

## Evaluación de los iniciadores del método BIO-PCR sobre aislamientos fitopatógenos de *Pseudomonas* aisladas de judía común

A. J. GONZÁLEZ<sup>1</sup>, M. ORDAX<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> C. MENDOZA<sup>2</sup>

Se evaluó la fase PCR del método BIO-PCR (Phytopathology 85: 243-248, 1995) en muestras de ADN purificado y de cultivo de 71 cepas de *Pseudomonas* aisladas de hojas, vainas y semillas de judía común con síntomas de enfermedad, así como de cuatro cepas control. Se ensayaron los iniciadores dirigidos a amplificar segmentos de la región *tox*, que codifica la producción de faseolotoxina, en cuatro variantes de PCR-simple y una PCR-anidada. Solamente mediante la PCR-anidada se generaron amplicones del tamaño esperado (400 pb) en la totalidad de cepas de *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* y en el 33% de las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. La PCR-anidada es una técnica sensible, reproducible, y genera resultados de fácil interpretación en un tiempo relativamente corto y a un coste relativamente bajo.

<sup>1</sup> Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), carretera de Oviedo s/n, 33300 Villaviciosa. Asturias. anagf@princast.es

<sup>2</sup> Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo.

**Palabras clave:** *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, patovar *phaseolicola*, patovar *syringae*, faseolotoxina, grasa, BIO-PCR, judía común.

### INTRODUCCIÓN

Las *Pseudomonas* fitopatógenas que afectan a judía (*Phaseolus vulgaris* L.) son *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) (Burkholder) Gardan *et al.*, y *P. syringae* pv. *syringae* van Hall [pv. *phaseolicola* y pv. *syringae*, en adelante]. El pv. *phaseolicola* es el agente causal de la enfermedad más común en los judiarios españoles, la grasa de la judía, nombre que hace referencia a las características manchas aceitosas que aparecen en las vainas. En hojas los síntomas son manchas pequeñas, angulares, frecuentemente rodeadas por un halo verde pálido o amarillento y que se deben a la producción de faseolotoxina. Mientras que en

semillas pueden no aparecer síntomas, mostrar áreas con cambios de coloración en las testas que sólo son visibles en las variedades de semillas blancas o de color claro o también aparecer arrugadas y encogidas (Smith *et al.*, 1992). Los síntomas sistémicos, que pueden consistir en achaparramiento, marchitez reversible, clorosis, mosaico foliar y malformación de hojas, se deben directamente a una infección a partir de semillas. El pv. *phaseolicola* tiene una amplia dispersión geográfica, de hecho se encuentra en todas las regiones en que se cultiva comercialmente judía común y en Europa es probablemente la enfermedad bacteriana más importante de las judías. La primera referencia en España se debe a Rodríguez Sardiña (1939)

que la encuentra en muestras procedentes de Burgos, León y Huesca.

El *pv. syringae* es el agente causal de la mancha parda de la judía y produce unos síntomas similares a los descritos en grasa, con la diferencia de que no se produce halo alrededor de las manchas en las hojas. Esta enfermedad no ha sido muy estudiada y su distribución tampoco es bien conocida, aunque en Asturias hemos observado que aparece como endémica en la judía tipo granja asturiana (González *et al.*, 2000).

En la producción de la faseolotoxina están implicados diferentes genes que forman parte de 8 unidades transcripcionales denominadas desde *phtA* a *phtH* y se encuentran agrupadas en una región (*cluster tox*) de aproximadamente 22 kb (Zhang y Patil, 1997). Hatziloukas *et al.* (1995) secuenciaron una zona *EcoRI* de 2,6 kb del locus *phtE*, que incluye las secuencias propuestas como iniciadores para técnicas de PCR por Schaad *et al.* (1995). La producción de faseolotoxina se ha descrito también en una cepa del *pv. syringae* (Tourte y Manceau, 1995) y en el *pv. actinidiae* (Tamura *et al.*, 1989; Bender *et al.*, 1999)

Para la detección de faseolotoxina se han propuesto dos tipos de métodos: bioensayos y detección de secuencias de genes específicos. Schaad *et al.* (1995) proponen un método de detección mixto al que denominan BIO-PCR que combina el cultivo para la recuperación de la bacteria a partir de muestras vegetales, y una PCR-anidada para la detección de la toxina a partir del cultivo bacteriano. En el presente trabajo se realiza una evaluación de los iniciadores del método BIO-PCR sobre alícuotas de ADN y de cultivo líquido de cepas fitopatógenas de judía común identificadas como *pvs. phaseolicola* y *syringae*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Cepas de *Pseudomonas* fitopatógenas.** Se utilizaron 71 cepas fitopatógenas de *Pseudomonas*, pertenecientes a la colección del SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del

Principado de Asturias), de las cuales 51 correspondían al *pv. phaseolicola* y 18 al *pv. syringae*. Las cepas procedían de dos zonas climáticas diferentes, 25 de ellas de la Cornisa Cantábrica con un clima templado y húmedo, y 44 de la Meseta Castellana con un clima continental y seco. Todas las cepas habían sido aisladas de material vegetal con síntomas: hojas, vainas o semillas. Como cepas control se utilizaron: *pv. phaseolicola* CECT 321 (Colección Española de Cultivos Tipo) y la cepa *pv. phaseolicola* ISPVV-1 cedida por el Instituto de Semillas y Plantas de Vivero de Vitoria. Como cepas fuera de grupo se analizaron: *P. syringae* *pv. tomato* CECT 126 y *P. syringae* *pv. no especificado* CECT 94. Cincuenta y cuatro de estas cepas habían sido caracterizadas por diferentes técnicas (perfil bioquímico, ribotipificación, etc.) en trabajos previos (Gonzalez *et al.* 2000).

**Obtención y amplificación del ADN.** La técnica de PCR se realizó según las indicaciones de Schaad *et al.* (1995) con la salvedad de que como ADN molde se utilizaron dos tipos de muestras: ADN total parcialmente purificado y cultivo en medio YPG (5g./l. de extracto de levadura, 5g./l. de peptona y 10g./l. de D-glucosa) de las cepas en estudio. El ADN total de las cepas en estudio fue obtenido según Deener y Boychuk (1991) con algunas modificaciones. Los iniciadores 5.1 (AGCTTCTCCTCAAAA-CACCTGC), 3.1 (TGTTCCGAGAGG-CAGTCATG), 5.2 (TCGAACATCA-ATCTGCCAGCCA) y 3.2 (GGCTTTT-ATTATTGCCGTGGC), fueron suministrados por Amersham-Pharmacia-Biotech (España). Los dNTPs fueron suministrados por Bioline Ltd (Reino Unido) y la ADN polimerasa por Finnyme OY (Finlandia). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Perkin-Elmer Gene Amp PCR System Mod. 9600 (EEUU). El número de ciclos y condiciones de la reacción fueron los descritos por los autores del método (Schaad *et al.*, 1995). El resultado de la amplificación, visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al

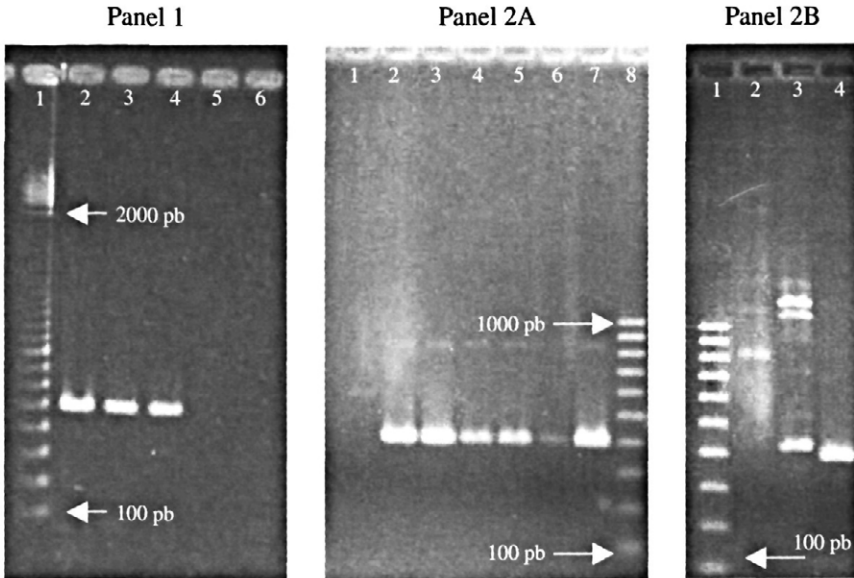


Fig. 1.—Resultado de la PCR-simple sobre cepas representativas de *Pseudomonas* fitopatógenas. **Panel 1: amplificación realizada con los iniciadores externos [5.1-3.1].** Calle 1: patrón de 100 pb, calles 2-4: amplificación en cepas del *pv. phaseolicola* (CECT 321; 65 y 82); calle 5: *P. syringae* *pv. tomato* CECT 126; calle 6: resultado negativo de cepa *pv. phaseolicola* (85). **Panel 2. Resultado de la amplificación realizada con los iniciadores internos [5.2-3.2]; A)** Calle 1: CECT 126; calles 2-7: cepas del *pv. phaseolicola* (CECT 321; 65; 64; 10; 11); calle 8: patrón de 100 pb. **B)** Calle 1: patrón de 100 pb; calles 2 y 4: cepas del *pv. phaseolicola*, la primera negativa (82) y la segunda positiva (65); calle 3: cepa del *pv. syringae* (84b), en la que se puede ver la banda de 455 pb, junto a otras dos bandas >1000 pb (estas dos bandas se consideraron amplificaciones inespecíficas). Los números entre paréntesis corresponden a la denominación de las cepas en las Tablas 1a y 1b.

1,5%, y el cálculo del peso molecular de los fragmentos, se realizaron según protocolos recogidos en Sambrook *et al.* (1989). Como patrones de peso molecular se utilizaron indistintamente: 100-2000 pb de Amersham-Pharmacia (EEUU); 100-1500 pb de Gibco BRL, 100-1000 pb+ 20 pb de Gensura (EEUU) y, marcador XVI, de 250-3000 pb, de Roche (Alemania). Todos los experimentos se hicieron, al menos, por triplicado.

## RESULTADOS

**Valoración de la sensibilidad y especificidad de los pares de iniciadores del método BIO-PCR para la detección de una secuencia de la región que codifica faseolotoxina sobre ADN purificado de *Pseudomonas* fitopatógenas.** Alicuotas de ADN purificado de las cepas de *Pseudomonas* fi-

topatógenas procedentes de judía común de la colección del SERIDA y de las cepas control (Tablas 1a y 1b) se analizaron mediante PCR. En la reacción se utilizaron los dos pares de iniciadores propuestos en el método BIO-PCR, par externo [5.1-3.1] y par interno [5.2-3.2], en las variantes de PCR-simple y PCR-anidada. En la PCR-simple, con el primer par de iniciadores [5.1-3.1] se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (500 pb) solamente a partir del ADN de 25 (49%) cepas del *pv. phaseolicola* y en 1 (5,5%) cepa del *pv. syringae* (Fig. 1. Panel 1). Con el segundo par de iniciadores [5.2-3.2] se observó un número mayor de cepas que generaban amplicones de 422 pb: 31 (60%) cepas del *pv. phaseolicola* y 10 (55%) cepas del *pv. syringae* (Fig. 1. Panel 2A). Además, otras dos cepas *pv. syringae* generaban amplicones de aproximadamente 455 pb (Fig. 1. Panel 2B).

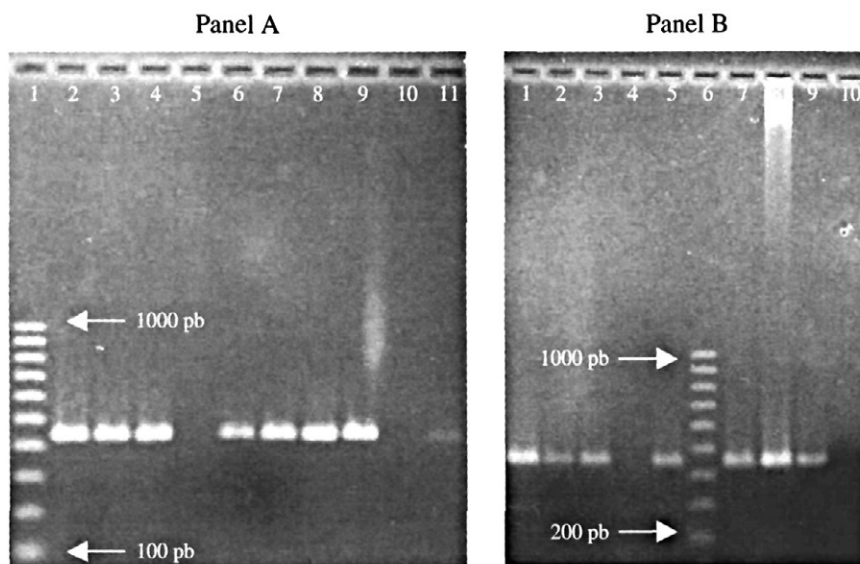


Fig. 2.—Resultados de la PCR-simple con combinaciones de iniciadores en cepas representativas de *Pseudomonas fitopatogénas*.

**Panel A, iniciadores [5.1-3.2].** Calle 1: patrón 100 pb; calle 2: CECT 321 (pv. *phaseolicola*); calles 3 y 4: cepas del pv. *phaseolicola* positivas (63 y 64); calle 5: CECT 126 (pv. *tomato*); calles 6-9: cepas del pv. *phaseolicola* positivas (10, 19A, 59, 61); calle 10: cepa del pv. *syringae* negativa (91). **Panel B, iniciadores [5.2-3.1].** Calles 1-3: cepas del pv. *phaseolicola* positivas (65, 61, 63); calle 4: cepa del pv. *phaseolicola* control, negativa (69); calle 5: CECT 321 (pv. *phaseolicola*); calle 6: patrón 100 pb; calles 7-9: cepas del pv. *phaseolicola* (81', 84a, 84b); calle 10: CECT 126 (pv. *tomato*). Los números entre paréntesis corresponden a las cepas en las Tablas 1a y 1b.

También se valoró la sensibilidad y especificidad de las dos combinaciones cruzadas de iniciadores [5.1-3.2] y [5.2-3.1]. Con la combinación [5.1-3.2] solamente 19 cepas, todas ellas del pv. *phaseolicola*, generaban amplicones de aproximadamente 447 pb. (Fig. 2. Panel A). Con la combinación [5.2-3.1] 22 cepas amplificaban un fragmento de aproximadamente 479 pb, de las cuales 19 correspondían al pv. *phaseolicola* y tres al pv. *syringae* (Fig. 2. Panel B). De las 19 cepas del pv. *phaseolicola* que amplificaban en ambas combinaciones, 17 eran coincidentes (Tabla 1a).

Por último, en la PCR-anidada, (se utiliza el par de iniciadores interno sobre alícuotas de los productos de amplificación obtenidos con el par de iniciadores externo) se encontró que todas las cepas del pv. *phaseolicola* amplificaban la banda esperada, de aproximadamente 400 pb, aunque también lo hacían seis cepas (33%) del pv. *syringae* (Fig. 3).

En todos los supuestos ensayados, se obtuvo la amplificación de la cepa de referen-

cia pv. *phaseolicola* CECT 321, no así de la otra cepa pv. *phaseolicola*, procedente del País Vasco, que sólo amplificó en la PCR-anidada. Las dos cepas fuera de grupo no generaron productos de amplificación en ninguno de los casos.

**Aplicación de la PCR anidada sobre cultivos de *Pseudomonas fitopatogénas*.** Para confirmar que la PCR-anidada era también sensible y específica sobre cultivos bacterianos, se procedió a aplicar la técnica utilizando como ADN molde alícuotas de cultivos de una noche en medio líquido YPG ( $10^5$  bacterias por reacción). En este caso se analizó un subplote de 29 cepas positivas para la PCR-anidada a partir de ADN purificado (24 pv. *phaseolicola* y 5 pv. *syringae*) junto a la cepa CECT 321, pv. *phaseolicola* y una cepa pv. *syringae* negativa. Todas las cepas se ensayaron por cuadruplicado y es de señalar que en algunas cepas (tres pv. *phaseolicola* y cuatro pv. *syringae*) se obtuvieron resultados negativos en alguna de las réplicas. Están

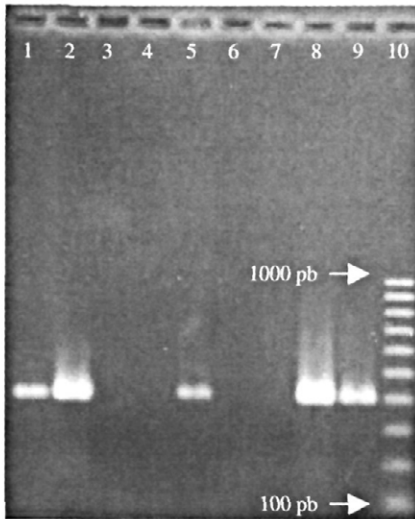


Fig. 3.—Resultados de la PCR-anidada en cepas representativas de *Pseudomonas* fitopatógenas.

Calles 1 y 5: cepas del pv. *syringae* positivas (54 y 84b); calle 2: pv. *phaseolicola* CECT 321; calle 3: pv. *tomato* CECT 126; calle 4: pv. sin especificar CECT 94; calles 6 y 7: cepas del pv. *syringae* negativas (81 y 83); calles 8 y 9: cepas del pv. *phaseolicola* positivas (62 y 65); calle 10: patrón 100 pb. Los números entre paréntesis corresponden a los recogidos en las Tablas 1a y 1b.

bajo estudio los factores que pudieron conllevar dichos fallos: problemas en la lisis de las células, en la reacción de amplificación o del termociclador. Sería necesario, por tanto, optimizar este proceso puesto que partir de cultivo simplifica mucho el método.

## DISCUSIÓN

Es importante señalar que la producción de faseolotoxina parece no contribuir ni al tamaño de las lesiones producidas ni a la capacidad de crecimiento de la bacteria en los tejidos de la planta (Gross, 1991). También ha sido establecido que algunos mutantes *Tox*<sup>-</sup> del pv. *phaseolicola* son patógenos en judía, de hecho Peet *et al.* (1986) observaron que cuando inoculaban mutantes *tox*<sup>-</sup> (creados por mutagénesis con Tn5) en hojas primarias de judía común del cultivar "Red Kidney", todos ellos producían las típicas lesiones aceitosas, indistinguibles de las cau-

sadas por la línea parental salvaje. En algunos de los casos también se produjo una clorosis sistémica acompañada de una atrofia de las hojas trifoliadas, igual que en el fenotipo salvaje. Así, parece que la habilidad de la bacteria para causar síntomas no se correlaciona con la cantidad de toxina producida *in vitro* por los mutantes (Peet *et al.*, 1986). Según esto, cabría la posibilidad de que el método de PCR no detectase alguna cepa del pv. *phaseolicola*. Schaad *et al.* (1995) describen dos hechos relevantes: el primero, que tres mutantes *Tox*<sup>-</sup> aislados del campo, daban un resultado positivo en la PCR-anidada, y el segundo la reversión en el campo de una línea *Tox*<sup>-</sup> a *Tox*<sup>+</sup>. Estos autores apuntan la posibilidad de que los mutantes *Tox*<sup>-</sup> posean la región *tox* silenciada, o porciones de ella, pudiendo revertir potencialmente a fenotipo *Tox*<sup>+</sup> en el campo.

Los resultados derivados del presente trabajo muestran la elevada eficacia de los iniciadores propuestos por Schaad *et al.* (1995) en el método BIO-PCR para detectar secuencias de la región *tox* en cepas fitopatógenas de judía del pv. *phaseolicola*. Ahora bien, una eficacia total sólo se encontró cuando se aplicó la técnica de la PCR-anidada. Los resultados del presente estudio muestran que las secuencias *tox* rastreadas no son exclusivas del pv. *phaseolicola*, dado que también se encontraron en un tercio de las cepas pv. *syringae* ensayadas. Como ya se ha indicado en la introducción, la producción de faseolotoxina ha sido demostrada en el pv. *actinidiae* (Tamura *et al.*, 1989; Bender *et al.*, 1999) y en una cepa pv. *syringae* (Tourte y Manceau, 1995).

Desde el punto de vista práctico, y específicamente en el caso de judía tipo granja asturiana, en estudios sobre bacteriosis y en procedimientos de obtención de semilla sana el hecho de encontrar secuencias *tox* en cepas del pv. *syringae* no sería un inconveniente de la técnica de PCR sino más bien una ventaja. La ventaja sería aún mayor si mediante esta vía se detectaran secuencias de ADN comunes a todas las toxinas producidas por ambas bacterias fitopatógenas debido a que en los

Tabla 1A.—Recopilación de resultados de los diferentes ensayos de PCR para la detección de un fragmento de la región *tox* en ADN de cepas *pv. phaseolicola* de la colección del SERIDA

Nº/año	Procedencia Área/ muestra	PCR-simple. Iniciadores				PCR- anidada
		5.1-3.1	5.2-3.2	5.1-3.2	5.2-3.1	
10/95	Ávila/ hojas	+	+	+	+	+
11/95	Ávila/ hojas	+	+	+	+	+
13/95	Zamora/ hojas	+	+	+	+	+
14/95	Zamora/ hojas	-	-	-	-	+
16/95	Zamora/ hojas	+	+	+	+	+
19 A/95	Valladolid/ hojas	+	+	+	+	+
19 B/95	Valladolid/ hojas	+	+	+	+	+
20/95	Valladolid/ hojas	+	+	+	+	+
21/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
22/ 95	León/ hojas	-	-	-	-	+
23/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
24/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
25/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
26/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
27/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
28/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
29/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
33/95	León/ hojas	-	-	-	-	+
34/95	Palencia/ hojas	-	-	-	-	+
35/95	Palencia/ hojas	-	-	-	-	+
36/95	Palencia/ hojas	+	-	-	-	+
37/95	Salamanca/ hojas	+	+	+	-	+
40/95	Palencia/ hojas	+	+	+	+	+
41 I/95	Palencia/ hojas	-	+	-	-	+
41 II/95	Palencia/ hojas	-	+	-	-	+
42/95	Palencia/ hojas	+	+	+	+	+
43/95	Palencia/ hojas	-	-	-	-	+
46 a/95	Palencia/ hojas	-	+	-	-	+
46 b/95	Palencia/ hojas	-	+	-	-	+
47/95	Zamora	-	+	-	-	+
48/95	Zamora/ hojas	+	+	+	+	+
50/95	Zamora/ hojas	-	-	-	-	+
51/95	Zamora/ hojas	-	-	-	-	+
52/95	Zamora/	-	+	-	-	+
53 p/95	Salamanca/ hojas y vainas	-	+	-	-	+
55/95	Soria/ hojas	+	-	-	-	+
59/96	PA (Villaviciosa)/hojas y vainas	+	+	+	+	+
61/96	PA (Valdés)/ hojas y vainas	+	+	+	+	+
62/96	PA (Valdés)/ hojas y vainas	+	+	-	+	+
63/96	PA (Valdés)/ hojas y vainas	+	+	+	+	+
64/96	PA (Valdés)/ hojas y vainas	+	+	+	+	+
65/96	Palencia/ vainas	+	+	-	+	+
70/97	PA (Navia)/ vainas	+	+	+	-	+
82/00	PA (Valdés)/ hojas	+	-	-	-	+
85/00	León/ vainas	-	+	-	-	+
87/00	PA/ vainas	+	+	+	+	+
535/95	Valladolid/ hojas	-	+	+	+	+
572/95	Valladolid/ hojas	+	+	-	-	+
592/95	Castilla y León/ hojas	+	+	-	-	+

PA: Principado de Asturias (concejo). Todas las cepas del Principado de Asturias se aislaron de judía tipo granja asturiana.

judiars de granja asturiana (judía muy apreciada desde el punto de vista culinario y nutricional y con alto valor en mercado) se ha demostrado endemismo tanto del *pv. phaseolicola* como del *pv. syringae* (Gonzalez *et al*,

2000). Ahora bien, para confirmar la producción de faseolotoxina en el *pv. syringae* sería necesario la realización de bioensayos.

Otras consideraciones de interés sobre la PCR-anidada para detectar secuencias de la

Tabla 1B.—Recopilación de resultados de los diferentes ensayos de PCR para la detección de un fragmento de la región *tox* en ADN de cepas *pv. syringae* de la colección del SERIDA y de cepas controles

Nº/año	Procedencia Área/ muestra	PCR-simple. Iniciadores			PCR- anidada
		5.1-3.1	5.2-3.2	5.1-3.2	
30/95	León/ hojas.....	-	-	-	+
53 s/95	Salamanca/ hojas y vainas .....	-	+	-	-
54/95	Salamanca/ hojas y vainas .....	-	-	-	+
56/95	Soria/ hojas .....	-	-	-	-
57/96	PA (Siero)/ hojas .....	-	+	-	+
74/99	PA (Navia)/ semilla.....	-	+	-	+
78/99	PA (Navia)/ semilla.....	-	+	-	-
79/99	PA (Navia)/ semilla.....	-	+	-	-
80/99	PA (Navia)/ semilla.....	-	+	-	-
81a/99	PA (Tapia)/ vainas.....	-	-	-	-
81b/99	PA (Tapia)/ vainas.....	-	-	-	+
83/00	PA (Villaviciosa)/ vainas.....	-	-	-	-
84 a/00	PA (Villaviciosa)/ vainas.....	-	+	-	+
84 b/00	PA (Villaviciosa)/ vainas.....	-	+	-	+
86/00	PA (Navia)/ vainas .....	+	+	-	+
88/00	PA (Vegadeo)/ tallo .....	-	+	-	-
89/01	PA (Navia)/ semilla.....	-	+	-	-
91/01	PA (Navia)/ semilla.....	-	+	-	-
<b>CONTROLES</b>					
ISPPV-1/96	País Vasco .....	-	-	-	+
321	C.E.C.T. ....	+	+	+	+
94	C.E.C.T. ....	-	-	-	-
126	C.E.C.T. ....	-	-	-	-

PA: Principado de Asturias (concejo). Todas las cepas del Principado de Asturias se aislaron de judía tipo granja asturiana.

región codificadora de faseolotoxina podrían ser las siguientes. 1) No se han encontrado **falsos negativos**, hecho importante de cara a utilizar el método BIO-PCR en saneamiento, de semilla de judía, puesto que siempre es preferible descartar una planta madre sana que dejar una enferma. 2) Posibilidad de detectar **falsos positivos**, entendiéndose como tales aquellos que amplifican secuencias *tox*, pero no producen la toxina. Este inconveniente es similar al que se le hace a técnicas serológicas como ELISA que, a pesar de ello, se están utilizando en el saneamiento de semilla. 3) Resultados de **fácil interpretación**. El resultado positivo de la PCR-anidada está representado por una banda nítida de 400 pb que se visualiza claramente mediante electroforesis en geles de agarosa. 4) Resultados en un **tiempo** relativamente corto: 18 h para el cultivo de la cepa y 10 h para la PCR-anidada. 5) La **aplicación** de este método requiere la disponibilidad de un equipamiento básico de biología molecular (micropipetas, centrífuga de sobremesa, termociclador, equipo de electroforesis, etc.) y de personal con un entrena-

miento previo en técnicas moleculares, lo cual no debe ser considerado como un problema ya que la mayoría de los laboratorios de diagnóstico microbiológico disponen de estos medios. El **coste** de la aplicación del método en cuanto a uso de reactivos es mucho mayor que los métodos tradicionales; sin embargo, si tenemos en cuenta el coste del tiempo empleado en la realización de los mismos, las diferencias se minimizan.

Por tanto, podemos concluir que la técnica de PCR-anidada, que se incluye en el método BIO-PCR, se mostró útil para detectar un fragmento de la región *tox* (que codifica faseolotoxina) en muestras de ADN y de cultivos procedentes de colonias aisladas de los pvs. *phaseolicola* y *syringae*. En nuestro caso, la totalidad de las cepas *pv. phaseolicola* y el 33% *pv. syringae*, aisladas a lo largo de un periodo de diez años (1991-2001) amplificaban el fragmento *tox*. Datos que apoyan la presencia de la región *tox*, entera o en parte, en los patovares de *Pseudomonas* categorizados como endémicos en la judía tipo granja asturiana.

## ABSTRACT

GONZÁLEZ, A. J.; ORDAX, M., MENDOZA, M.<sup>a</sup> C. Evaluación de los iniciadores del método BIO-PCR sobre aislamientos fitopatógenos de *Pseudomonas* aisladas de judía común. *Bol. San. Veg. Plagas*, **28**: 51-58.

The PCR phase of the BIO-PCR technique (Phytopathology 85: 243-248, 1995) was evaluated using purified DNA and culture samples from 71 strains of *Pseudomonas* collected from leaves, pods and seeds of common bean with disease symptoms. Different combinations of primers, aimed to amplify fragments of the *tox* cluster which encode phaseolotoxin, were assayed in four single-PCR procedures and one nested-PCR procedure. Only the nested-PCR generated amplicons of the expected size (400 bp) for all strains of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* tested and for 33% of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. The nested-PCR procedure is sensitive, reproducible, and generates results of easy interpretation in a relatively short time and a relatively low cost.

**Key Words:** *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae* patovar *phaseolicola*, patovar *syringae*, phaseolotoxin, halo blight, BIO-PCR, common bean.

## REFERENCIAS

- BENDER, C. L., ALARCÓN-CHAIDEZ, F. y GROSS, D. C., 1999: *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Rev. Microbiol. Molec. Biol.* 266-292 pp.
- DEENER, H. G. y BOYCHUK, I., 1991: Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 606-609.
- GONZÁLEZ, A. J., LANDERAS, E. y MENDOZA, M. C., 2000: Pathovars of *Pseudomonas syringae* causing bacterial brown spot and halo blight in *Phaseolus vulgaris* L. Are distinguishable by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (2): 850-854.
- GROSS, D. C., 1991: Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29**: 247-278.
- HATZILOUKAS, E., PANOPOULOS, N. J., DELIS, S., PROSEN, D. E. y SCHAAD, N. W., 1995: An open reading frame in the approximately 28-kb *tox-argK* gene cluster encodes a polypeptide with homology to fatty acid desaturases. *Gene* **166**: 83-87.
- PEET, R.C., LINDGREN, P. B., WILLIS, D. K. y PANOPOULOS, N. J., 1986: Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **166**: 1096-1105.
- RODRIGUEZ SARDIÑA, J., 1939: La "grasa" de las judías (debida a *Bacterium medicaginis* var. *phaseolicola*) en España. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola*. **8**: 231-264.
- SAMBROOK, J., FRITCH, E. F. y MANIATIS, T., 1989: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SCHAAD, N. W., CHEONG, S. S., TAMAKI, S., HATZILOUKAS, E. y PANOPOULOS, N. J., 1995: A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*. **85**: 243-248.
- SMITH, I. M., DUNEZ, J., PHILLIPS, D.M., LELLIOTT, R. A. y ARCHE S.A. (Eds.), 1992: Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- TAMURA, K., TAKIKAWA, Y., TSUYUMU, S. y GOTO, M., 1989: Characterization of the toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal bacterium of kiwifruit canker. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. **55**: 512.
- TOURTE, C. y MANCEAU, C., 1995: A strain of *Pseudomonas syringae* which does not belong to pathovar *phaseolicola* produces phaseolotoxin. *Europ. J. Plant Pathol.* **101**: 483-490.
- ZHANG, Y. X. y PATIL, S. S., 1997: The locus *phlE* locus in the phaseolotoxin gene cluster has ORFs with homologies to genes encoding amino acid transferases, the AraC family of transcriptional factors, and fatty acid desaturases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 947-960.

(Recepción: 3 diciembre 2001)

(Aceptación: 24 enero 2002)