar en un vortex.
- Colocar el tubo eppendorf conteniendo la suspensión de ADN en baño María (aproximadamente 95°C) durante 10 minutos.
- Dejar el tubo eppendorf en hielo durante 3 minutos.
- Almacenar las suspensiones de ADN a -20°C si no van a ser usadas de inmediato.

4.2. Extracción de ADN mediante las tarjetas de FTA, a partir de tallos de papa con síntomas de marchitez

4.2.1. Colecta de muestras de tallos

- Colectar uno de los tallos principales de la planta con síntomas de marchitez. Para ello cortar un fragmento de aproximadamente 10-15cm de longitud de la base de la planta, con una tijera de podar. Desinfectar la tijera entre muestras de tallos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% de producto activo.
- Limpiar el fragmento de tallo con papel toalla, luego desinfectar uno de los extremos con alcohol al 96% y enjuagar varias veces con agua destilada.

4.2.2. Colocación de la muestra en la tarjeta de FTA

- Eliminar 2cm del extremo del fragmento de tallo desinfectado.
- Cortar aproximadamente 2-5mm de longitud del fragmento de tallo y colocar éste en la tarjeta de FTA.
- Machacar la muestra presionando el tejido sobre la tarjeta con la ayuda de un mango de mortero o la base de un tubo de vidrio.
- Dejar secar la muestra durante 30 minutos.

4.2.3. Remoción del disco

- Extraer un disco (1mm) de la mancha seca de la muestra con ayuda de un micro perforador (previamente desinfectado con alcohol) y colocarla en un tubo de PCR.

4.2.4. Lavado del disco con reactivo de purificación de FTA

- Añadir 200 µl del reactivo de purificación al tubo eppendorf que contiene el disco e incubar a medio ambiente (MA) bajo agitación invirtiendo el tubo suavemente. También puede ser a 50 rpm durante 5 minutos, descartar el reactivo después de cada lavado con la ayuda de un micropipetor de 200 µl. Repetir el proceso 2 veces.

4.2.5. Enjuague del disco con TE⁻¹, pH 8.0

- Usar el buffer TE⁻¹ (ver apéndice 3) para enjuagar el disco, para ello adicionar 200 µL de buffer TE⁻¹ e incubar como en el caso anterior; descartar el reactivo después de cada lavado con ayuda de un micropipetor de 200 µL. Repetir este proceso 3 veces.

4.2.6. Secado de disco

- Dejar que el disco se seque completamente a MA.

4.2.7. PCR

- Adicionar el master mix de la PCR al tubo que contiene el disco y continuar con la PCR.

Nota. Se recomienda que la PCR se realice dentro de las tres horas después del lavado del disco; si no es posible, guardar el disco a 4°C o -20°C en oscuridad hasta una semana.

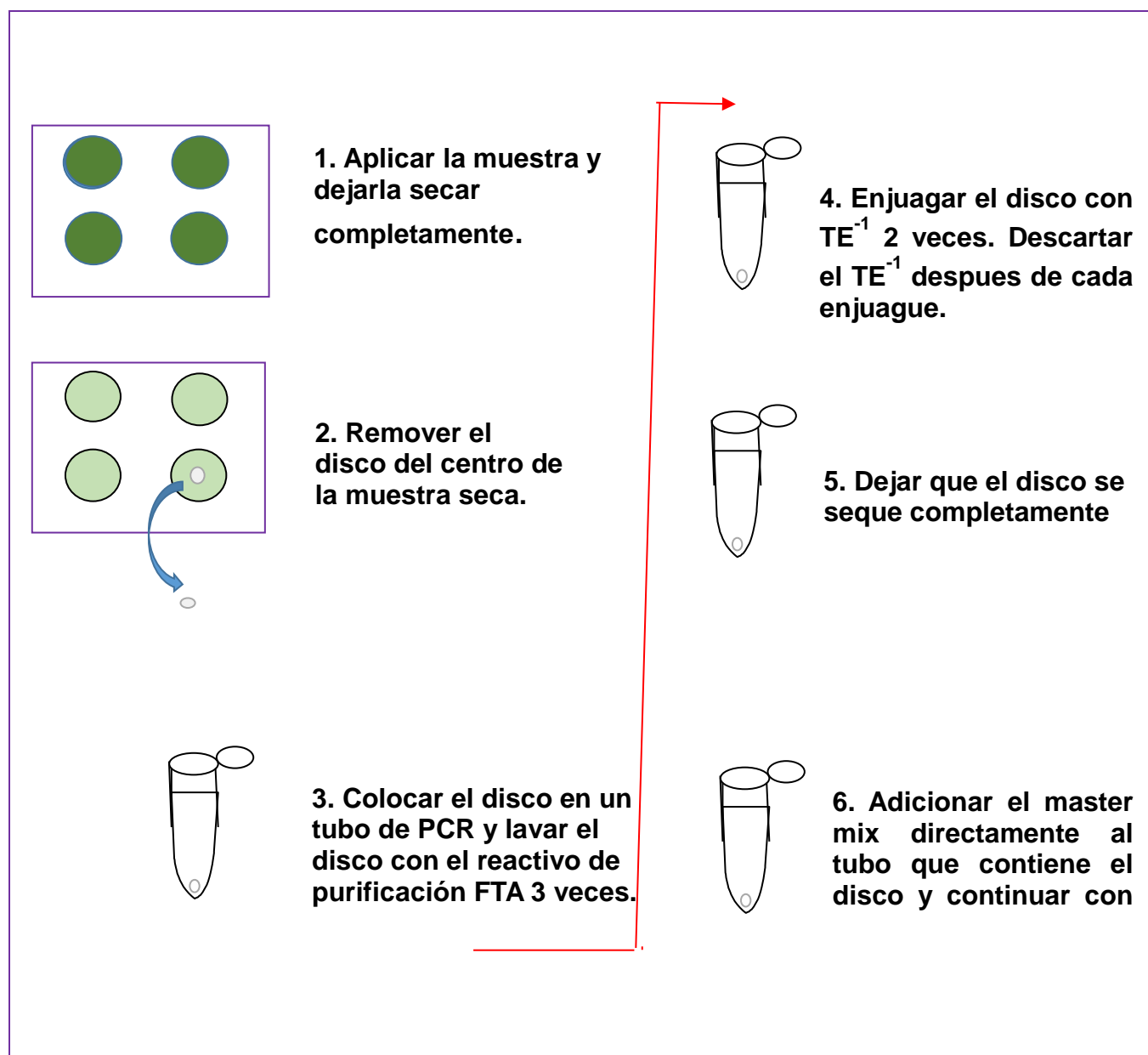


Figura 4. Extracción de ADN de *Ralstonia solanacearum* mediante tarjetas de FTA

4. Identificación molecular de *R. solanacearum*:

La técnica PCR se utiliza para confirmar la identidad taxonómica de *R. solanacearum* usando los *primers* especie-específico 759/760 (Opina et al, 1997). Esta técnica se basa en la amplificación específica de una secuencia en particular del ADN de *R. solanacearum*.

Primers:

PRIMER	SECUENCIA	REFERENCIA
759	5' GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC 3'	<u>Opina et al. (1997)</u>
760	5' GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG 3'	

PROCEDIMIENTO:

4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de un cultivo puro (como lo indicado anteriormente).

4.2 Amplificación por PCR

- Preparar del Master Mix de PCR (usando GoTaq® de PROMEGA) de acuerdo al siguiente cuadro.

Componentes con [] inicial	Volumen final en μ l	[] final
Agua NFW	8.54	
Buffer PCR (5 x)	3	1x
Cl ₂ Mg (25 mM)	1.5	2.5 mM
d NTP 10 mM de cada uno	0.3	0.2 mM
Primer 759 (10 μ M=)	0.3	0.2 μ M
Primer 760 (10 μ M)	0.3	0.2 μ M
GoTaq flexi polimerasa (5U/ μ l)	<u>0.06</u>	0.3U
	14	
ADN	<u>1</u>	
	15	

- Dispensar 14 μ l del master mix en los tubos de PCR.
- Adicionar 1ul de la suspensión de ADN (10 ng/ μ l) de la muestra,
- Colocar los tubos de PCR dentro del termociclador, cerrar y Continuar con el proceso de amplificación.

Condiciones de Amplificación:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30s	30 ciclos
T de aneling	59°C	30s	
Extensión	72°C	17s	
Extensión final	72°C	5min	1 ciclo
	4°C	∞	1 ciclo

4.3 Electroforesis (Ver protocolo de electroforesis en la página N° 22.

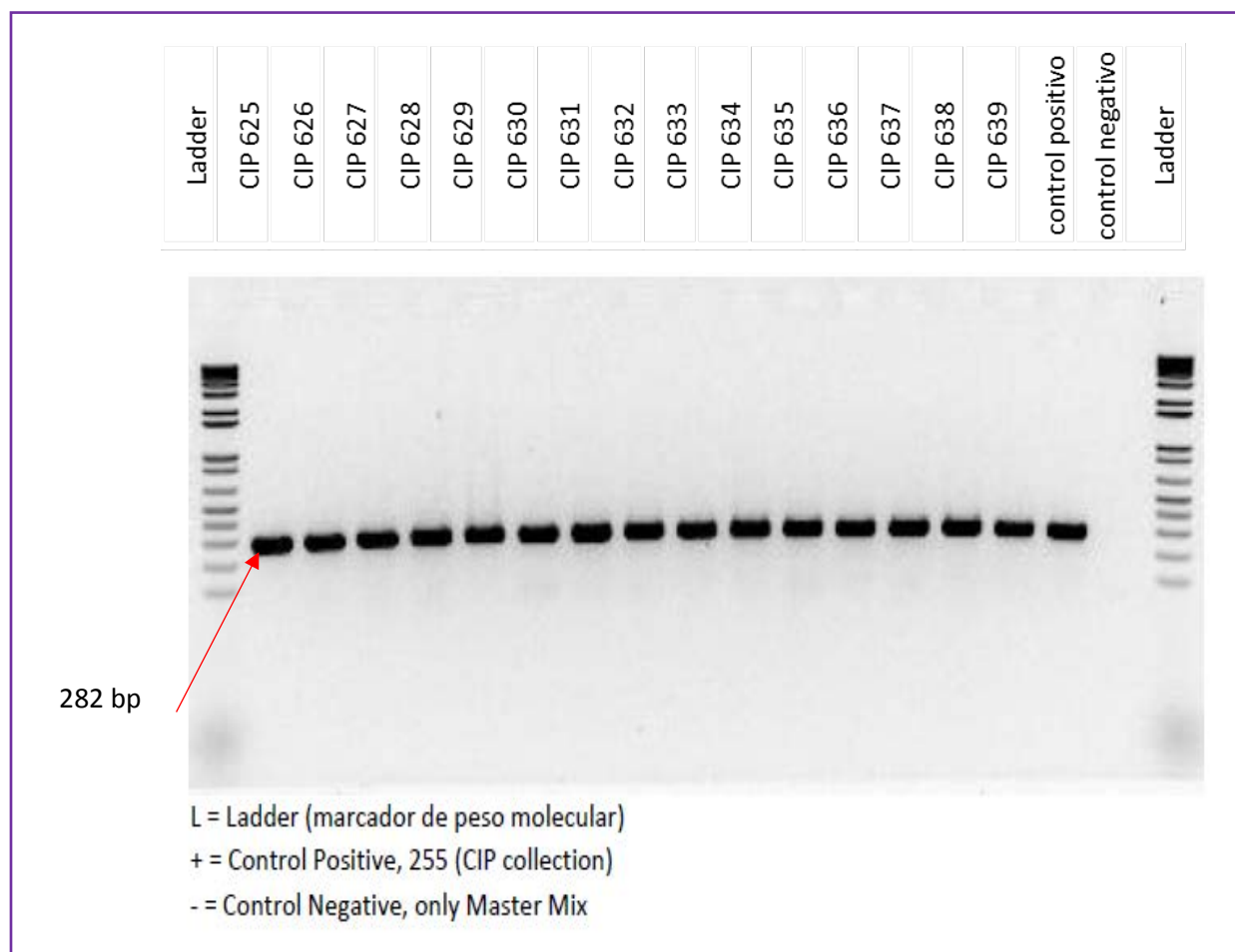


Figura 5. Un gel de PCR. Carril 1 marcador de peso molecular (1000 pb); carril 2 al 16 son cepas de María-Amazonas; carril 17 control positivo (cepa CIP-255); carril 18 control negativo; Carril 19 marcador de peso molecular (1000 pb).

6. Determinación de biovares (Bv) y fenotipos del Bv 2 (Hayward, 1964, 1976):

La determinación de Bvs de *R.solanacearum* está basada en la utilización de los disacáridos celobiosa, lactosa y maltosa, y la oxidación de los alcoholes hexosa dulcitol, manitol y sorbitol.

Diferenciación de *Ralstonia solanacearum* en biovares

Pruebas Bioquímicas	Bv 1	Bv 2A	Bv2T	Bv 3	Bv 4	Bv 5
Lactosa	-	+	+	+	-	+
Maltosa	-	+	+	+	-	+
Celobiosa	-	+	+	+	-	+
Manitol	-	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	-	+	+	-
(Tryptophano, Tartrato de NA)		-	+			

(Hayward *et al.*, 1964,1989)

Procedimiento

6.1. Preparación del medio basal

- Preparar 200 ml de medio basal (apéndice N° 3)
- Disolver todos los reactivos a excepción del agar, ajustar el pH del medio a 7,0 (color verde oliváceo) con una solución de NaOH al 40%.
- Añadir el agar y autoclavar a 121°C durante 20 minutos.
- Después de autoclavar, distribuir alícuotas de 18 ml en tubos de ensayo.
- Almacenar el medio basal a 4°C, luego disolver cuando sea necesario

6.2 Preparar soluciones al 10 % de los hidratos de carbono (disacáridos o alcoholes hexosa) según se necesite. Luego esterilizar todas las soluciones por filtración (membrana de 0,22 micras).

6.3. Preparación de las placas de poliestireno de microtitulación

- Disolver el medio basal en baño María y añadir 2ml de la solución del hidrato de carbono.
- Dispensar 0.170ml del medio en cada pocillo de la placa de poliestireno de microtitulación.

6.2. Preparación de la suspensión de inóculo

- Utilizar cultivos de la bacteria desarrollados en medio Kelman sin TZC durante dos días.
- Preparar 5ml de suspensión de inóculo (aproximadamente a una concentración de 2×10^7 ufc/ml) en agua destilada estéril.

6.3. Inoculación del medio e incubación

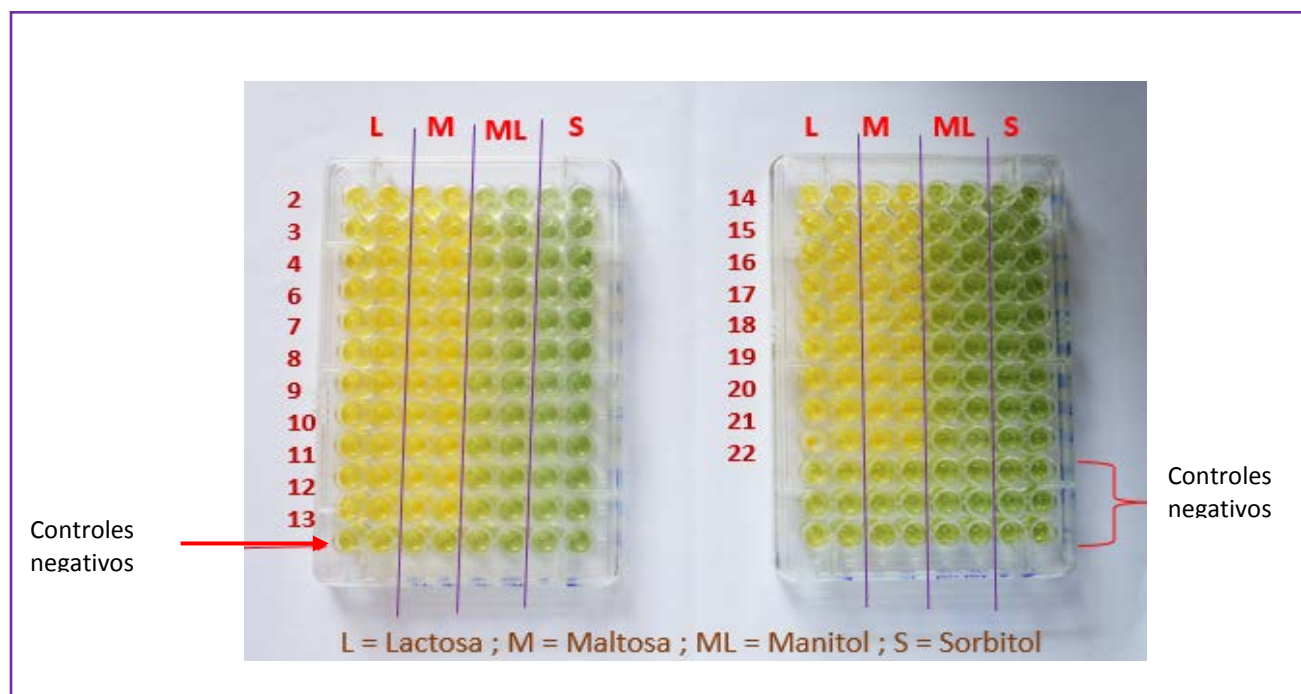
- Añadir 40µl de la suspensión de inóculo a cada hoyo de la placa de microtitulación.
- Cubrir las placas con sus respectivas tapas, sellarlas con Sran Wrap, luego colocarlas dentro de una bolsa de plástico.
- Incubar las placas a 30°C durante seis a siete días.
- Examinar para ver producción de acidez (utilización de los disacáridos u oxidación de los hexosa alcoholes) o cambio de color del medio de verde a amarillo (Figura 6).

Diferenciación del biovar 2 de *R. solanacearum* en fenotipos 2A y 2T Utilizando de D(-) ribosa o de D(+) trealosa y L(+) tartrato de sodio

- Preparar 120 ml de medio basal sin agar. Dispensar 27 ml del caldo en Erlenmeyer de 50 ml de capacidad. Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.
- Preparar una solución al 10% de cada reactivo, disolver y esterilizar por filtración (membrana de 0,22 micras).
- Añadir 3ml de cada solución a los Erlenmeyers que contienen el medio basal y luego dispensar 3 ml del medio basal que contiene la solución del reactivo en tubos de ensayo previamente esterilizados.

- Adicionar 100µl de la suspensión de inóculo a cada tubo e incubar a 30°C durante 7 días y examinar para ver si hay cambio de color del medio de verde al azul (Fig 7).

Nota: Se puede usar las placas de microtitulación para D (-) ribosa y de D(+) trealosa y el procedimiento es igual como lo indicado para la determinación de biovares



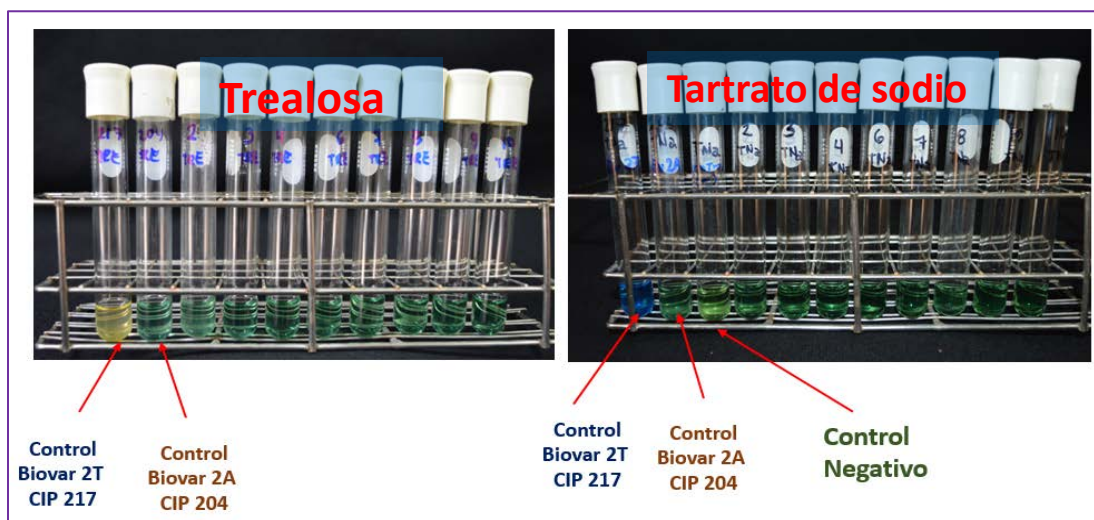


Figura 7. Determinación de los fenotipos 2A y 2T utilizando D(+) Trealose y L (+) tartrato de sodio. D(+) Trealosa positiva (cambio de color del medio de verde al amarillo) y L (+) tartrato de sodio positivo (cambio de color del medio del verde al azul) corresponden al filotipo 2T y reacción negativa con no cambio de color del medio (verde) corresponden al filotipo 2 A.

7. DETERMINACION DE FILOTIPOS DE CEPAS DE *Ralstonia solanacearum*

OBJETIVO:

Determinación de Filotipos de *R. solanacearum* (Rs) mediante un PCR múltiple basado en la información de la secuencia de la región del espacio transcrito interno o región ITS (Internal transcribed Spacer) del 16S-23S del ARNr.

FUNDAMENTO:

Este método está basado en una reacción de PCR múltiple, usando cuatro primers forward (Nmult:21:1F, Nmult:21:2F, Nmult:22: InF, Nmult:23:AF) específicos para cada filotipo y un solo primer reverse (Nmult21:RR) que es específico para las especies (Fegan y Prior 2005). De esta manera, se amplifican simultáneamente dos o más *locus* en una misma reacción. En este caso, se obtiene un producto de amplificación específico para cada uno de los filotipos (figuras 8 y 9).

Lista de los primers para la determinación de filotipos

Nombre del primer	Secuencia	Especificidad	Producto
Nmult21:1F	5'-CGTTGATGAGGCGCGCAATTT-3'	Filotipo I	144pb
Nmult21:2F	5'-AAGTTATGGACGGTGAAGTC-3'	Filotipo II	372 bp
Nmult23AF	5'-ATTACGAGAGCAATCGAAAGATT-3'	Filotipo III	91 bp
Nmult22:InF	5'-ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA-3'	Filotipo IV	213 bp
Nmult22:RR	5'-TCGCTTGACCCTATAACGAGTA-3'	Para todos los filotipos	

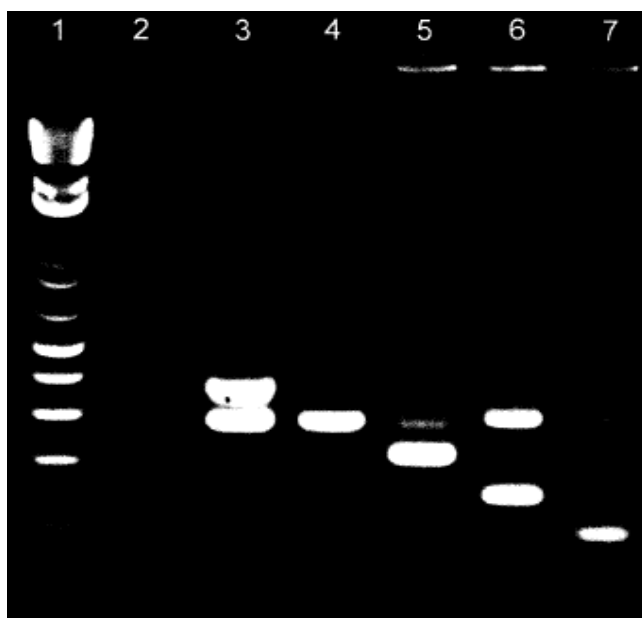


Figura 8. Ejemplo de un gel PCR múltiple. Carril 1 marcador de peso molecular (1 Kb plus); carril 2 control negativo; carril 3 una cepa representativa del Filotipo II; carril 4 ACHO 732; carril 5 una cepa representativa del Filotipo IV; carril 6 una cepa representativa del Filotipo I; carril

Fegan v Prior, 2005

PROCEDIMIENTO:**7.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN a partir de un cultivo puro (como lo indicado anteriormente).

7.2 Amplificación por PCR múltiple de la región ITS

Para la amplificación utilizar los primers indicados en el cuadro 1

- Preparar el Master Mix de PCR (usando GoTaq® de PROMEGA) de acuerdo al siguiente cuadro.

Componentes	Concentración	Volumen final en μl	Concentración
	inicial		final
Buffer G2 GoTaq Flexi PCR	5X	3	1X
MgCl ₂	25mM	1.5	2.5mM
dNTPs	10mM	0.3	0.2mM
Nmult21:1F	10 μM	0.3	0.2 μM
Nmult21:2F	10 μM	0.3	0.2 μM
Nmult23AF	10 μM	0.3	0.2 μM
Nmult22:InF	10 μM	0.3	0.2 μM
Nmult22:RR	10 μM	0.3	0.2 μM
GoTaq G2 Flexi DNA plimerasa	5U/ μl	0.06	0.03U
NFW agua		<u>7.64</u>	
		14	
ADN		<u>1</u>	
Volumen final		15 μl	

- Dispensar 14 μl del master mix en los tubos de PCR.
- Adicionar 1 μl de la suspensión de ADN (10 ng/ μl) de la muestra.
- Colocar los tubos de PCR dentro del termociclador.
- Continuar con el proceso de amplificación.

Condiciones de Amplificación:

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30s	30 ciclos
T de annealing	59°C	30s	
Extensión	72°C	23s	
Extensión final	72°C	5min	1 ciclo
	4°C	∞	1 ciclo

7.2. Electroforesis

Ver protocolo de electroforesis en la página N° 22

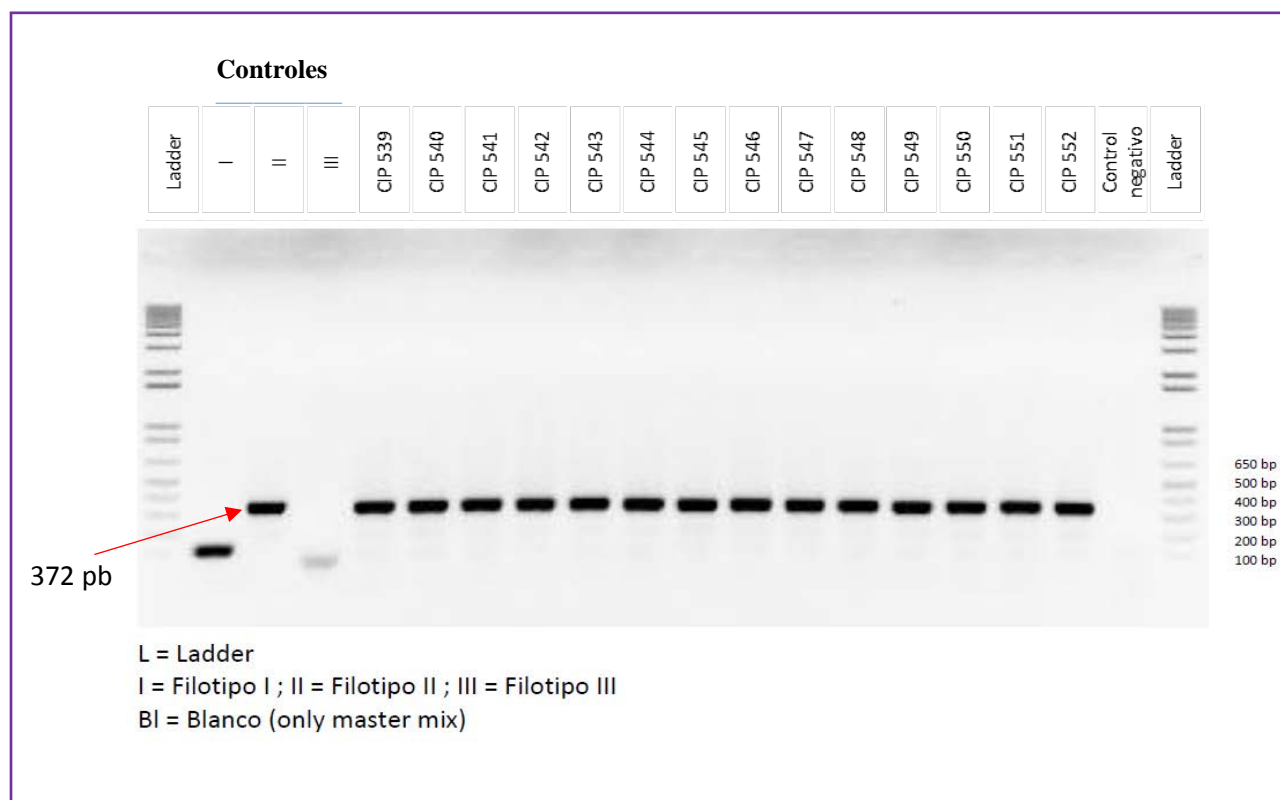


Figura 9. Un gel PCR múltiple con cepas de Chota, Cajamarca. Carril 1 marcador de peso molecular (1000 pb); carril 2,3, 4 controles de filotipo I, II y, III; carriles del 5 al 18 son cepas de Chota-Cajamarca, corresponden al filotipo II; carril 19 control negativo; carril 20 marcador de peso molecular (1000 pb).

8. AMPLIFICACIÓN DEL GEN ENDOGLUCONASA DE CEPAS DE *Ralstonia solanacearum* PARA DETERMINACIÓN DE SECUEVARES

OBJETIVO:

Amplificación del gen endogluconasa de *R. solanacearum* mediante PCR.

FUNDAMENTO:

Este procedimiento se basa en la amplificación por PCR de un fragmento de 750 pb del gen de endogluconasa (*egl*) usando un par de primers Endo-F y Endo-R (Fegan et al., 1998). El protocolo de PCR y condiciones fueron previamente descritos (Wicker et al., 2007)

Secuencia de los primers:

Nombre	Secuencia
Endo-F	5'- ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3'
Endo-R	5'-GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3'

PROCEDIMIENTO:

8.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realiza a partir de cultivo puro (ver extracción de ADN a partir de cultivo puro).

8.2. Amplificación por PCR del gen de endogluconasa

- Preparar el master Mix de PCR (usando GoTaq® de PROMEGA) de acuerdo al siguiente cuadro:

Componentes	[] inicial	Volumen Final en μL	[] final
5X Green or colorless GoTaq® Flexi	5X	15	1X
MgCl ₂ Solución	25mM	3.75	1.25mM
dNTPs	10mM	1.5	0.2mM
Cebador Endo-F	10 μM	1.5	0.2 μM
Cebador Endo-R	10 μM	1.5	0.2 μM
GoTaq® G2 Flexi DNA polymerase	5U/ μL	0.3	1.5U
Nuclease free wáter (NFW)		<u>48.45</u>	
		72	
ADN template	10ng/ μL	<u>3</u>	
Volumen Total		75	

- Dispensar 72 μL del master mix en los tubos de PCR.
- Adicionar 3 μL de suspensión de ADN (~10 ng/ μL) de la muestra.
- Colocar los tubos de PCR dentro del termociclador, cerrar.
- Continuar con el proceso de amplificación.

Condiciones de Amplificación:

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2min	x1
Desnaturalización	95°C	30s	x28
T de aneling	70°C	30s	
Extensión	72°C	50s	
Extensión final	72°C	5min	x1
Fin	4°C	∞	

8.3 Electroforesis

Realizar una corrida electroforética para verificar la cantidad y calidad de producto de PCR, usar 5µL del producto de PCR con 1µL Gel red 1:10. Protocolo de electroforesis se encuentra en la página N° 22.)

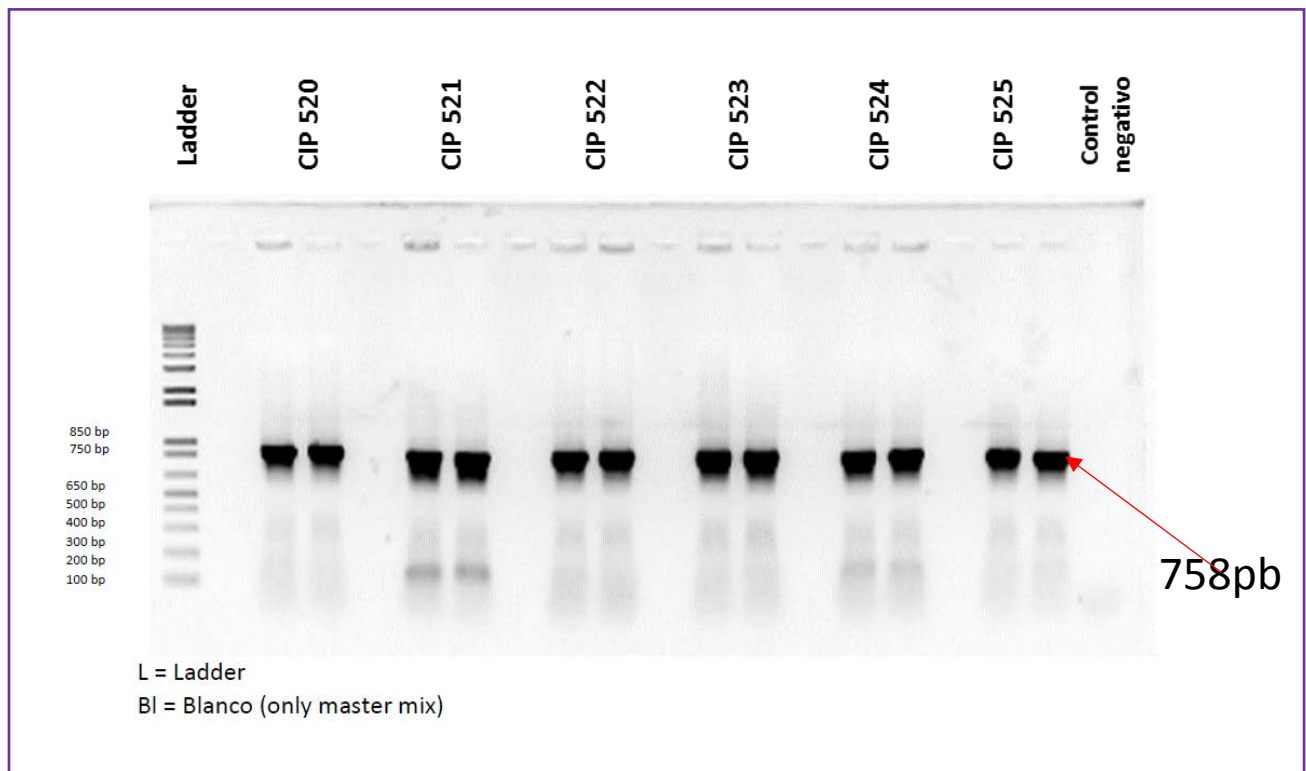


Figura 10. Un gel de amplificación por PCR de una región de 750 pb del gen de endoglucanasa usando los primers Endo-F y Endo- R (Poussier et al., 2000)

Nota: Los 70 µL de producto de PCR restante, son enviados a Macrogen para su purificación y secuenciación.

Consideraciones para el envío del producto de PCR a Macrogen

Los productos de PCR serán purificados y secuenciados por Macrogen services (Kumchunku, Korea del sur) usando los primers Endo-F and Endo-R.

Para el envío de muestras, además de los primers, se deben cumplir con ciertos requisitos para un correcto secuenciamiento, como se puede observar en el siguiente cuadro:

Plantilla Tipo / Formato	Requisitos de las muestras	observaciones
PCR producto (purificado)	- 50 ng / μ L - Volumen mínimo de 20 μ l	Para re-secuenciamiento, es necesario 5 μ L
PCR del producto (sin purificar)	- 100 ng / μ L - Volumen mínimo de 30 μ l	N / A

Nota: Para mayores detalles de los requisitos que se deben de cumplir para el envío de las muestras a secuenciar entrar a la página de macrogen.

http://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_submission.jsp

PROTOCOLO PARA LA ELECTROFORESIS

8.3.1. Preparación del gel

- Agregar 1g de agarosa para 100 ml de TBE 1X (Ver apéndice 1) y disolver en un horno de microondas.
- Añadir 1 μ l de Gel Red por cada 100 ml de gel. Mezclar suavemente.

- Vaciar el gel en un molde y poner el peine apropiado cerca de uno de los extremos del molde.
- Asegúrese de que no haya burbujas o impurezas se quedan en el camino del ADN.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta que solidifique (aproximadamente 30 minutos).
- Colocar el gel en una cámara electroforética y añadir el TBE 1X (ver Apéndice No.1) hasta que cubra el gel.

8.3.2 Preparación de la muestra para la corrida

- Agregar a cada muestra (10 μ l) y al marcador de peso molecular (5 μ l) 1ul de GELRED (diluido 1/10) y 3 μ l del loading buffer 10 X.
- Colocar cada muestra en los pocillos del gel y el ladder (marcador de peso molecular) al final y/o comienzo del gel.
- Ejecutar en el voltaje adecuado (130V por 40 minutos).
- Transcurrido el tiempo visualizar las bandas, colocando el gel bajo luz ultravioleta en un transiluminador o en el Sistema de foto-documentación Chemidoc™ MP.

APÉNDICE

1. Preparación del tampón de extracción (1000 ml): tampón de citrato pH 5,6

Composición

Ácido cítrico	1.995g
Citrato de sodio	11.907g
Agua destilada	1L

Preparación

- 1.1. Disolver el ácido cítrico en un litro de agua destilada y luego agregar lentamente el citrato de sodio, mientras se agita; ajustar el pH a 5.6.
- 1.2. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

2. Medio Kelman con TZC (French et al., 1995)

2.1. Medio basal:

Composición:

D (+)-glucose (Merk)	2.4g
Bacto Peptone (BD)	10g
Casamino acids (Difco)	1g
Agar (SIGMA ALDRICH)	15g
Agua destilada	1 000ml

Preparación

Disolver todos los reactivos en un litro de agua destilada, a excepción del agar. Una vez disueltos, agregar el agar y esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos; luego enfriar a 50°C y añadir 5 ml de la solución de TZC antes del plaqueado.

2.3. Solución TZC al 1%

Composición:

Cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TZC o TTC)	1g
Agua destilada	100ml

Preparación

Disolver el cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TZC o TTC) en 100 ml de agua destilada, colocar en un frasco a prueba de luz y autoclavar por sólo 8 minutos o esterilizar por filtración. Guardar bajo refrigeración.

3. Preparación del medio para diferenciación de biovares

3.1. Medio basal:

Composición:

Medio basal:

Fosfato monobásico de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) "MERK"	1.0 g
Cloruro de potasio (KCl) "Riel- de Haen"	0.2 g
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ "MERK"	0.2 g
Peptona "BD"	1.0 g
Azul de bromotimol (bromothymol blue) "MERK"	0.03 g
Agar "SIMA ALDRICH"	3.0 g
Agua destilada	1 000 ml

4. Tampón TE⁻¹

Compuesto	Cantidad	Concentración final
Tris-HCl 1M pH8.0	10 ml	10 mM
EDTA 0.5 M pH8.0	0.2 ml	0.1 mM
Agua destilada estéril	1000 ml	

Ajustar el pH a 8 y autoclavar a 120°C por 20 minutos.

5. Preparación del TBE 10X (pH 8)

Composición:

Trizma base	108g
Ácido bórico	55g
EDTA 0.5M pH 8	40ml
Agua destilada	1000ml

Ajustar el pH y autoclavar a 120°C por 20 minutos.

6. Preparación del GEL red 1/10 (proteger de la luz)

Composición:

Gel red puro (10000X)	1.8µl
Nuclease free water (NFW)	16.2µl

REFERENCIAS

- Fegan, M., Prior, P., 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (Eds.), Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, Madison, pp. 449–462.
- French, E.R. et al. 1995. Culture media for *Pseudomonas solanacearum*: isolation, identification and maintenance. *Fitopatología* 30: 126 - 130.
- Gutarra, L. et al. 2015. Variation of resistance to different strains of *Ralstonia solanacearum* in highland tropics adapted potato genotypes. *Am. J. Potato Res.* 92 (2): 258 – 265.
- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 27(2), 265-77.
- Hayward, A.C.; H.M. El-Nashaar, L. De Lindo and U. Nydegger, 1989. The use of microtiter plates in the phenotypic characterization of phytopathogenic Pseudomonads. Proc 7th. Int. Conf plant Pathog. Bact., Budapets, Hungary. Pages 593-598.
- Opina N, Tavner F, Holloway G, Wang JF, Li TH, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW, Timmis JN, 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 5, 19-30.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., and Prior, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl Environ Microbiol* 73(21): 6790–6801.