

## Sensibilidad de la técnica PCR para cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

S. LLAMAS y C. NOVAL

Cuatro cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, con tres concentraciones diferentes, fueron amplificadas mediante la técnica PCR con los iniciadores CM<sub>3</sub> y CM<sub>4</sub>. El producto de amplificación fue detectado por electroforesis en geles de agarosa e hibridación dot-blot. Para la electroforesis, las muestras de mayor concentración fueron tratadas con enzimas de restricción Hinf I y Sal I. La hibridación fue realizada con la sonda MIC1.

S. LLAMAS y C. NOVAL. Subdirección General de Sanidad Vegetal. Velázquez, 147. 28002 Madrid.

**Palabras clave:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, PCR, iniciadores, ADN polimerasa, enzimas de restricción y sondas de ADN.

### INTRODUCCION

Todo ser vivo, animal, planta o microorganismo, excepto algunos virus, poseen en su interior ADN.

La composición en bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina y citosina) y su disposición conforman la estructura primaria del ADN, residiendo en ésta la diferencia genética entre los distintos organismos vivos. Dentro de cada grupo biológico existen semejanzas entre unos individuos y otros, pero también existe información genética específica de cada especie que les hace ser diferentes del resto. Estudios sobre el ADN han llevado a determinar el genoma, o parte del genoma, de diversos organismos (BECK y ZINK, 1981, VAN WEZENBEEK *et al.*, 1980), hecho que ha permitido conocer enfermedades, algunas de origen genético (ENGELKE *et al.*, 1988, WONG *et al.*, 1987) y otras producidas por microorganismos (FITTS *et al.*, 1983, GRIDMONT *et al.*, 1985, MANULIS, 1992).

El mayor problema que presenta el estudio de la molécula de ADN es la necesidad de contar con cantidades suficientemente grandes para trabajar con ella. El problema se puede solventar mediante clonaje de un fragmento del genoma que quiere estudiarse en un vector, normalmente un plásmido de amplificación, consiguiendo así la multiplicación de ese fragmento (MESSING, 1983), o con el empleo de la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) descrita por primera vez en 1985 por SAIKI *et al.*, que permite amplificar un fragmento de ADN de manera exponencial.

La amplificación del ADN con la técnica PCR, se lleva a cabo en presencia de los cuatro nucleótidos y de una polimerasa que sintetiza ADN en presencia de iones Mg<sup>2+</sup>, utilizando como catalizador 2 fragmentos de ADN de aproximadamente unos 20 nucleótidos llamados cebadores o iniciadores, que son complementarios cada uno de ellos a una región de las cadenas moldes y que limitan la región a amplificar. Partiendo de cantidades muy pequeñas de ADN, 10<sup>-6</sup> ug, pueden ob-

tenerse entre 0,5 y 1 ug en 30 ó 35 ciclos. Cada ciclo consiste fundamentalmente en un primer paso de desnaturalización de la doble cadena, una segunda fase de apareamiento de los iniciadores con la cadena molde y una tercera fase de polimerización del fragmento.

La técnica se ha visto considerablemente mejorada con la introducción de un termociclador (MULLIS y FALOONA, 1987) y la sustitución del fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *Escherichia coli* por una ADN polimerasa termoestable purificada de *Thermus aquaticus*, Taq ADN polimerasa (CHIEN *et al.*, 1976), que permite realizar hasta 30 ó 35 ciclos sin necesidad de añadir nueva enzima en cada ciclo (SAIKI *et al.*, 1988).

El empleo de la técnica PCR se ha difundido mucho en clínica humana y forense (ALMOGUERA *et al.*, 1988, HIGUCHI *et al.*, 1988, OU *et al.*, 1988). También en el campo de la patología vegetal existen diversos trabajos (CENIS, 1993, NAVOT *et al.*, 1992, STEFAN y ATLAS, 1988), y se espera que su utilización se incremente debido a sus innegables ventajas en la detección y diagnosis de patógenos vegetales.

Uno de los agentes nocivos que más daño puede producir en las plantaciones de tomate es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*, 1984 (Cmm), causante del Chancro bacteriano del tomate. La dificultad que entraña el diagnóstico de la enfermedad, en especial la detección del patógeno en las semillas, hace que se considere de gran interés la búsqueda de nuevas técnicas que permitan elaborar métodos para su detección y diagnóstico más sensibles y específicos que los actuales, por lo que el Grupo de Expertos en Bacterias de la CE, está llevando a cabo un proyecto en el que se estudia el empleo de la PCR como posible técnica para el diagnóstico de la enfermedad.

En este trabajo se muestran los resultados de sensibilidad obtenidos en nuestro laboratorio al aplicar a 4 cepas de Cmm la técnica PCR con los iniciadores CM<sub>3</sub> y CM<sub>4</sub>, diseñados por el Genetic Engineering Group de Lyngby, Dinamarca.

## MATERIAL Y METODOS

### Cultivo de las bacterias

Cuatro cepas de Cmm (PD (1)-1386, LMG (2)-5602, LMG-5604 y LMG-7333) fueron cultivadas en placa con medio YPGA (extracto de levadura, 5 g, glucosa monohidrato, 10 g, agar 15 g, agua destilada hasta 1 litro, pH 7.0) durante 5 días a 24 °C.

### Preparación de las muestras para PCR

Con cada cepa cultivada en YPGA se preparó una suspensión bacteriana en agua destilada estéril a una concentración aproximada de 10<sup>8</sup> cel/ml, realizándose diluciones, también en agua destilada estéril, desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> con cada una de las suspensiones. Cincuenta microlitros de las diluciones 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-4</sup> fueron sembradas en YPGA para comprobar la concentración de la suspensión inicial preparada y con 5 ul de las 3 concentraciones mayores se efectuó una lisis alcalina en 50 ul de NaOH 0.05 N (NaOH, 2 g, H<sub>2</sub>O, destilada hasta 1 litro) a 90 °C durante 15 minutos.

### PCR

Se utilizaron microviales de 0.5 ml (N.º 801-0537), aceite mineral (N.º 186-2302) y Amp PCR Reagent Kit con Ampli Taq ADN polimerasa (N.º 801-0055) todos ellos de Perkin-Elmer Cetus.

Un control positivo del fago lambda y dos controles negativos, uno con los iniciadores de lambda y otro con los cebadores de Cmm, fueron empleados para comprobar la amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 100 ul. Para preparar

(1) PD: Culture Collection of Plant Protection Service, Wageningen, The Netherlands.

(2) LMG: Laboratorium Microbiology Gent Culture Collection Rijksuniversiteit, Belgique.

las reacciones con los controles del fago lambda se siguieron las recomendaciones del Kit; para la amplificación de las 12 muestras de Cmm y de su correspondiente control negativo se empleó una concentración final de 1 uM de cada iniciador y 5 ul de ADN desnaturalizado en NaOH.

Para mejorar el contacto de los microviales con el termociclador, se añadió en cada pocillo, y previo a la colocación de los viales, una gota de aceite mineral. Asimismo dos gotas de aceite mineral fueron incorporadas a cada microvial para evitar las pérdidas por evaporación.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador 480 de Perkin-Elmer Cetus en 35 ciclos, cada uno de ellos formado por una fase de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto y 30 segundos, una fase de apareamiento a 60 °C durante 1 minuto y una tercera fase de polimerización a 72 °C durante 1 minuto y 30 segundos. Un último ciclo a 72 °C durante 10 minutos finalizó la fase de polimerización.

### Detección de la amplificación

En la detección del producto amplificado se emplearon dos métodos: electroforesis en geles de agarosa e hibridación dot-blot.

### Electroforesis

La electroforesis fue realizada en geles de agarosa al 2% (SAMBROOK *et al.*, 1989) en una cubeta «Wide mine-sub DNA electrophoresis» de Biorad. El tampón utilizado fue 1 X TAE (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Para la confirmación del producto amplificado, las muestras con mayor concentración fueron tratadas con dos enzimas de restricción, Hinf I y Sal I. Veintiséis microlitros fueron tratados con 1 ul del enzima de restricción Sal I (8-12 unidades/ul), diluido en 3 ul de 10 X tampón de incubación H, comercializados por Boehringer Mannheim y otros 26 ul tratados con 1 ul del enzima

Hinf I (8-12 unidades/ul) diluido en 3 ul de 10 X tampón de incubación 2, ambos de GIBCO BRL. Las muestras se dejaron incubar a 37 °C durante 45 minutos.

A 20 ul del producto amplificado, tratado y no tratado con enzimas de restricción, se añadieron 2 ul de 5 X LB (azul de bromofenol, 2.5 g glicerol, 500 ml, agua destilada estéril hasta 1 litro), y 20 ul de la mezcla fueron cargados en los geles. En uno de los pocillos del gel se aplicó 1 mg. del marcador Molecular Weight Marker VI de Boehringer Mannheim diluido en agua destilada estéril conteniendo 10% de 5 X LB.

La electroforesis se realizó a voltaje constante de 4 v/cm.

Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 0.5 ug/ml. durante 1 hora y desteñidos en agua destilada durante 10 minutos con agitación. Las bandas fueron visualizadas con un transiluminador de luz ultravioleta y el gel fotografiado con una cámara Polaroid.

### Hibridación dot-blot

El segundo método empleado para la detección de la amplificación fue la hibridación con la sonda MIC1 ensayada en un trabajo precedente (LLAMAS y NOVAL, 1994).

Veinte microlitros, tanto del control negativo, como de las 12 muestras de Cmm, fueron desnaturalizados en 300 ul de solución 7.5% formaldehído, 10 X SSC (SAMBROOK *et al.*, 1989), calentadas a 95 °C durante 15 minutos y enfriados en hielo mientras se procedía a su aplicación sobre una membrana de nylon suministrada con el Kit de detección PhotoGene Nucleic Acid Detection System de BRL. La aplicación de las muestras se realizó mediante el Hybrid Dot Manifold de BRL, conectado a una bomba de vacío. Para fijar el ADN a la membrana ésta se sometió a 80 °C durante 2 horas.

La prehibridación, hibridación y detección fueron realizadas siguiendo el protocolo recomendado en el Kit de detección; sola-

mente algunas modificaciones a este protocolo fueron incorporadas. La temperatura de lavado con 0.1 X SSC conteniendo 1% de SDS fue de 65 °C, el volumen de solución de bloqueo fue de 1 ml/cm<sup>2</sup> de membrana, el tiempo que estuvo sumergida 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.

## RESULTADOS

### Concentración bacteriana empleada

Mediante el conteo de colonias en placa se pudo conocer la concentración, siendo ésta para PD-1386 de  $1.5 \times 10^8$  cel/ml, de  $6.6 \times 10^7$  cel/ml en el caso de LMG-5602,  $1.9 \times 10^8$  cel/ml para LMG-5604 y de  $2.2 \times 10^8$  cel/ml para LMG-7333.

Partiendo de estas concentraciones se realizaron la primera y segunda dilución con cada una de las cepas.

El cálculo de las células utilizadas en cada reacción de PCR se realizó teniendo en cuenta las diluciones que sufrieron los 5 ul de cada muestra, y que han sido especificadas en párrafos precedentes, consiguiéndose así una cantidad de células de  $6.8 \times 10^4$ ,  $6.8 \times 10^3$  y  $6.8 \times 10^2$  para PD-1386,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$  y  $3 \times 10^2$ , en el caso de LMG-5602,  $8 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^3$  y  $8 \times 10^2$  para LMG-5604 y  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^3$  para LMG-7333.

### Electroforeis

Tras el teñido de los geles con bromuro de etidio y desteñido en agua destilada se pudo observar la aparición de una banda correspondiente al control positivo del fago lambda de 500 pares de bases (pb). Los controles negativos del fago lambda y de Cmm no fueron amplificadas.

Todas las muestras de Cmm PD-1386 y LMG-5602 fueron amplificadas; sin embargo

con la cepa LMG-7333 sólo se pudo detectar la amplificación en las dos concentraciones mayores, y la amplificación de la muestra LMG-5604 no se consiguió con  $8 \times 10^3$ , pero sí con  $8 \times 10^4$  y  $8 \times 10^2$ . En todos los casos la banda de amplificación obtenida resultó corresponder a un fragmento de aproximadamente 645 pb.

Cuando las muestras fueron tratadas con el enzima de restricción Hinf I aparecieron dos bandas que correspondían a fragmentos de 380 y 265 pb, mientras que al ser tratadas con el enzima Sal I aparecieron también dos bandas pertenecientes a fragmentos de 345 y 300 pb (Figuras 1 y 2).

### Hibridación

La autorradiografía realizada a la membrana mostró fuertes señales de hibridación de la sonda MIC1 con todas las muestras excepto para LMG-5604  $8 \times 10^3$ , LMG-7333 con  $1 \times 10^3$  y para el control negativo de Cmm (Figura 3).

## DISCUSION

Mediante la técnica PCR y con el empleo de los iniciadores CM<sub>3</sub> y CM<sub>4</sub>, las 4 cepas de Cmm fueron amplificadas.

Mientras todas las muestras de PD-1386 y LMG-5602 fueron amplificadas, LMG-5604 con concentración intermedia y LMG-7333 en la muestra más diluida no fueron amplificadas. Si bien en el caso de LMG-7333 ( $1 \times 10^3$  cel/reacción PCR) podría pensarse que este resultado se debía a la sensibilidad de la técnica. Esta explicación no es válida ya que las muestras PD-1386 ( $6.8 \times 10^2$  cel), LMG-5602 ( $3 \times 10^2$  cel) y LMG-5604 ( $8 \times 10^2$  cel) fueron amplificadas siendo menor su concentración que la de LMG-7333. Por otro lado, el no detectar amplificación en LMG-5604 ( $8 \times 10^3$  cel) y sí en LMG-5604 ( $8 \times 10^2$  cel) hace pensar que la falta de amplificación podría deberse, o bien a que la lisis alcalina no haya funcionado en el caso

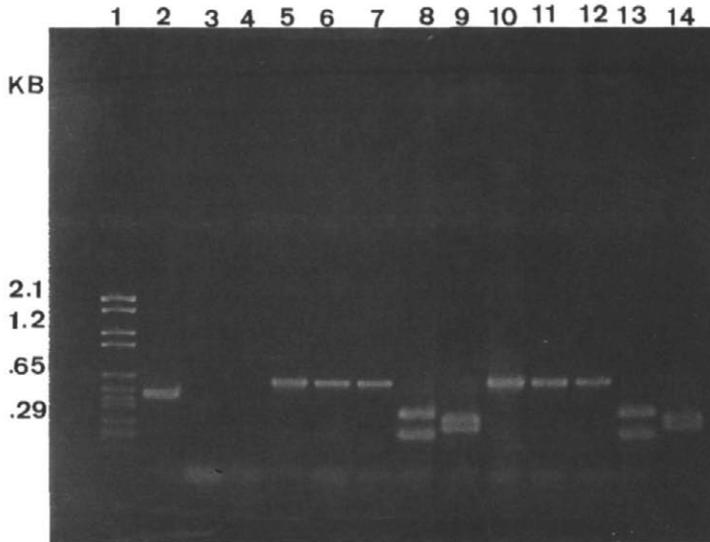


Fig. 1.-1. Molecular Weight Marker VI. 2. control positivo de lambda. 3. control negativo de lambda. 4. control negativo de Cmm. 5. PD-1386 ( $6.8 \times 10^4$  cel). 6. PD-1386 ( $6.8 \times 10^3$  cel). 7. PD-1386 ( $6.8 \times 10^2$  cel). 8. PD-1386 Hinf I. 9. PD-1386 Sal I. 10. LMG-5602 ( $3 \times 10^4$  cel). 11. LMG-5602 ( $3 \times 10^3$  cel). 12. LMG-5602 ( $3 \times 10^2$  cel). 13. LMG-5602 Hinf I. 14. LMG-5602 Sal I.

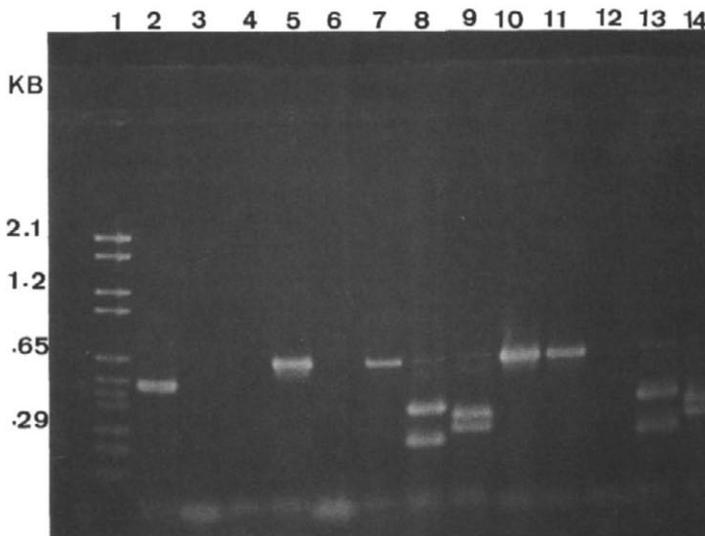


Fig. 2.-1. Molecular Weight Marker VI. 2. control positivo de lambda. 3. control negativo de lambda. 4. control negativo de Cmm. 5. LMG-5604 ( $8 \times 10^4$  cel). 6. LMG-5604 ( $8 \times 10^3$  cel). 7. LMG-5604 ( $8 \times 10^2$  cel). 8. LMG-5604 Hinf I. 9. LMG-5604 Sal I. 10. LMG-7333 ( $1 \times 10^5$  cel). 11. LMG-7333 ( $1 \times 10^4$  cel). 12. LMG-7333 ( $1 \times 10^3$  cel). 13. LMG-7333 Hinf I. 14. LMG-7333 Sal I.

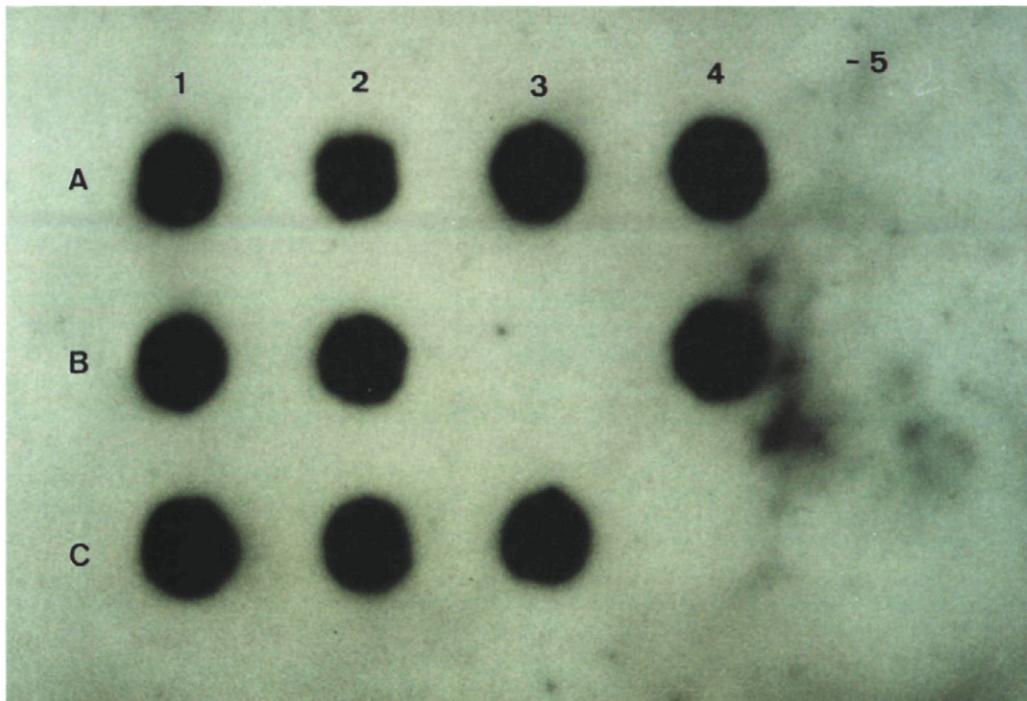


Fig. 3.—1. PD-1386: A ( $6.8 \times 10^4$  cel), B ( $6.8 \times 10^3$  cel), C ( $6.8 \times 10^2$  cel), 2. LMG-5602: A ( $3 \times 10^4$  cel), B ( $3 \times 10^3$  cel), C ( $3 \times 10^2$  cel), 3. LMG-5604: A ( $8 \times 10^4$  cel), B ( $8 \times 10^3$  cel), C ( $8 \times 10^2$  cel), 4. LMG-7333: A ( $1 \times 10^5$  cel), B ( $1 \times 10^4$  cel), C ( $1 \times 10^3$  cel), 5. A (Cmm control negativo).

de las dos muestras no amplificadas, o bien que por existir algún problema en esos pocillos del termociclador se haya impedido la amplificación (RESENDEZ-PÉREZ y BARREIRA-SALDAÑA, 1990).

La detección del producto amplificado por electroforesis mostró una banda correspondiente a un fragmento de 645 pb.

El empleo de enzimas de restricción ha permitido confirmar la banda de 645 pb y además mostrar la existencia de una diana Sal I y otra Hinf I en ese fragmento, dando cada una de ellas 2 fragmentos de 345 y 300 pb al utilizar Sal I y de 380 y 265 pb con Hinf I. Estos datos podrían ser interesantes si en algún otro caso al emplear otra bacteria distinta a Cmm y amplificar con los iniciadores CM<sub>3</sub> y CM<sub>1</sub>, apareciera una banda de peso molecular muy parecido a la de 645 pb, ya que probablemente al comprobar

dicha banda mediante estas 2 enzimas de restricción las bandas mostradas serían diferentes o incluso podrían no aparecer.

Al comparar los resultados obtenidos mediante electroforesis e hibridación, se observa que son similares, por lo que cualquiera de las dos técnicas sería efectiva para detectar el producto amplificado por PCR, si bien el empleo de la electroforesis se hace más aconsejable a la hora de efectuar un diagnóstico, debido a su mayor rapidez y menor complejidad que la hibridación.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Departamento de Biología Vegetal de la E.T.S.I.A. de Madrid por su inestimable colaboración.

## ABSTRACT

LLAMAS, S. y NOVAL, C., 1995: Sensitivity of PCR technique for strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bol. San. Veg. Plagas*, **21**(1): 117-123.

Four strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, with three different concentrations, were amplified by PCR technique using CM<sub>3</sub> and CM<sub>4</sub> primers. The amplified products were detected by electrophoresis with agarose gels and dot-blot hybridization. For the electrophoresis, the samples with the highest concentration were treated with restriction enzymes Hinf I and Sal I. The hybridization was done with MIC1 probe.

**Key words:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, PCR, primers, DNA polymerase, restriction enzymes and DNA probes.

## REFERENCIAS

- ALMOGUERA, C.; SHIBATA, D.; FORRESTER, K.; MARTIN, J.; ARNHESIM, N. y PERUCHO, M., 1988: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-k-ras genes. *Cell*, **53**: 549.
- BECK, E. y ZINK, B., 1981: Nucleotide sequence and genome organization of filamentous bacteriophages  $\phi$ 1 and  $\phi$ d. *Gene*, **16**: 35.
- CENIS, J. S., 1993: Identification of Four Major Meloidogyne spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*, **83** (1): 76-80.
- CHIEN, A.; EDGAR, D. B. y TRELA, J. M., 1976: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*, **127**: 1,150.
- ENGELKE, D. R.; HOENER, P. A. y COLLINS, F. S., 1988: Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 544.
- FITTS, R.; DIAMOND, M.; HAMILTON, C. y NERI, M., 1983: DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 1,146-1,151.
- GRIDMONT, P. A. D.; GRIDMONT, F.; DESPLACES, N. y TSCHEN, P., 1985: DNA probe specific for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.*, **21**: 431-437.
- HIGUCHI, R.; VON BEROLDINGEN, C. H.; SENSABAUGH, G. F. y ERLICH, H. A., 1988: DNA typing from single hairs. *Nature*, **332**: 543.
- LLAMAS, S. y NOVAL, C., 1995: Hibridación Molecular de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y otras bacterias con la sonda MIC1. *Bol. San. Veg. Plagas*, **21** (1): 19-27.
- MANULIS, S., 1992: Evaluation of DNA probe for the detection of *Erwinia herbicola* strains pathogenic on *Gypsophila paniculata*. *Plant Pathology*, **41**: 342-347.
- MESSING, J., 1983: New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, **101** 20.
- MULLIS, K. B. y FALOONA, F. A., 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth Enzymol.*, **155**: 335-350.
- NAVOT, N.; ZEIDAN, M.; PICHESKY, E. S.; ZAMIR, D. y CZOSNEK, H., 1992: Use of the Polymerase Chain Reaction to amplify Tomato Yellow Leaf Curl Virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology*, **82** (10): 1,199-1,202.
- OU, C. Y.; KWOK, S.; MITCHELL, S. W.; MACK, D. H.; SNINSKY, J. J.; KREBS, J. W.; FEORINO, P.; WARFIELD, D. y SCHOCHETMAN, G., 1988: DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science*, **239**: 929.
- RESENDEZ-PÉREZ, D. y BARRERA-SALDAÑA, H. A., 1990: Thermocycler Temperature Variation Invalidates PCR Results. *Biotechnique*, **9** (3): 286-292.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R. G.; HORN, T. T.; MULLIS, K. B. and ERLICH, H. A., 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **249**: 487.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. y ARNHEIM, N., 1985: Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1,350-1,354.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. y MANIATIS, T., 1989: *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 6.9-6.13, B-13.
- STEFAN, R. J. y ATLAS, R. M., 1988: DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *App. Env. Microbiol.*, Sep: 2,185-2,191.
- VAN WEZENBEEK, P. M. G. F.; HULSEBOS, T. J. M. y SCHOENMAKERS, J. G. G., 1980: Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: Comparison with phage  $\phi$ d. *Gene*, **11**: 129.
- WONG, C.; DOWLING, C. E.; SAIKI, R. K.; HIGUCHI, R. G.; ERLICH, H. A. y KAZAZIAN, Jr. H. H., 1987: Characterization of  $\beta$ -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature*, **330**: 384.

(Aceptado para su publicación: 21 febrero 1994)