

## Diagnóstico de *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* mediante hibridación molecular con sondas de DNA no radioactivas

S. LLAMAS, M. T. SEISDEDOS Y C. NOVAL

Dos cepas de *Clavibacter michiganense* subsp. *sepeconicum*, ocho de *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, siete de *Arthrobacter* sp. y treinta de saprofitos fueron sometidas a un proceso de hibridación con dos sondas específicas de *C.m.* subsp. *sepedonicum*, a fin de comparar su especificidad y sensibilidad en la detección del agente causante de la Podredumbre anular de la patata.

S. LLAMAS, M. T. SEISDEDOS y C. NOVAL. Subdirección General de Sanidad Vegetal. Juan Bravo, 3-B 28006 Madrid.

**Palabras clave:** *C. m.* subsp. *sepedonicum*, sondas de DNA.

### INTRODUCCION

La especificidad y conservación de las secuencias de ácidos nucleicos dentro de una especie, la facultad de separación de sus dos cadenas al ser sometidas a altas temperaturas, la posibilidad de su fijación a membranas de nylon o de nitrocelulosa y la capacidad de unión de las cadenas a sus complementarias, ha permitido utilizar fragmentos específicos de ácidos nucleicos marcados—sondas— para la detección de organismos nocivos al hombre (ROSEN, 1987), animales (EDELSTEIN, 1986) y plantas (SCHAAD *et al.*, 1986).

El incremento del comercio internacional hace que cada día revistan más importancia los métodos de diagnóstico que se emplean en análisis de material vegetal, especialmente cuando se trata de muestras asintomáticas, como posibles portadoras de organismos dañinos no existentes en una determinada zona geográfica.

*Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* (Spieck. & Kotth.) Davis *et al.* (C.m.s.) es el agente causal de la Podredumbre anular de la patata, enfermedad que se transmite principalmente de forma mecánica a través de tubérculos de siembra infectados. El hecho que la enfermedad pueda controlarse de forma efectiva mediante la plantación de material sano ha impulsado numerosos trabajos para mejorar las técnicas que permitan detectar la bacteria y evitar así su instalación en áreas libres del patógeno.

Con objeto de perfeccionar el método oficial de análisis (ANONYMUS, 1987), el Grupo de Expertos de la CE en enfermedades bacterianas de las plantas comenzó ensayos comparativos para la detección del parásito utilizando técnicas de hibridación molecular con sondas de DNA. Las pruebas fueron realizadas paralelamente en 11 países de los Estados Miembros.

En este artículo se exponen los resultados obtenidos por el Laboratorio de la Subdirección General de Sanidad Vegetal, en donde sólo se han empleado sondas no radioactivas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivos y mantenimiento de las bacterias

Los 47 microorganismos objeto del estudio, con su identificación y origen, se especifican en el Cuadro 1. En ella figuran 2 aislados de *C.m.s.*, 8 del agente causante del Marchitamiento bacteriano de la alfalfa, *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum* (McCulloch) Davis *et al.* (*C. m. i.*), 7 del género *Arthrobacter* y 30 saprofitos. La

inclusión de los *C.m.i.* y de los *Arthrobacter* se debe al alto grado de parentesco que presentan sus células con las del *C.m.s.* Los saprofitos no identificados fueron obtenidos en análisis de tubérculos de patatas sanos y su reacción de Gram (Cuadro 2) fue estimada en base a la solubilidad en KOH (RYU, 1938).

Los aislados se multiplicaron a 24-28° C en Y.P.G.A. (Extracto de levadura, 5 g.; bactopectona, 5 g.; glucosa monohidrato, 10 g.; agar, 15 g.; agua destilada, 1 l.).

Cuadro 1.— Identidad y origen de los aislados.

Aislado	Identidad	Hospedante	País
PD 37	<i>C.m.s.</i>	Patata	USA
PD 323	<i>C.m.s.</i>	"	USA
PD 239	<i>C.m.i.</i>	Alfalfa	USA
LMG 3675	<i>C.m.i.</i>	"	—
LMG 3676	<i>C.m.i.</i>	"	—
LMG 7323	<i>C.m.i.</i>	"	USA
7324r1	<i>C.m.i.</i>	"	USA
7324r2	<i>C.m.i.</i>	"	USA
LMG 7325 t1	<i>C.m.i.</i>	"	Nueva Zelanda
LMG 732 5 t2	<i>C.m.i.</i>	"	Nueva Zelanda
NCIMB 8910	<i>A. pascens</i>	Suelo agrícola	—
NCIMB 8912	<i>A. aurescens</i>	—	—
NCMIB 9066	<i>A. ramosus</i>	Suelo forestal	—
NCMIB 9333	<i>A. oxydans</i>	Aire, hojas de tabaco	—
NCMIB 9499	<i>A. chrysallopoites</i>	Suelo	—
NCMIB 9541	<i>A. histidinolorans</i>	Suelo	—
NCMIB 10627	<i>A. polychromogenes</i>	—	—
S <sub>1</sub> a S <sub>22</sub>	Desconocido	Patata	Canadá
S <sub>23</sub> a S <sub>30</sub>	Desconocido	"	Suiza

PD= Culture Collection of Plant Protection Service. Wageningen, the Netherlands.

LMG= Laboratorium Microbiology Gent Culture Collection, Rijksuniversiteit, Belgique.

NCIMB= The National Collection of Industrial and Marine Bacteria. Torry Research Station Aberdeen, Schotland, U. K.

*C.m.s.*= *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*.

*C.m.i.*= *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*.

A.= *Arthrobacter*.

S.= Saprofito sin identificar aislado en el laboratorio.

Cuadro 2.— **Reacción Gram de los saprofitos.**

Gram positivo	Gram negativo
S-2	S-1
S-4	S-3
S-7	S-5
S-9	S-6
S-10	S-8
S-11	S-12
S-14	S-13
S-23	S-15
S-24	S-16
S-25	S-17
S-26	S-18
S-27	S-19
S-28	S-20
S-29	S-21
S-30	S-22

### Sondas

Las dos sondas comerciales ensayadas han sido: SEP 1, desarrolladas por el Genetic Engineering Group. Lyngby, Dinamarca (JOHANSEN, *et al.*, 1989) y la sonda Diagen para *C.m.s.* obtenida en Dusseldorf (Alemania) por la compañía Diagen.

Ambas sondas fueron marcadas de manera no radioactiva mediante biotina con el kit "BioNick™ Labelling System" de la compañía BRL, siguiendo el protocolo recomendado por ésta.

### Extracción y purificación de ácidos nucleicos

La multiplicación bacteriana fue obtenida por inoculación de 50 ml. de YPG (Extracto de levadura, 5 g.; bactopectona, 5 g.; glucosa monohidrato, 10 g.; agua destilada, 1 l.; pH 7.2) con cada uno de los aislados pre-cultivados sobre YPGA a 24-28° C. Los caldos fueron dejados en incubación de 1 a 4 días, a temperatura ambiente, sobre un agitador rotatorio y 5 ml. de cada uno fueron conser-

vados a -20° C, mientras se determinaba su concentración bacteriana por recuento del número de colonias aparecidas en el medio de cultivo al sembrar 50 µl. En el Cuadro 3 se exponen los períodos de precultivo, cultivo y la concentración bacteriana resultante.

Una escala de viales conteniendo 1 ml. de las concentraciones 10<sup>8</sup> a 10<sup>1</sup> cel./ml. fue preparada a partir de los cultivos de *C.m.s.*, seleccionándose para los restantes microorganismos viales con una concentración de 10<sup>8</sup> cel./ml. o ligeramente superior. Todos ellos fueron conservados a -20° C hasta comenzar con las extracciones de los ácidos nucleicos.

Los cultivos, recolectados de los viales por centrifugación a 10.000xg durante 5 minutos, fueron lisados a temperatura ambiente con 150 µl de : 50 mM glucosa, 10 mM EDTA pH 8, 25 mM Tris-HCL pH 8 incorporándose lisocima fresca a una concentración final de 4 mg./ml. Transcurrida 1 hora se añadieron 30 µl. de Dodecil sulfato sódico (SDS) 10 % y después de permanecer a temperatura ambiente 5 minutos (para que el SDS completase la acción de lisis) se agregaron 200 µl. de tampón TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM- EDTA) pH 8.

Con objeto de purificar los ácidos nucleicos los cultivos fueron sometidos a tres procesos de lavado con 400 µl. de fenol pH 7,5, equilibrado con Tris-HCL pH 8 (Sambrook, 1989), 400 µl. de fenol-cloroformo (en cantidades iguales) y 400 µl. de cloroformo, siendo centrifugados durante 5 minutos a 10,000xg. Como después del proceso de centrifugación los ácidos nucleicos se localizan en la parte superior del sobrenadante, volúmenes de 350, 280 y 200 µl. fueron cuidadosamente separados de la última capa y transferidos a nuevos viales en cada proceso de lavado.

Para precipitar los ácidos nucleicos se añadió 1 ml. de etanol 96 por 100 a -20° C conteniendo acetato sódico 0,2M pH 5,4, se dejó durante 1 hora a -20° C y se centrifugó a 12.000xg. durante 30 minutos; los precipitados fueron resuspendidos en 1 ml. de etanol 70 por 100 a -20° C (que contenía como ante-

Cuadro 3.— Condiciones de la multiplicación bacteriana y concentración obtenida.

CEPAS	Multiplicación		Concentración bacteriana		
	Precultivo en YPGA (días)	Cultivo en YPG (días)	D	N	C
PD 37	7	2	10 <sup>-6</sup>	205	4,1.10 <sup>9</sup>
PD 323	7	2	10 <sup>-6</sup>	79	1,5.10 <sup>9</sup>
PD 239	5	2	10 <sup>-6</sup>	53	1,0.10 <sup>9</sup>
LMG 3675	4	2	10 <sup>-6</sup>	42	8,4.10 <sup>8</sup>
LMG 3676	1	4	10 <sup>-6</sup>	43	8,6.10 <sup>8</sup>
LMG 7323	2	2	10 <sup>-6</sup>	204	4,0.10 <sup>9</sup>
7324 r <sub>1</sub>	6	3	10 <sup>-6</sup>	42	8,4.10 <sup>8</sup>
7324 r <sub>2</sub>	6	3	10 <sup>-8</sup>	242	4,8.10 <sup>11</sup>
LMG 7325 t <sub>1</sub>	3	2	10 <sup>-5</sup>	46	9,2.10 <sup>7</sup>
LMG7325 t <sub>2</sub>	3	2	10 <sup>-8</sup>	131	2,6.10 <sup>11</sup>
NC1MB 8910	4	2	10 <sup>-8</sup>	136	2,7.10 <sup>11</sup>
NC1MB 8912	5	2	10 <sup>-8</sup>	76	1,5.10 <sup>11</sup>
NC1MB 9066	4	3	10 <sup>-6</sup>	180	3,6.10 <sup>9</sup>
NC1MB 9333	4	3	10 <sup>-6</sup>	97	1,9.10 <sup>9</sup>
NC1MB 9499	4	2	10 <sup>-6</sup>	35	7,0.10 <sup>8</sup>
NC1MB 9541	4	3	10 <sup>-9</sup>	34	6,8.10 <sup>11</sup>
NC1MB 10267	5	3	10 <sup>-6</sup>	97	1,9.10 <sup>9</sup>
S - 1	2	2	10 <sup>-6</sup>	33	6,6.10 <sup>8</sup>
S - 2	4	1	10 <sup>-7</sup>	36	7,2.10 <sup>9</sup>
S - 3	5	2	10 <sup>-5</sup>	64	1,2.10 <sup>8</sup>
S - 4	4	1	10 <sup>-8</sup>	79	1,5.10 <sup>11</sup>
S - 5	2	2	10 <sup>-6</sup>	94	1,8.10 <sup>9</sup>
S - 6	2	2	10 <sup>-6</sup>	78	1,5.10 <sup>9</sup>
S - 7	2	1	10 <sup>-6</sup>	50	1,0.10 <sup>9</sup>
S - 8	2	2	10 <sup>-6</sup>	39	7,8.10 <sup>8</sup>
S - 9	2	1	10 <sup>-6</sup>	143	2,8.10 <sup>9</sup>
S-10	2	1	10 <sup>-6</sup>	44	8,8.10 <sup>8</sup>
S-11	4	1	10 <sup>-5</sup>	104	2,0.10 <sup>8</sup>
S-12	2	1	10 <sup>-6</sup>	95	1,9.10 <sup>9</sup>
S-13	3	1	10 <sup>-7</sup>	81	1,6.10 <sup>10</sup>
S-14	3	1	10 <sup>-7</sup>	66	1,3.10 <sup>10</sup>
S-15	4	1	10 <sup>-7</sup>	90	1,8.10 <sup>10</sup>
S-16	2	2	10 <sup>-7</sup>	100	2,0.10 <sup>10</sup>
S-17	2	1	10 <sup>-6</sup>	140	2,8.10 <sup>9</sup>
S-18	5	1	10 <sup>-5</sup>	48	9,6.10 <sup>7</sup>
S-19	2	2	10 <sup>-5</sup>	50	1,0.10 <sup>8</sup>
S-20	2	1	10 <sup>-8</sup>	59	1,1.10 <sup>11</sup>
S-21	2	1	10 <sup>-8</sup>	60	1,2.10 <sup>11</sup>
S-22	2	1	10 <sup>-8</sup>	60	1,2.10 <sup>11</sup>
S-23	1	1	10 <sup>-5</sup>	80	1,6.10 <sup>8</sup>
S-24	3	1	10 <sup>-7</sup>	46	9,2.10 <sup>9</sup>
S-25	2	1	10 <sup>-7</sup>	210	4,2.10 <sup>10</sup>
S-26	3	1	10 <sup>-5</sup>	200	4,0.10 <sup>8</sup>
S-27	2	1	10 <sup>-7</sup>	200	4,0.10 <sup>10</sup>
S-28	2	1	10 <sup>-7</sup>	215	4,3.10 <sup>10</sup>
S-29	4	1	10 <sup>-5</sup>	150	3,0.10 <sup>8</sup>
S-30	4	1	10 <sup>-5</sup>	170	3,4.10 <sup>8</sup>

D= Diluición seleccionada (entre 30-300 colonias por placa) para conteo.

N= Número de colonias.

C= Concentración inicial.

riormente acetato sódico) y centrifugados a 10.000xg. durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron eliminados en su totalidad por inversión de los viales durante 1 hora, y los precipitados fueron resuspendidos en 90 µl. de TE pH 8 para ser conservados a -20° C hasta su aplicación en la membrana.

### Distribución y fijación de las muestras sobre las membranas de nylon

Las membranas de nylon, suministradas con el kit de detección, fueron empaçadas durante dos minutos en agua destilada y saturadas en 10 X SSC (CINa, 1,5M; Citrato sódico dihidrato, 0,15M; agua destilada hasta 1 l.; pH 7,0) antes de ser colocadas en el aparato "manifold" (Hybrid Dot Mani-

fold, BRL) siendo éste conectado a una bomba de vacío como paso previo a la aplicación de muestras.

A las suspensiones de ácidos nucleicos se les incorporaron 300 µl. de solución "dot-blot" (7,5 % formaldehído, 10 X SSC). Los viales fueron calentados a 95° C durante 15 minutos y enfriados en hielo mientras se procedía a la aplicación de las muestras en el "manifold". En cada pocillo se depositó un volumen aproximado de 350 µl.

Los cuadros 4,5 y 6 reflejan la distribución de las muestras sobre las membranas de nylon.

Cuando todos los pocillos quedaron vacíos se desconectó la bomba. Para fijar los ácidos nucleicos las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente, se colocaron entre papel de filtro y se sometieron durante 2 horas a una temperatura de 80° C.

Cuadro 4.— Distribución de las muestras sobre las membranas (cepa/concentración) para los ensayos de sensibilidad: n°1 (sonda SEP-1) y n°2 (sonda DIAGEN).

	1	2	3	4
A	323 10 <sup>8</sup>	323 10 <sup>8</sup>	37 10 <sup>1</sup>	37 10 <sup>1</sup>
B	323 10 <sup>7</sup>	323 10 <sup>7</sup>	37 10 <sup>2</sup>	37 10 <sup>2</sup>
C	323 10 <sup>6</sup>	323 10 <sup>6</sup>	37 10 <sup>3</sup>	37 10 <sup>3</sup>
D	323 10 <sup>5</sup>	323 10 <sup>5</sup>	37 10 <sup>4</sup>	37 10 <sup>4</sup>
E	323 10 <sup>4</sup>	323 10 <sup>4</sup>	37 10 <sup>5</sup>	37 10 <sup>5</sup>
F	323 10 <sup>3</sup>	323 10 <sup>3</sup>	37 10 <sup>6</sup>	37 10 <sup>6</sup>
G	323 10 <sup>2</sup>	323 10 <sup>2</sup>	37 10 <sup>7</sup>	37 10 <sup>7</sup>
H	323 10 <sup>1</sup>	323 10 <sup>1</sup>	37 10 <sup>8</sup>	37 10 <sup>8</sup>

Cuadro 5.— Distribución de las muestras sobre las membranas (cepa/concentración) para los ensayos de especificidad: n°3 (sonda SEP-1) y n°4 (sonda DIAGEN).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	—	323 10 <sup>8</sup>	S-1 ≥10 <sup>8</sup>	S-9 ≥10 <sup>8</sup>	S-17 ≥10 <sup>8</sup>	S-25 ≥10 <sup>8</sup>	239 ≥10 <sup>8</sup>	9333 ≥10 <sup>8</sup>	7324r <sub>1</sub> ≥10 <sup>8</sup>
B	—	323 10 <sup>7</sup>	S-2 ≥10 <sup>8</sup>	S-10 ≥10 <sup>8</sup>	S-18 ≥10 <sup>8</sup>	S-26 ≥10 <sup>8</sup>	7323 ≥10 <sup>8</sup>	8910 ≥10 <sup>8</sup>	7324r <sub>2</sub> ≥10 <sup>8</sup>
C	—	323 10 <sup>6</sup>	S-3 ≥10 <sup>8</sup>	S-11 ≥10 <sup>8</sup>	S-19 ≥10 <sup>8</sup>	S-27 ≥10 <sup>8</sup>	3675 ≥10 <sup>8</sup>	8912 ≥10 <sup>8</sup>	—
D	—	323 10 <sup>5</sup>	S-4 ≥10 <sup>8</sup>	S-12 ≥10 <sup>8</sup>	S-20 ≥10 <sup>8</sup>	S-28 ≥10 <sup>8</sup>	3676 ≥10 <sup>8</sup>	9066 ≥10 <sup>8</sup>	—
E	—	323 10 <sup>4</sup>	S-5 ≥10 <sup>8</sup>	S-13 ≥10 <sup>8</sup>	S-21 ≥10 <sup>8</sup>	S-29 ≥10 <sup>8</sup>	7325t <sub>1</sub> ≥10 <sup>8</sup>	9541 ≥10 <sup>8</sup>	—
F	—	323 10 <sup>3</sup>	S-6 ≥10 <sup>8</sup>	S-14 ≥10 <sup>8</sup>	S-22 ≥10 <sup>8</sup>	S-30 ≥10 <sup>8</sup>	7325t <sub>2</sub> ≥10 <sup>8</sup>	9499 ≥10 <sup>8</sup>	—
G	—	323 10 <sup>2</sup>	S-7 ≥10 <sup>8</sup>	S-15 ≥10 <sup>8</sup>	S-23 ≥10 <sup>8</sup>	—	—	10267 ≥10 <sup>8</sup>	—
H	—	323 10 <sup>1</sup>	S-8 ≥10 <sup>8</sup>	S-16 ≥10 <sup>8</sup>	S-24 ≥10 <sup>8</sup>	—	—	—	—

Cuadro 6.— Distribución de las muestras sobre las membranas (cepa/concentración) para los ensayos de especificidad: n°5 (sonda SEP-1) y n°6 (sonda DIAGEN).

	1	2	3	4
A	—	323 10 <sup>8</sup>	239 ≥10 <sup>8</sup>	9333 ≥10 <sup>8</sup>
B	—	323 10 <sup>7</sup>	7323 ≥10 <sup>8</sup>	8910 ≥10 <sup>8</sup>
C	—	323 10 <sup>6</sup>	3675 ≥10 <sup>8</sup>	8912 ≥10 <sup>8</sup>
D	—	323 10 <sup>5</sup>	3676 ≥10 <sup>8</sup>	9066 ≥10 <sup>8</sup>
E	—	323 10 <sup>4</sup>	7325t <sub>1</sub> ≥10 <sup>8</sup>	9541 ≥10 <sup>8</sup>
F	—	323 10 <sup>3</sup>	7325t <sub>2</sub> ≥10 <sup>8</sup>	9499 ≥10 <sup>8</sup>
G	—	323 10 <sup>2</sup>	7323r <sub>1</sub> ≥10 <sup>8</sup>	10267 ≥10 <sup>8</sup>
H	—	323 10 <sup>1</sup>	7323r <sub>2</sub> ≥10 <sup>8</sup>	—

### Prehibridación, hibridación y detección

La prehibridación, hibridación y detección fueron realizadas siguiendo, con algunas modificaciones, el protocolo recomendado por la Compañía Gibco BRL para el kit PhotoGene™ Nucleic Acid Detection System. Las cantidades de solución de hibridación empleadas fueron de 0,05 ml. y 0,10 ml. por cm<sup>2</sup> de membrana con las sondas SEP<sub>1</sub> y Diagen respectivamente; las temperaturas a las que se realizaron los lavados en 0,1 x SSC conteniendo 1 % SDS fueron 50, 60 y 65° C; el volumen de solución de bloqueo utilizado fue de 1 ml. por cm<sup>2</sup> de membrana; el tiempo que estuvieron sumergidas en 1 x tampón final de lavado fue de 90 minutos y la permanencia con el agente de detección en oscuridad a 37° C de 30 minutos. Los períodos de exposición de las membranas a películas X-AR (Kodak Rochester, New York) fueron de 2, 5, 10 y 15 minutos, su revelado en Kodak LX 24 de 5 minutos y la fijación con Kodak X-Ray fixer AL-4 de 5 minutos.

### RESULTADOS

Se realizaron seis ensayos de hibridación con extractos de ácidos nucleicos procedentes de cultivos puros que sirvieron para determinar tanto la sensibilidad de las sondas SEP<sub>1</sub> y Diagen frente a *C.m.s.*, como la especificidad de las mismas cuando fueron hibridadas con otras bacterias.

Los ensayos números 1 y 2, se proyectaron para determinar la sensibilidad de las sondas en nuestras condiciones de trabajo. Fueron realizados con extractos procedentes de las cepas 323 y 37 a concentraciones comprendidas entre 10<sup>8</sup> y 10<sup>1</sup> cel./ml. y aplicadas las muestras sobre las membranas según la distribución que figura en el cuadro 4; las membranas fueron lavadas con 0,1 x SSC conteniendo 1 % SDS a 60° C. Se detectó la existencia de *C.m.s.* a una concentración  $\geq 10^6$  cel./ml. al emplear la sonda Diagen y análogos resultados fueron obtenidos con la sonda SEP<sub>1</sub> cuando los extractos procedían de la cepa 323, mientras que en el

caso de la cepa 37 las señales positivas requirieron concentraciones  $\geq 10^7$  cel./ml.

En los ensayos números 3 y 4, planteados con objeto de estudiar la especificidad de las sondas y en los que las membranas fueron lavadas con 0,1x SSC conteniendo 1 % SDS a 65° C se incluyeron: 30 extractos procedentes de saprofitos aislados de patatas, 8 correspondientes a *C.m.i.*, 7 a *Arthrobacter* sp. y 8 de la cepa *C.m.s.* 323. Para los extractos de *C.m.s.* las concentraciones empleadas fueron las mismas que en los ensayos precedentes optándose por concentraciones  $\geq 10^8$  cel/ml para los extractos de las muestras restantes según la distribución que figura en el cuadro 5. Al utilizar la sonda SEP<sub>1</sub> se obtuvieron señales positivas con los saprofitos S-10 y S-12, las cepas 239, 7323, 3675, 3676 y 7325t<sub>1</sub> de *C.m.i.* Y con *C.m.s.* 323, para una concentración  $\geq 10^7$  cel/ml. Los resultados obtenidos con la sonda Diagen fueron bastante similares excepto para los saprofitos en los que no existió interferencia.

Con objeto de comparar la influencia de la temperatura de lavado con 0,1 x SSC conteniendo 1 % SDS en la visualización de las señales y sensibilidad de las sondas al emplear una temperatura de 50° C, se realizaron los ensayos números 5 y 6 en los que se aplicaron las mismas muestras que en los ensayos números 3 y 4 con excepción de los saprofitos, mostrándose la distribución efectuada en el Cuadro 6. Con la sonda SEP<sub>1</sub> se obtuvieron señales positivas para *C.m.s.* con concentraciones  $\geq 10^6$  cel/ml y con las cepas de *C.m.i.* 239, 7323 y 3675. En el caso de la sonda Diagen las señales positivas afectaron a *C.m.i.* 239, 7323, 3676 y 7325t<sub>1</sub>. Con esta sonda la detección de *C.m.s.* 323, se produjo a concentraciones  $\geq 10^5$  cel/ml.

El cuadro 7 presenta un resumen de ensayos y resultados.

### DISCUSION

Ambas sondas podrían ser utilizadas en la detección de *C.m.s.* Sin embargo, en las condiciones que hemos elegido para la realización de los ensayos, parece existir una ligera

Cuadro 7.— Resumen de ensayos y resultados.

Ensayo nº	Distribución de muestras	Sonda	Tª lavado	Extracto de	Señales	Concentración
1	Cuadro 4	SEP 1	60° C	C.m.s.: 37		e≥10 <sup>7</sup>
2	Cuadro 4	Diagen	60° C	C.m.s.: 323		e≥10 <sup>6</sup>
3	Cuadro 5	SEP 1	65° C	C.m.s.: 37		e≥10 <sup>6</sup>
				C.m.s.: 323		e≥10 <sup>6</sup>
				C.m.s.: 323		e≥10 <sup>7</sup>
				C.m.m.: 239, 7323, 3675, 3676, 7325 t <sub>1</sub>		e≥10 <sup>8</sup>
4	Cuadro 5	Diagen	65° C	Sapropitos: S-10 y S-12		e≥10 <sup>8</sup>
				C.m.s.: 323		e≥10 <sup>7</sup>
				C.m.i.: 239, 7323, 3675, 3676, 7325 t <sub>1</sub>		e≥10 <sup>8</sup>
5	Cuadro 6	SEP 1	50° C	C.m.s.: 323		e≥10 <sup>6</sup>
6	Cuadro 6	Diagen	50° C	C.m.i.: 239, 7323 y 3675		e≥10 <sup>8</sup>
				C.m.s.: 323		e≥10 <sup>5</sup>
				C.m.i.: 239, 7323, 3675, 3676, 7325 t <sub>1</sub>		e≥10 <sup>8</sup>



ventaja de la sonda Diagen frente a la sonda SEP<sub>1</sub> ya que las concentraciones mínimas detectadas de *C.m.s.* han sido 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cel/ml para la primera, mientras que se ha necesitado una concentración de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cel/ml con la segunda.

Con las dos sondas se han obtenido señales positivas al aplicar diferentes extractos bacterianos. Concretamente al hibridar con la sonda SEP<sub>1</sub> dieron falsas señales positivas diversas cepas de *C.m.i.* y dos de nuestros saprofitos. Mientras que la interferencia de *C.m.i.* no representaría un grave problema desde un punto de vista práctico, al ser un patógeno de la alfalfa, no ocurre lo mismo con los saprofitos que han sido aislados de tubérculos de patata.

El motivo de utilizar distintas temperaturas de lavado 0,1 x SSC conteniendo 1% SDS en los diferentes ensayos se debió a que menores temperaturas dificultan la eliminación de

hibridaciones inespecíficas dando lugar a un alto ruido de fondo que puede impedir la detección de señales positivas; del mismo modo, al realizar este lavado a altas temperaturas cabe la posibilidad de que bajas concentraciones celulares no sean detectadas. Es por ello que en el ensayo número 5, donde se realizó el lavado a 50° C, no se detectaron señales de *C.m.i.* 3676 y 7325t<sub>1</sub>, siendo éstas patentes en el ensayo número 3, donde el lavado se realizó a 65° C, al ser menor el ruido de fondo. Por consiguiente, la temperatura de lavado más adecuada parece ser de 60° C porque pueden detectarse concentraciones a partir de 10<sup>6</sup> cel./ml. con un ruido de fondo prácticamente inexistente.

La utilización de estas sondas, bajo nuestras condiciones de trabajo, presenta el inconveniente de la no detección de infecciones latentes, si la concentración de *C.m.s.* es inferior a 10<sup>5</sup> cel./ml.

#### ABSTRACT

LLAMAS, S.; M. T. SEISDEDOS; C. NOVAL, (1993): Diagnóstico de *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* mediante hibridación molecular con sondas de DNA no radiactivas. *Bol. San. Veg. Plagas*, 19(1): 69-77.

Two strains of *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, seven *Arthrobacter* eight sp. and thirty saprophyte bacterias were hybrid by a dot-blot Technique with two specific probes in order to compare those probes in their specificity and in their sensitivity for the detection of the Potato Ring Rot bacterium.

**Key words:** *C.m.* subsp. *sepedonicum*, DNA probes.

#### REFERENCIAS

- ANONYMUS, 1987: Scheme for the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. *Commission of European Communities* publ. EUR. 1288, Luxemburg, 21 pp.
- EDELSTEIN, P. H., 1986: Evaluation of the Gen-probe DNA probe for the detection of *Legionella* in culture. *J. Clin. Microbiol.*, 23: 481-484.
- JOHANSEN, I.E.; RASMUSSEN, O. F.; Heide, M., 1989: Specific identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* by DNA- Hybridization probes. *Phytopathological* 79, (10) pp. 1019-1023.
- ROSEN, I. G., 1987: DNA probes in infectious disease diagnosis. *Pharm. Technol.* 11: 28-34.
- RYU, E., 1938: On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *J. Japan. Veter. Sci.* 17, 31.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., 1989: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 545 pp.
- SCHAAD, N. W.; AZAD, H.; PEET, E. C. and PANOPOULOS, N. J. 1986: Cloned phaseolotoxin gene as a hybridization probe for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. (Abstr.) *Phytopathology* 76: 846.

(Aceptado para su publicación 13 junio 1992).