

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria**  
**Ingeniería Agronómica**



Proyecto Especial de Graduación  
**Comparación de dos métodos de extracción de ADN para bacterias del**  
**género *Xanthomonas spp.***

Estudiantes

Ivis Laura Miranda Salazar

Katherine Lineth Meza Inestroza

Asesores

Carolina Avellaneda Ph. D.

Raphael Wesly Colbert Ph. D.

Honduras, julio 2022

**Autoridades**

**TANYA MÜLLER GARCÍA**

Rectora

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**CELIA O. TREJO RAMOS**

Directora del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

## Contenido

|  |    |
|--|----|
| Índice de Cuadros.....   | 5  |
| Índice de Figuras .....  | 6  |
| Resumen .....  | 7  |
| Abstract.....  | 8  |
| Introducción.....  | 9  |
| Materiales y Métodos .....   | 12 |
| Localización del Estudio .....   | 12 |
| Material Experimental .....  | 12 |
| Recolección de Muestras.....   | 12 |
| Siembra de Explantes en Medios de Cultivo Para Aislar Colonias.....                    | 12 |
| Aislamiento de Bacterias a Partir de los Explantes.....                                | 14 |
| Pruebas Bioquímicas Para Clasificar las Bacterias .....                                | 14 |
| Tinción Gram.....  | 15 |
| Prueba de Catalasa .....   | 16 |
| Prueba de KOH.....   | 17 |
| Extracción de ADN .....  | 17 |
| Protocolo de Extracción, Método Convencional (fenol: cloroformo: isoamyl alcohol)..... | 18 |
| Protocolo Extracción con DNeasy Blood & Tissue Kit.....                                | 19 |
| Evaluación de Calidad y Concentración del Material Genético Extraído.....              | 21 |
| Resultados y Discusión.....  | 22 |
| Sintomatología de Bacterias <i>Xanthomonas</i> spp .....                               | 22 |
| Siembra de Explantes.....  | 23 |
| Estriado de Bacterias .....  | 23 |
| Pruebas Bioquímicas.....   | 24 |

|  |    |
|--|----|
|  | 4  |
| Tinción Gram.....                                      | 24 |
| Catalasa.....  | 25 |
| KOH. ....  | 26 |
| Cuantificación y Evaluación de la Calidad del ADN..... | 27 |
| Conclusiones .....                                     | 30 |
| Recomendaciones.....                                   | 31 |
| Referencias.....                                       | 32 |

### Índice de Cuadros

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1 Reactivos y función para la extracción de ADN con el método convencional, fenol:<br>cloroformo: isoamyl, alcohol ..... | 18 |
| Cuadro 2 Reactivos y función para la extracción de ADN con uso del kit comercial DNeasy Blood &<br>Tissue .....                 | 20 |
| Cuadro 3 Resumen de pruebas bioquímicas realizadas .....  | 26 |
| Cuadro 4 Calidad y cuantificación de ADN extraído mediante método convencional y kit comercial                                  | 28 |

### Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Proceso de siembra de explantes en medio AN y MCH.....   | 13 |
| Figura 2 Proceso de estriado de bacterias en medio YDC .....  | 14 |
| Figura 3 Prueba bioquímica: Tinción Gram.....   | 16 |
| Figura 4 Prueba de integridad de las muestras en un gel de Agarosa al 1.5% .....                            | 21 |
| Figura 5 Sintomatología presente en muestras recolectadas .....   | 22 |
| Figura 6 Crecimiento de bacterias en explantes.....   | 23 |
| Figura 7 Desarrollo de colonias de bacterias en estriados realizados .....                                  | 24 |
| Figura 8 Prueba Bioquímica: tinción Gram negativa .....   | 25 |
| Figura 9 Prueba Bioquímica: catalasa positiva.....  | 25 |
| Figura 10 Prueba Bioquímica: KOH Gram negativa .....  | 26 |
| Figura 11 Integridad de las extracciones de ADN mediante método convencional en gel de Agarosa al 1.5%..... | 28 |
| Figura 12 Integridad de las extracciones de ADN mediante kit comercial en gel de Agarosa al 1.5% .          | 28 |

## Resumen

Al género *Xanthomonas* spp., pertenecen bacterias que causan cuantiosas pérdidas económicas en el sector agrícola; en la actualidad se hace necesario su diagnóstico a nivel de especie por métodos moleculares, siendo la extracción de ADN uno de los pasos fundamentales. Existen diversos métodos para la obtención de ADN bacteriano que varían dependiendo de la complejidad, duración del procedimiento e inversión por lo que el presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de comparar dos métodos de extracción de ADN bacteriano, empleando un método convencional y un kit comercial. Se tomaron muestras de diversos cultivos que fueron recolectadas en los meses de marzo y abril. Se realizó la extracción de ADN de 22 muestras recolectadas que fueron identificadas de la bacteria a evaluar con la implementación de ambos métodos de extracción. Los resultados obtenidos utilizando el método de extracción convencional reflejaron resultados de poca calidad y alta variabilidad en concentración en cada una de las muestras. Sin embargo, al utilizar el kit comercial se obtuvieron extracciones de ADN mucho más uniformes con una buena integridad al momento de someterlas a electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% pero menor. Ambos métodos permitieron la correcta extracción del ADN, con valores fluctuantes en concentración y pureza sin embargo, la implementación del método convencional requiere afinamiento y mayor estandarización para ser empleado como procedimiento de rutina para diagnóstico.

*Palabras clave:* Extracción de ADN, pruebas bioquímicas, *Xanthomonas*.

### **Abstract**

The genus *Xanthomonas* spp. belongs to bacteria that cause considerable economic losses in the agricultural sector; at present it is necessary to diagnose them at the species level by molecular methods, being DNA extraction one of the fundamental steps. There are several methods for obtaining bacterial DNA that vary depending on the complexity, duration of the procedure and investment, so the present research work was carried out with the objective of comparing two methods of bacterial DNA extraction, using a conventional method and a commercial kit. Samples were taken from different cultures that were collected in March and April. DNA extraction was performed on 22 collected samples that were identified from the bacteria to be evaluated with the implementation of both extraction methods. The results obtained using the conventional extraction method reflected poor quality results and high variability in concentration in each of the samples. However, when using the commercial kit, much more uniform DNA extractions were obtained with good integrity when subjected to 1.5% Agarose gel electrophoresis, but lower. Both methods allowed the correct extraction of DNA, with fluctuating values in concentration and purity; however, the implementation of the conventional method requires refinement and greater standardization to be used as a routine diagnostic procedure.

*Keywords:* Biochemical tests, DNA extraction, *Xanthomonas*.

## Introducción

El género *Xanthomonas* spp, representa un problema frecuente en los campos de diferentes cultivos, sus síntomas se caracterizan por la aparición de manchas con aspectos de tizón con un halo amarillo en hojas, tallos, y frutos reduciendo así el rendimiento del cultivo. De manera general, la bacteria ocasiona disminución de la fotosíntesis, por la interferencia de xantano en la membrana de los cloroplastos (Jiao et al. 1999).

La taxonomía de este patógeno ha sido muy cambiante debido a su variabilidad genética, sus especies son típicamente de forma de bacilo, son aerobios obligados y requieren una temperatura óptima para su crecimiento de 28°C (Torres et al. 2009). Este género comprende un grupo de bacterias fitopatógenas Gram negativas (Saddler y Bradbury 2005). La entrada de esta bacteria a las plantas es a través de estomas e hidátodos. En las superficies foliares, sobrevive en espacios protegidos del ambiente como en los estomas, la parte basal de los tricomas y en los desniveles de las nervaduras formando una biopelícula de protección (Jacques et al. 2005).

El género *Xanthomonas* spp comprende un grupo de bacterias fitopatógenas de gran importancia económica, ya que sus especies tienen como hospedero a más de 124 especies de plantas monocotiledóneas y 268 dicotiledóneas son hospedantes de *Xanthomonas* (Leyns et al. 1984). Siendo de las enfermedades más importantes en cultivos de tomate y Chile, donde se localiza con una distribución general y en forma epidémica, ocasionando pérdidas en la producción, es considerada una de las bacterias más peligrosas, la mancha bacteriana que produce se caracteriza por presentar lesiones necróticas en hojas, tallos y frutos (Gitaitis et al. 1992).

Los cambios más importantes que han ocurrido en las ciencias biológicas en los últimos años han surgido principalmente de la aplicación de técnicas moleculares que usan ADN para abordar problemas en diferentes áreas de estudio (Lanteri et al. 2002). Por lo que el primer paso para los métodos de biología molecular es la extracción de ADN, siendo fundamental para posteriores estudios moleculares. Es muy importante conocer la importancia de elegir un método de obtención de ADN de

calidad para ser utilizado en las técnicas y estudios de caracterización molecular. La selección de un procedimiento de extracción de ADN puede ser crítica para lograr obtener ADN de alto peso molecular, alta pureza y adecuado para realizar análisis moleculares, disminuyendo de esta forma, la visualización de falsos resultados o poca calidad de los productos amplificados, como ha sido señalado por (Gutiérrez 2013).

Existen muchas técnicas de extracción para obtener el ADN de bacterias. Esta diversidad métodos y kits comerciales varían en función de su complejidad y la duración de su procedimiento, a su vez permiten seleccionar una técnica adecuada para diferentes necesidades como la cantidad de muestras u origen de las muestras que se quiera obtener. Chakraborty et al. (2019) sugieren utilizar métodos comerciales y protocolos manufacturados para obtener ADN de distintas muestras, como el kit para sangre y tejidos de Qiagen DNeasy® (Blood and Tissue Kit, en inglés).

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. En general, los protocolos tradicionales consisten en cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN. A partir de los años se introdujeron al mercado combos o kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores (Alejos et al. 2014) .

La selección del método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de conservación, la técnica que se aplicará posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Independientemente del método seleccionado es recomendable encontrar un equilibrio entre pureza y rendimiento de acuerdo a la aplicación posterior (Alejos et al. 2014). En referencia a lo previamente mencionado, este trabajo de investigación fue realizado con el objetivo de comparar dos métodos de extracción de ADN de bacterias del género *Xanthomonas* con

la finalidad de determinar cuál es el método que permita obtener ADN con una pureza y concentración adecuada para su posterior análisis con distintos estudios.

## Materiales y Métodos

### Localización del Estudio

La realización de este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras, con muestras funcionales recolectadas en: zona 1, zona 2, zona 3, módulo de orgánica, módulo de frutales y de diferentes zonas de producción de hortalizas.

### Material Experimental

Se utilizaron un total de veintidós muestras de diferentes cultivos, estas se dividían en nueve de cebolla (*Allium cepa*), tres de verbena (*Verbena officinalis*), uno de chile (*Capsicum annuum*), dos de culantro (*Coriandrum sativum*), tres de girasol (*Helianthus annuus*), dos de maracuyá (*Pssiflora edulis*), uno de café (*Coffea arabica*), uno de perejil (*Petroselinum crispum*). El criterio de selección para las mismas fue la presencia de la sintomatología de *Xanthomonas spp.* en el cultivo y posteriormente en los medios de cultivos y pruebas bioquímicas. Para su posterior extracción de ADN mediante dos diferentes métodos, un método de extracción de ADN convencional impartido por el laboratorio de Fitopatología y un kit comercial “DNeasy® Blood & Tissue Kit”.

### Recolección de Muestras

La recolección de muestras se llevó a cabo entre los meses de marzo, abril y mayo. La bacteria por analizar expresa sintomatología similar a otras lo cual dificulta su correcta identificación en campo. Se recolectaron muestras de diferentes cultivos que presentaban sintomatologías relacionadas a *Xanthomonas spp.*, principalmente peca bacteriana y necrosis con halos amarillos en las hojas de distintos cultivos provenientes del campus de zamorano y de zonas externas.

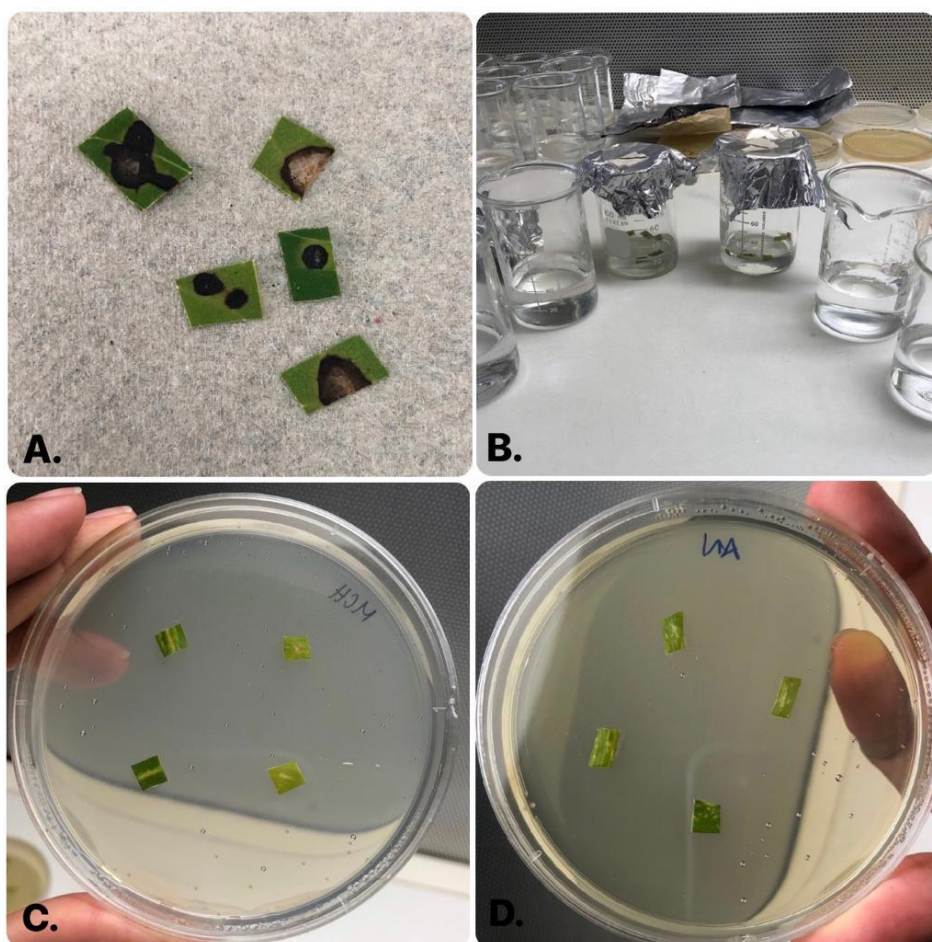
### Siembra de Explantes en Medios de Cultivo Para Aislar Colonias

Para lograr obtener las posibles bacterias de las muestras recolectadas se procedió a realizar una siembra de explantes. Se cortaron de cada muestra 8 explantes que fueran representativos de la sintomatología deseada, esos pasaron por un proceso de desinfección y siembra. Para la desinfección se sumergieron en 50mL de hipoclorito por 1 minuto, en agua destilada por 1 minuto y nuevamente

en agua destilada por 1 minuto para luego secarlos en papel filtro. Los explantes ya secos se procedían a sembrar en la cámara de flujo laminar, 4 de ellos en medio AN (agar nutritivo) y otros 4 en MCH (medio completo para hongo), debidamente cerrados y señalados se llevaron a la incubadora de hongos a una temperatura de 28°C (Figura 1). Los explantes permanecieron en la incubadora de 2-4 días dependiendo del desarrollo de bacterias o hongos que obtuvo cada muestra.

### Figura 1

*Proceso de siembra de explantes en medio AN y MCH*



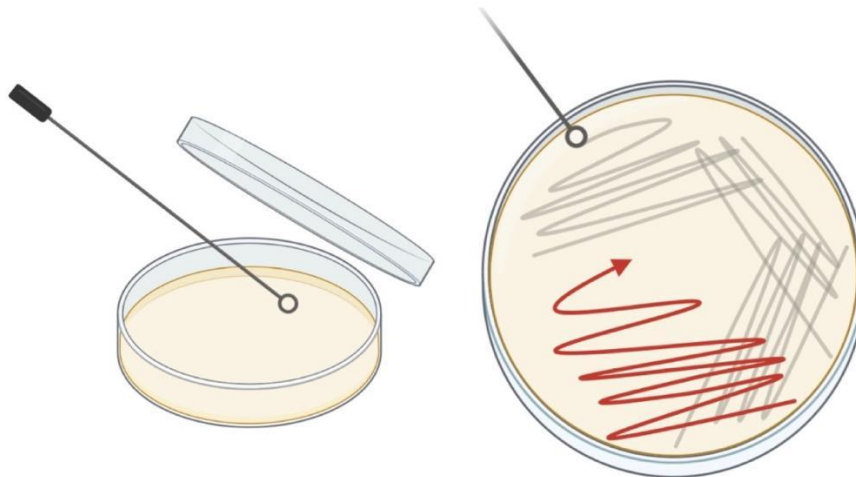
*Nota.* A: Corte de explantes contaminados. B: Desinfección de explantes. C: Siembra de explantes en medio MCH. D: Siembra de explantes en medio AN.

### Aislamiento de Bacterias a Partir de los Explantes

Todas las posibles bacterias fueron estriadas en un medio de cultivo selectivo para *Xanthomonas* YDC (yeast-dextrose-carbonate) (Figura 2). Se buscaba que el crecimiento bacteriano en los explantes sembrados se observara un color amarillento, de igual manera, se estriaron las de color blanco o cremoso. Esperando que el crecimiento de la bacteria *Xanthomonas* en medio YDC se diera de color amarillo por la presencia de xanthomonadina en su membrana luego de haber permanecido en la incubadora de bacterias a 37°C por 3 a 6 días.

### Figura 2

*Proceso de estriado de bacterias en medio YDC*



### Pruebas Bioquímicas Para Clasificar las Bacterias

Cada bacteria tiene ciertas características que ya se encuentran establecidas, para el caso de *Xanthomonas* estas poseen una forma de bastón, son Gram negativas, aerobias obligatorias, no esporuladas, tienen metabolismo oxidativo y la mayoría presenta flagelo polar único. Estas características pueden ser medidas mediante múltiples pruebas bioquímicas, para nuestra investigación realizamos 3 pruebas: tinción Gram, Catalasa y KOH.

### ***Tinción Gram***

La técnica de tinción nos sirve para diferenciar una bacteria entre dos grupos, las bacterias Gram positivas, aquellas que retienen la tinción azul-violeta y las bacterias Gram negativas, aquellas que se decoloran para luego teñirse de safranina. Esto se debe a que la estructura de las paredes celulares de ambas es diferente, las Gram positivas tienen una pared más gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración. En cambio, las Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglucanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la decoloración (Rodríguez y Arenas 2018). Conociendo lo anteriormente mencionado, para lograr realizar esta prueba se siguió un protocolo establecido en el cual, en un portaobjetos se agregó 60  $\mu$ L de agua destilada y con un asa se tomó una pequeña cantidad de la bacteria que luego se mezcló con movimientos giratorios y se dejó secar completamente. Con el frotis ya listo se agregó por 1 minuto cristal violeta hasta cubrirlo por completo, luego se lavó con agua destilada. Una vez seco, se agregó por 1 minuto gotas de Lugol, repitiendo el proceso. Después de secar se agregan gotas de alcohol acetona por 5 segundos y se lava rápidamente con agua destilada. Para finalizar, al secar, se agregan gotas de safranina por 1 minuto lavando con agua destilada al finalizar el tiempo (Figura 3). Al terminar los cuatro ciclos de tintes y alcohol se pueden observar los resultados en el microscopio.

**Figura 3***Prueba bioquímica: Tinción Gram****Prueba de Catalasa***

El fundamento de la prueba consiste en determinar la presencia de la enzima antioxidante catalasa presente en la mayoría de los organismos aerobios (Díaz 2002). La elaboración de la prueba se realizó en un portaobjetos, se agregó 60  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno y con un asa se toma una cantidad representativa de la bacteria, se mezcló con el PH con movimientos giratorios y se observan los resultados. En esta prueba se espera poner en evidencia la presencia de la enzima catalasa que al momento de agregar y frotar constantemente la bacteria en el peróxido de hidrogeno, esta enzima desdobra el (pH) produciendo agua y oxígeno. La reacción se observa mediante la creación de múltiples burbujas, resultando de ser positivo a catalasa.

### **Prueba de KOH**

El fundamento de la prueba es verificar si la bacteria es Gram negativa o positiva, si al realizar la prueba se presenta una filancia la bacteria seria Gram negativa, siendo este el resultado deseado para *Xanthomonas*. Para su realización se agregó en un portaobjetos 60  $\mu$ L de hidróxido de potasio y con un asa se agregó una cantidad representativa de la bacteria, se mezcla con movimientos giratorios, posteriormente se suspende el asa y se observa la formación de un hilo o filancia.

### **Extracción de ADN**

El ADN es el portador de la información y también de la expresión genética. Antes de los métodos basados en la genética, lo primero es la extracción y purificación del ADN, y la calidad del ADN es la premisa para el éxito o el fracaso del experimento (Chen X et al. 2015). El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Formada por, los nucleótidos que están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa, características que son aprovechadas para su extracción (Megías et al. 2019). Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN se precipite.

Una vez establecidas las bacterias funcionales para la investigación se procedió con la extracción de ADN, para el cual, se evaluaron dos opciones: extracción de ADN de forma convencional y extracción de ADN con el DNeasy® Blood & Tissue Kit. Para la forma convencional se utilizó el protocolo establecido por (Sambrook y Russell 2001) para extracción de ADN de bacterias la cual se

modificó con la disponibilidad del laboratorio de fitopatología. Por otro lado, el método de extracción de ADN bacteriano con el DNeasy® Blood & Tissue kit, fue utilizado el protocolo brindado por el mismo kit. Describiendo a continuación el protocolo para cada uno de ellos.

***Protocolo de Extracción, Método Convencional (fenol: cloroformo: isoamyl alcohol)***

Como primer paso se deben de aislar las colonias simples de los medios YDC en un Erlenmeyer con 150 mL de medio líquido LB (Luria Broth) y colocarlos en el orbital a 200rpm. Una vez cumplidos 5 días en el orbital, transferir la bacteria del Erlenmeyer a tubos Falcon de 50mL siendo (3 en total). Para posteriormente centrifugarlos a 10,000rpm por 10 minutos.

Saliendo de la centrifuga, llevar los tubos a la cámara de flujo laminar y decantar el líquido de los tubos Falcon para obtener el pellet. Añadir 300µL de solución "cell lysis" a cada uno de los tubos para resuspender el pellet y unificarlos en uno solo. Transferir 500µL de las muestras de los tubos Falcon en un tubo plástico pequeño Eppendorf de 1.5mL.

Trasladar las muestras a la cámara de gases y añadir 600µL de fenol: cloroformo: isoamyl alcohol (25:24:1) a los tubos con las muestras. Mezclar brevemente. Para posteriormente centrifugarlos a 14,000rpm por 10 minutos.

Saliendo de la centrifuga, llevar a la cámara de gases, tomar cuidadosamente todo el sobrenadante superior del tubo (~200µL) y transferirlo a un nuevo tubo Eppendorf. Al cual se le deben añadir 600µL de cloroformo: isoamyl alcohol (24:1). Mezclar brevemente. Para posteriormente centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos.

Tomar cuidadosamente 150µL del sobrenadante superior del tubo después de la centrifugación y transferirlo a un nuevo tubo Eppendorf. Se deben añadir 66µL de acetato de sodio 3M seguido de 1,350µL de etanol frío (colocar en dos partes). Para posteriormente centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos.

En el fondo del tubo se encuentra un pellet (visible o no visible) que contiene el ADN. Decantar el líquido y secar el tubo colocándolo boca abajo sobre papel toalla. Cuando el tubo este

completamente seco, añadir 100µL de agua libre de RNasas (agua ultrapura) al pellet para rehidratarlo. Finalmente analizar su calidad usando el Nanodrop y electroforesis.

### **Cuadro 1**

*Reactivos y función para la extracción de ADN con el método convencional, fenol: cloroformo:*

*isoamyl, alcohol*

| Reactivos            | Función  |
|----------------------|--|
| Cell lysis           | Soluciones básicas, detergentes o agentes cao trópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. |
| Fenol                | Disolvente que permite separa las proteínas celulares del ADN.   |
| Cloroformo           | Aumenta la eficacia del fenol para desnaturalizar las proteínas y también desnaturaliza lípidos.   |
| Isoamyl alcohol      | Agente antiespumante, elimina la espuma y aumenta la pureza del ADN, también ayuda a la precipitación.   |
| Acetato de sodio 3M  | Re naturaliza las cadenas de ADN.  |
| Etanol               | Disolvente que no se mezcla con el ADN por lo tanto se usa para precipita el ADN.  |
| Agua libre de RNasas | Agua libre de impurezas biológicamente activas, medio de resuspensión de ARN.  |

### **Protocolo Extracción con DNeasy Blood & Tissue Kit**

Para este protocolo se transfirieron 200 µL de la bacteria concentrada de un tubo Falcon, en donde a cada muestra se le añadió 200 µL de cell lysis y 20 µL de proteinasa k. Posteriormente se añadió 200 µL de Buffer AL y se aplicó vórtex por 2 minutos hasta su correcta homogenización.

Todas las muestras fueron incubadas a 56° C en un baño maría por 10 minutos y luego a cada tubo se le colocó 200 µL de Etanol al 100%, todas las muestras fueron agitadas en el vórtex por 2 minutos. Cada muestra fue pipeteada a una columna de centrifugado del kit que fue colocada en un tubo de recogida de 2 mL.

Seguidamente los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm durante 2 minutos. Se desechó el flujo y la columna de centrifugado con el sobre nadante fue colocado en un nuevo tubo de recogida. Se añadió 500 µL de Buffer AW1 a cada columna y fueron centrifugados a 8000 rpm durante 2 minutos nuevamente.

El flujo fue desechado y la columna de centrifugado fue colocado en un nuevo tubo de recogida. Posteriormente se añadió a cada muestra 500 µL de Buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm durante 4 minutos.

Posteriormente se desechó el flujo junto con el tubo de recogida. Se transfirió cada columna de centrifugado en un tubo de 1.5 mL y se añadió 50 µL de Buffer AE en el centro de la columna de centrifugado de cada una de las muestras, para terminar, se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente y se llevaron a centrifugación a 8000 rpm durante 2 minutos por última vez.

## Cuadro 2

*Reactivos y función para la extracción de ADN con uso del kit comercial DNeasy® Blood & Tissue*

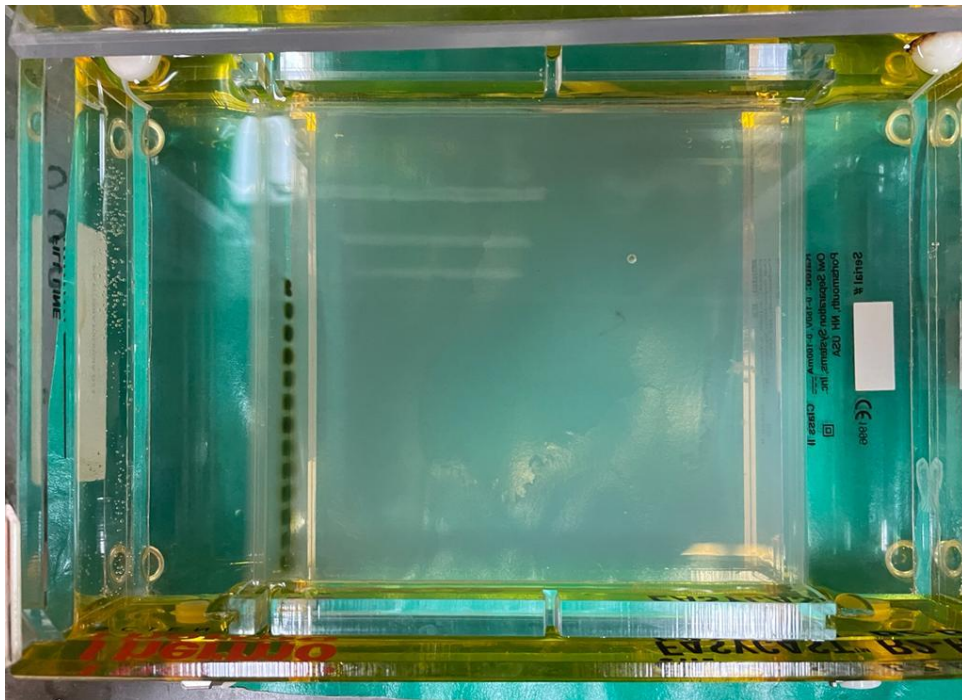
| Reactivos        | Función  |
|------------------|--|
| Cell lysis       | Soluciones básicas, detergentes o agentes cao trópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. |
| Proteinasa k     | Rompe las cadenas de proteína y junto con el Buffer AL hacen la lysis.   |
| Buffer AL        | Abren los tejidos y disuelven los orgánulos unidos a la membrana, incluidos el núcleo y las mitocondrias.  |
| Etanol           | Disolvente que no se mezcla con el ADN por lo tanto se usa para precipita el ADN.  |
| Buffer AW1 y AW2 | Soluciones de lavado que eliminan contaminantes del ADN.   |
| Buffer AE        | Desprende el ADN.  |

### Evaluación de Calidad y Concentración del Material Genético Extraído.

Según Pérez (2014), el termino calidad engloba la concentración, pureza e integridad de una muestra. En los cuales la concentración es la proporción entre la cantidad de soluto y disolución, la pureza es la ausencia o presencia de contaminantes e integridad la funcionalidad de la muestra para realizar ensayos posteriores. Se evaluó la concentración y la calidad del ADN extraído de cada una de las muestras obtenidas mediante el método convencional y la utilización del kit comercial. Se utilizó un Espectrofotómetro “Nano Drop” para evaluar la concentración y la calidad del ADN de cada una de las muestras, se esperaba obtener una concentración mayor a  $50\text{ng}/\mu\text{L}$ , la pureza de cada muestra se determinó mediante relación  $A_{260}/A_{280}$  entre 1.8 y 2.0 indicando una pureza óptima deseada. Además, todas las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 80 Voltios durante 30 minutos (Figura 4), para posteriormente observar la integridad del ADN de las muestras en un transiluminador UV.

#### Figura 4

*Prueba de integridad de las muestras en un gel de Agarosa al 1.5%*



## Resultados y Discusión

### Sintomatología de Bacterias *Xanthomonas* spp

Todas las muestras recolectadas fueron seleccionadas a partir de la sintomatología presente en las hojas de los distintos cultivos (Figura 5). Los síntomas del tizón común bacteriano son manchas foliares necróticas irregulares rodeadas por un delgado halo amarillo. Estas manchas pueden desarrollarse en el borde o en diferentes áreas de las hojas (Nazario et al. 2013). Los síntomas aparecen primero en las hojas y después pueden hacerlo en frutos y ramas. Los daños varían en función de la especie, variedad y condiciones meteorológicas. Las muestras recolectadas mostraron la sintomatología observada a continuación la cual hace referencia a los síntomas anteriormente mencionados referentes al tizón bacteriano.

### Figura 5

*Sintomatología presente en muestras recolectadas*



*Nota.* A: Manchas foliares en hojas de Maracuyá, B: Sintomatología de *Xanthomonas* en hojas de Culantro, C: Sintomatología de *Xanthomonas* en Perejil y D: Presencia de *Xanthomonas* en hojas de Cebolla

### Siembra de Explantes

Los explantes sembrados en medio Agar nutritivo y medio completo para hongos, luego de estar por alrededor de 3 – 4 días en la incubadora de hongos a 28 °C, se observó en la mayoría de los explantes de las muestras recolectadas el crecimiento de bacterias y hongos. Cuando se desarrolla en un medio de agar a menudo son de color amarillo (Universidad Rural de Guatemala 2022). La mayoría de ellas crecen muy lentamente. La presencia de bacterias se pudo evidenciar en los medios de cultivos debajo o alrededor de los explantes como se pueden observar a continuación (Figura 6)

**Figura 6**

*Crecimiento de bacterias en explantes de verbena y culantro en medio MCH y AN*



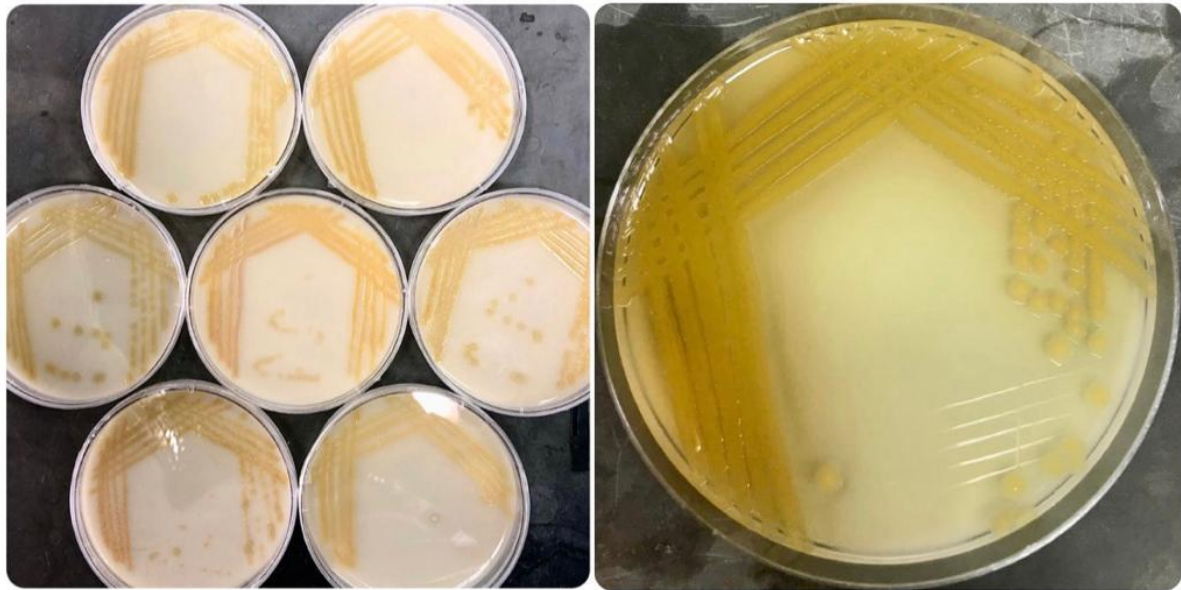
### Estriado de Bacterias

Todas las bacterias identificadas en los explantes se estriaron en medio Yeast extract-dextrose (YDC) las cuales fueron colocadas en la incubadora de bacterias a una temperatura de 37 °C por alrededor de 2 – 3 días, el tiempo de incubación variaba en función al desarrollo de la bacteria. Se pudo evidenciar el crecimiento de colonias con pigmentación amarilla en los estriados realizados (Figura 7), por lo que el color fue uno de los indicadores para verificar la presencia de bacterias del género *Xanthomonas* en las muestras recolectadas. “La mayoría de las especies de este género

producen colonias lisas, circulares o viscosas con una pigmentación amarilla” (Goszczyńska T et al. 1999).

### Figura 7

*Desarrollo de colonias de bacterias en estriados realizados en medio YDC*



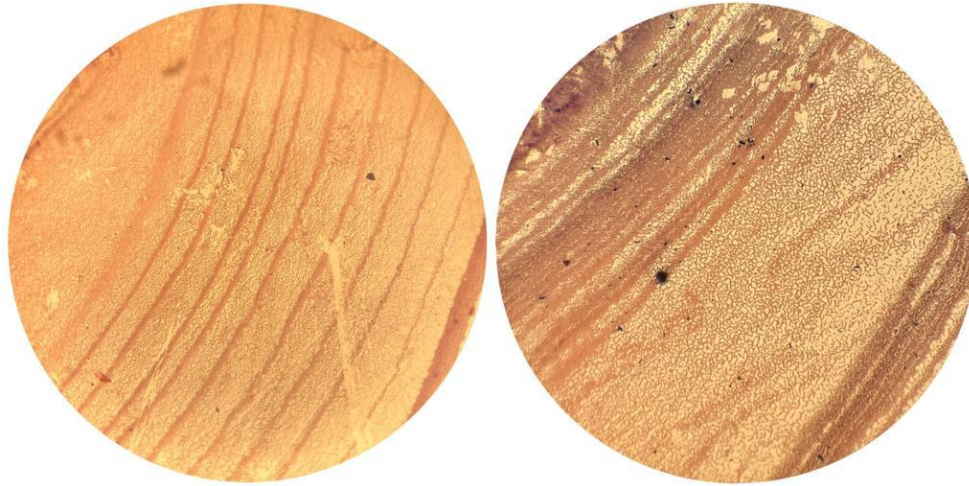
### Pruebas Bioquímicas

#### ***Tinción Gram.***

Todas las bacterias sometidas a la tinción resultaron ser Gram negativas, es decir que presentan una pared celular delgada, el cual al momento de agregar el alcohol acetona, el cristal violeta es extraído de la bacteria como tal, permitiendo que la safranina se adhiera a la pared celular de la bacteria, mostrándose de color rosado al momento de su observación en el microscopio. Esta prueba nos permite avanzar en la clasificación de la bacteria, para la cual *Xanthomonas* debe de ser Gram negativa (Figura 8).

**Figura 8**

*Tinción Gram negativa en muestra de cultivo de cebolla*

**Catalasa.**

Todas las muestras sometidas a la prueba resultaron ser positivas a catalasa, presenciando la producción de oxígeno y agua, producto de la oxidación que la enzima catalasa al contacto con el peróxido de hidrógeno (Figura 9). Prueba que nos permite identificar a aquellos microorganismos que son aerobios obligados, siendo el caso deseado para *Xanthomonas*.

**Figura 9**

*Prueba Bioquímica: catalasa positiva*



**KOH.**

El utilizar hidróxido de potasio nos permite determinar si una bacteria es Gram positiva o negativa. Al exponer a KOH al 3% las bacterias Gram negativas, estas sufren una lisis celular, liberando así su ácido nucleico viscoso, que forma un cordón o filancia al momento de estirlarla (Figura 10). Utilizando esta prueba para reafirmar la tinción Gram negativa resultando para cada una de las muestras.

**Figura 10**

*Prueba Bioquímica: KOH positiva*

**Cuadro 3**

*Resumen de pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas en diferentes cultivos*

| N° | Nombre           | Pruebas Bioquímicas |          |     |
|----|------------------|---------------------|----------|-----|
|    |                  | Tinción Gram        | Catalasa | KOH |
| 1  | Cepa 1 – cebolla | -                   | +        | +   |
| 2  | Cepa 2 – cebolla | -                   | +        | +   |
| 3  | Cepa 3 – cebolla | -                   | +        | +   |
| 4  | Cepa 4 – cebolla | -                   | +        | +   |
| 5  | Cepa 5 – cebolla | -                   | +        | +   |
| 6  | Cepa 6 – cebolla | -                   | +        | +   |
| 7  | Cepa 7 – cebolla | -                   | +        | +   |
| 8  | Cepa 8 – cebolla | -                   | +        | +   |
| 9  | Cepa 9 – cebolla | -                   | +        | +   |

| N° | Nombre            | Pruebas Bioquímicas |          |     |
|----|-------------------|---------------------|----------|-----|
|    |                   | Tinción Gram        | Catalasa | KOH |
| 10 | Cepa 1 – verbena  | -                   | +        | +   |
| 11 | Cepa 2 – verbena  | -                   | +        | +   |
| 12 | Cepa 3 – verbena  | -                   | +        | +   |
| 13 | Cepa 1 – chile    | -                   | +        | +   |
| 14 | Cepa 1 – culantro | -                   | +        | +   |
| 15 | Cepa 2 – culantro | -                   | +        | +   |
| 16 | Cepa 1 – girasol  | -                   | +        | +   |
| 17 | Cepa 2 – girasol  | -                   | +        | +   |
| 18 | Cepa 3 – girasol  | -                   | +        | +   |
| 19 | Cepa 1 – maracuyá | -                   | +        | +   |
| 20 | Cepa 2 – maracuyá | -                   | +        | +   |
| 21 | Cepa 1 – café     | -                   | +        | +   |
| 22 | Cepa 1 – perejil  | -                   | +        | +   |

### Cuantificación y Evaluación de la Calidad del ADN

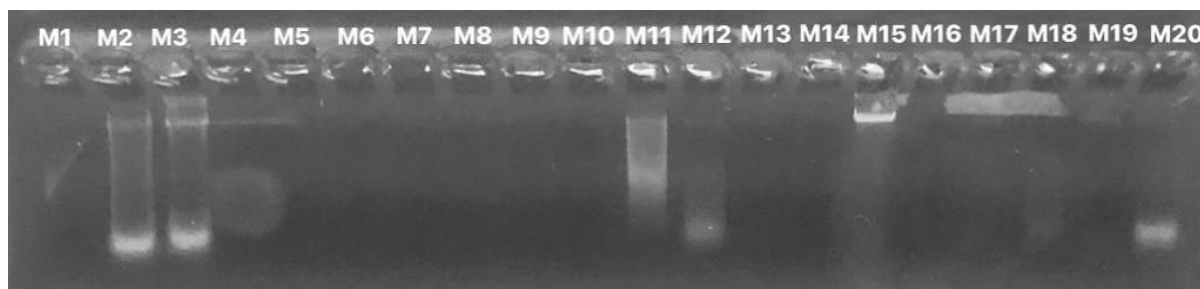
La extracción de ADN se realizó para las 22 muestras totales, ambos métodos de extracción de ADN permitieron obtener ADN con diferente calidad y en diferentes concentraciones (Cuadro 4), estas fueron evaluadas por medio de un espectrofotómetro el cual cuantificaba: concentración, siendo 50ng/μL la mínima deseada, y pureza en un rango de 1.80 y 2.0. La pureza fue la óptima para todas las muestras realizadas en ambos métodos. Para los diferentes cultivos se obtuvieron diferentes concentraciones variando desde los 14.31ng/μL hasta los 1,502.33ng/μL. Estos resultados concuerdan con Knüpfer et al. (2020) donde evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN, en los cuales obtuvieron resultados con menor calidad debido a contaminantes presentes en las muestras extraídas con el kit DNeasy® Blood & Tissue.

Se pudo evidenciar muy poca uniformidad en cuanto a la integridad, concentración y calidad del ADN extraído de las muestras mediante el método convencional (Figura 11). Sin embargo, al utilizar el kit DNeasy® Blood & Tissue se evidenció una mayor uniformidad en la integridad de cada una de las muestras, posteriormente se sometieron a electroforesis en gel de Agarosa a 1.5% para su visualización en el transiluminador UV, como se puede observar en la Figura 11 y Figura 12, estos resultados son similares a una investigación realizada por Ayomi Dilhari et al. (2017) en donde

podieron observar una mayor diversidad de bandas en el transiluminador utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue.

### Figura 11

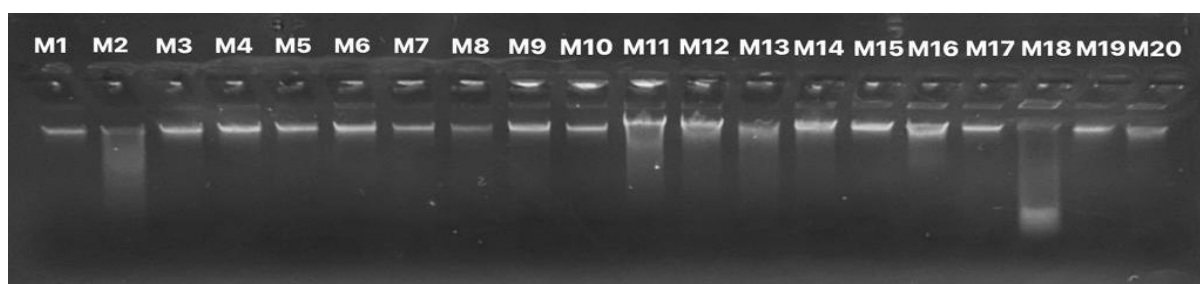
*Integridad de las extracciones de ADN mediante método convencional en gel de Agarosa al 1.5%*



Nota. M: Muestra

### Figura 12

*Integridad de las extracciones de ADN mediante kit comercial en gel de Agarosa al 1.5%*



Nota. M: Muestra

### Cuadro 4

*Calidad y cuantificación de ADN extraído mediante método convencional y kit comercial*

| N de Muestra | Nombre           | Método Convencional |         | Kit Comercial |         |
|--------------|------------------|---------------------|---------|---------------|---------|
|              |                  | ng/μl               | 260/280 | ng/μl         | 260/280 |
| M#1          | Cepa 1 – cebolla | 174.34              | 1.82    | 99.37         | 1.46    |
| M#2          | Cepa 2 – cebolla | 1502.33             | 1.96    | 67.23         | 1.87    |
| M#3          | Cepa 3 – cebolla | 1189.38             | 1.95    | 99.7          | 1.83    |
| M#4          | Cepa 4 – cebolla | 27.05               | 1.99    | 144.51        | 1.48    |
| M#5          | Cepa 5 – cebolla | 55.15               | 1.97    | 93.22         | 1.52    |
| M#6          | Cepa 6 – cebolla | 14.31               | 1.96    | 86.15         | 1.64    |
| M#7          | Cepa 7 – cebolla | 43.8                | 2.12    | 91.62         | 1.51    |
| M#8          | Cepa 8 – cebolla | 41.34               | 1.8     | 45            | 0.81    |

| N de Muestra | Nombre            | Método Convencional |         | Kit Comercial |         |
|--------------|-------------------|---------------------|---------|---------------|---------|
|              |                   | ng/μl               | 260/280 | ng/μl         | 260/280 |
| M#9          | Cepa 9 – cebolla  | 16.83               | 2.04    | 116.05        | 1.53    |
| M#10         | Cepa 1 – verbena  | 16.04               | 2.2     | 101.04        | 1.52    |
| M#11         | Cepa 2 – verbena  | 111.68              | 1.97    | 453.91        | 1.53    |
| M#12         | Cepa 3 – verbena  | 158.24              | 2.13    | 190.69        | 1.76    |
| M#13         | Cepa 1 – chile    | 71.24               | 2.24    | 111.12        | 1.87    |
| M#14         | Cepa 1 – culantro | 44.07               | 1.61    | 124.2         | 1.74    |
| M#15         | Cepa 2 – culantro | 102.48              | 1.86    | 160.2         | 1.57    |
| M#16         | Cepa 1 – girasol  | 16.62               | 1.62    | 145.11        | 1.62    |
| M#17         | Cepa 2 – girasol  | 52.84               | 1.89    | 82.65         | 1.72    |
| M#18         | Cepa 3 – girasol  | 93.88               | 2.01    | 355.65        | 1.77    |
| M#19         | Cepa 1 – maracuyá | 118.04              | 2.13    | 83.03         | 1.73    |
| M#20         | Cepa 2 – maracuyá | 464.35              | 2.05    | 122.21        | 1.85    |
| M#21         | Cepa 1 – café     | 81.42               | 1.75    | 103.28        | 1.51    |
| M#22         | Cepa 1 – perejil  | 1257.68             | 1.91    | 140.32        | 1.57    |

Nota. M: Muestra, ng/μl: nanogramo/microlitro, 260/280: Nivel de pureza.

### **Conclusiones**

Se evidenció que al realizar la extracción de ADN con el kit comercial DNeasy Blood & Tissue, se obtuvieron muestras más uniformes en cuanto a integridad, concentración y calidad de cada una de las muestras.

Se observó que, al implementar el método de extracción de ADN convencional, se obtuvieron muestras con alta variación en la concentración, por lo tanto, las concentraciones bajas no se evidenciaron en la lectura de la electroforesis.

Con el kit comercial se logró extraer el ADN de todas las muestras en un menor tiempo en comparación con el método convencional, sin embargo, este represento un mayor valor económico.

### Recomendaciones

Poner a prueba más métodos de extracción de ADN como “Salting out” o “Desmineralización-silica” con el objetivo de determinar un protocolo adecuado para obtener un ADN de buena calidad.

Evaluar el ADN extraído mediante la implementación de pruebas PCR que empleen cebadores universales de bacterias, de esta forma corroborar si la calidad de este ADN extraído por método convencional podría utilizarse en futuras investigaciones que requieran PCR.

Recolectar muestras en épocas lluviosas y con alta humedad para el desarrollo y aparición de esta bacteria para tener mayor número de muestras y variabilidad de cultivos, para su posterior estudio en laboratorio.

Realizar el estudio con diferentes tipos de bacterias fitopatógenas que de igual manera representan amenaza a la agricultura como *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp. y *Ralstonia* spp. para observar diferencias directas en la efectividad del método a utilizar y la bacteria a evaluar.

## Referencias

- Alejos L, Del Aragón MC, Cornejo A. 2014. Extracción y purificación de ADN. Tlalnepantla, Estado de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México; [consultado 08/07/22]. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>.
- Ayomi Dilhari, Asanga Sampath, Chinthika Gunasekara, Neluka Fernando, Deepaka Weerasekera, Chris Sissons, Andrew McBain, Manjula Weerasekera. 2017. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method; [consultado 16/07/22]. <https://amb-express.springeropen.com/track/pdf/10.1186/s13568-017-0477-z.pdf>.
- Chakraborty S, Saha A, Ananthram A. 2019. Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits? Biotech; [consultado 08/07/22]. <http://dx.doi.org/10.4003/006.031.0204>.
- Chen X, Jiang Y, Li Q, Han L, Jiang C. 2015. Molecular Phylogenetic Identification of Actinobacteria. [sin lugar]: [sin editorial]; [consultado 10/07/22]. 10.5772/62029.
- Díaz A. 2002. La Estructura de las Catalasas. México: Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. [http://acuario.uacj.mx/ICB/redcib/Documents/REB\\_DOC/2003/06/2003-2\\_LA%20ESTRUC\\_.pdf](http://acuario.uacj.mx/ICB/redcib/Documents/REB_DOC/2003/06/2003-2_LA%20ESTRUC_.pdf).
- Gitaitis R, McCarter S, Jones J. 1992. Tomato transplants produced in Georgia and Florida: Their diseases and control. Plant Disease; [consultado el 10 de nov. de 2021]. 76:651–656. [https://www.researchgate.net/publication/256598671\\_Tomato\\_transplants\\_produced\\_in\\_Georgia\\_and\\_Florida\\_Their\\_diseases\\_and\\_control](https://www.researchgate.net/publication/256598671_Tomato_transplants_produced_in_Georgia_and_Florida_Their_diseases_and_control).
- Goszczyńska T, Serfontein JJ, Serfontein S. 1999. Introduction to practical phytobacteriology: A manual for phytobacteriology. Pretoria: ARC - Plant Protection Research Institute. 83 p. ISBN: 0620254874.
- Gutiérrez DE. 2013. First Records of Four Exotic Slugs in Argentina. American Malacological Bulletin 31(2); [consultado 08/07/22]. 245–256. <http://dx.doi.org/10.4003/006.031.0204>.
- Jacques M-A, Josi K, Darrasse A, Samson R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. Appl Environ Microbiol. 71(4):2008–2015. eng. doi:10.1128/AEM.71.4.2008-2015.2005.
- Jiao J, Goodwin P, Grodzinski B. 1999. Inhibition of photosynthesis and export in geranium grown at two CO<sub>2</sub> levels and infected with *Xanthomonas campestris* pv. *Pelargonii*. Plant, cell and environment; [consultado el 7 de nov. de 2021]. (22):15–25. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-3040.1999.00360.x>.
- Knüpfer M, Braun P, Baumann K, Rehn A, Antwerpen M, Grass G, Wölfel R. 2020. Evaluation of a Highly Efficient DNA Extraction Method for *Bacillus anthracis* Endospores; [consultado 16/07/22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7285266/>.
- Lanteri AA, Loíacono MS, Margaría C. 2002. Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos. PRIBES 2002; [consultado 08/07/22]. vol. 2:207–220. [http://sea-entomologia.org/PDF/M3M\\_PRIBES\\_2002/207\\_220\\_Lanteri.pdf](http://sea-entomologia.org/PDF/M3M_PRIBES_2002/207_220_Lanteri.pdf).

- Leyns F, Cleene M de, Swings J-G, Ley J de. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. Bot. Rev; [consultado el 10 de nov. de 2021]. 50(3):308–356. doi:10.1007/BF02862635.
- Megías M, Molist P, Pombal A. 2019. La célula. Ciclo celular. Fase S. Atlas de Histología Vegetal y Animal. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 10 de jul. de 2022; consultado el 10 de jul. de 2022]. <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/8-s.php>.
- Nazario F, Gallegos Morales G, Ochoa Fuentes YM, Hernández Castillo F, Benavides Mendoza A, Castillo Reyes F. 2013. Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control. Revista Mexicana de Fitopatología; [consultado el 8 de nov. de 2021]. 31(2):147–160. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a6.pdf>.
- Pérez M. 2014. Controles de Calidad: Evaluación de los métodos de control de calida de ácidos nucleicos mediante electroforesis capilar y electroferogramas. [sin lugar]: Universidad de Salamanca; [actualizado el 17 de sep. de 2019; consultado el 22 de jun. de 2022]. <http://es.vhir.org/portal1/QC%20of%20nucleic%20acids.pdf>.
- Rodríguez P, Arenas R. 2018. Hans Christian Gram y su tinción. Ciudad de México: Sección de Micología, Hospital General Manuel Gea González; [actualizado 2018; consultado 23/06/22]. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.
- Saddler GS, Bradbury JF. 2005. *Xanthomonadales* ord. nov. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, Boone DR, Vos P de, Goodfellow M, Rainey FA, Schleifer K-H, editores. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Boston, MA: Springer US. p. 63–122.
- Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition. Tercera Edición. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 10 de jul. de 2022; consultado el 10 de jul. de 2022]. [https://www.academia.edu/43705166/Molecular\\_Cloning\\_A\\_Laboratory\\_Manual\\_Third\\_Edition](https://www.academia.edu/43705166/Molecular_Cloning_A_Laboratory_Manual_Third_Edition).
- Torres JP, Maringoni AC, Silva TA. 2009. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in common bean leaflets on soil. Journal of Plant Pathology; [consultado el 8 de nov. de 2021]. 91(1):195–198. [https://www.researchgate.net/publication/242678861\\_Survival\\_of\\_Xanthomonas\\_axonopodis\\_pv\\_phaseoli\\_var\\_fuscans\\_in\\_common\\_bean\\_leaflets\\_on\\_soil](https://www.researchgate.net/publication/242678861_Survival_of_Xanthomonas_axonopodis_pv_phaseoli_var_fuscans_in_common_bean_leaflets_on_soil).
- Universidad Rural de Guatemala. 2022. Manual de prácticas, Laboratorio de Fitopatología; [consultado el 10 de jul. de 2022]. <https://urural.edu.gt/wp-content/uploads/2022/02/9.-MANUAL-FITOPATOLOGIA-2022.pdf>.