



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE *Agrobacterium vitis*
A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL DE *Vitis vinífera*.**

TESIS DE GRADO
Licenciatura en Bromatología

Brom. Laura Soledad Bree
Mendoza, 2015

METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE *Agrobacterium vitis* A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL DE *Vitis vinífera*.

TESIS DE GRADO

LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Br. Laura Soledad Bree

laura.bree@yahoo.com.ar / lbree@mercierargentina.com.ar

Directora de Tesis: Dra. Liliana Martínez
Co- Director 1: Ing. Agr. Cristóbal Sola
Co- Directora 2: Ing. Agr. Celeste Arancibia

Comité evaluador:

Presidente: Ing. Agr. Ignacio GALARRAGA

Vocales: M. Sc. Ing. Agr. Jorge LAFI
Lic. Adriana TARQUINI

Suplente: Dr. Ricardo MASUELLI

RESUMEN

En nuestro país no está desarrollada una técnica sensible y precisa que permita confirmar la presencia de la bacteria *Agrobacterium vitis*; por lo tanto es muy importante contar con herramientas analíticas que permitan identificar la bacteria en vides y/o suelos para controlar la diseminación y propagación de la misma, permitiendo así a las empresas, mejorar la competitividad de sus productos en el mercado y garantizar la seguridad y calidad de la materia prima principal de la industria vitivinícola. El objetivo de este estudio fue poner a punto una metodología de detección de *Agrobacterium vitis* sensible y de bajo costo basada en la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). El desarrollo de esta metodología pretende ser una herramienta importante para la industria vitivinícola al permitir detectar la presencia o ausencia de la bacteria en programas de monitoreo, tomar decisiones a tiempo y así proteger la calidad y sanidad de las vides. En el presente trabajo se empleó la metodología propuesta por Eastwell y colaboradores en 1995. La misma consistió en el aislamiento de la bacteria en medio selectivo RS, en la extracción/purificación de ADN bacteriano, amplificación por PCR, separación del producto amplificado por electroforesis y revelado por tinción, pudiéndose observar que el 100% del material con sintomatología que se utilizó presentó desarrollo de colonias características de *Agrobacterium vitis*. Al hacer la amplificación de los ADN y posterior revelado se observó, en primera instancia, que la amplificación no fue óptima, pero cuando se realizaron las distintas adaptaciones de la técnica se vieron diferentes resultados encontrándose que podría tratarse de: *A. vitis* virulento, no virulento o *A. tumefaciens*. Para ello fue necesario adecuar la técnica y estudiar algunos aspectos tales como las temperaturas de incubación de los medios de cultivos, evaluación de la concentración de ADN para determinar si existía una concentración mínima del mismo para su posterior amplificación. También se trabajó con diferentes concentraciones del gel de agarosa y se modificaron los volúmenes de siembra y los tiempos de corrida del gel en la cuba de electroforesis. Fue posible adaptar la metodología para la identificación de cepas de *Agrobacterium vitis*. Los mejores resultados se evidenciaron trabajando con una temperatura de incubación de las colonias de 28 °C, con una concentración del gel de agarosa del 2 % tal como lo indicaba la técnica original, volúmenes de siembra de electroforesis de 10 µl de PCR producto y un tiempo de corrida del gel en la cuba de electroforesis de 70 min a 90 Voltios. Además observamos que concentraciones de ADN superiores a 49 ng/µl registraron bandas visibles siendo las de 116 ng/µl o superiores las concentraciones más adecuadas y óptimas para la obtención de bandas bien definidas y nítidas.

AGRADECIMIENTOS

A mis hijos: Nahuel y Uriel que son mis dos grandes pilares de la vida, por darme fuerza para luchar todos los días por el logro de este gran objetivo.

A mis padres, por darme valor, amor, aliento y sobre todo por brindarme su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera.

A mi directora de tesis: Dra. Liliana Martínez y Co-directores: Ing. Agr. Cristóbal Sola e Ing. Agr. Celeste Arancibia que con su aliento, amistad y conocimientos me apoyaron en la culminación de la investigación.

A mi querida Facultad de Ciencias Agrarias por promover el Ciclo de Licenciatura en Bromatología, que me permitió cursar las materias en tiempo y forma para que pueda seguir cumpliendo con mis actividades laborales y personales y sobre todo a la directora de esta gestión: Dra.: Susana Marín por su apoyo y aliento permanente.

A mis compañeros/as del Ciclo de Licenciatura en Bromatología que me motivaron y me permitieron llevarme la alegría de conocer los/las a lo largo de estos tres años y sembrar una amistad con un grupo de gran calidad humana.

A Vivero Mercier Argentina que subsidio este proyecto para la compra de insumos y materiales necesarios y a la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Cs. Agrarias por permitirme utilizar sus instalaciones y equipos.

A todas aquellas personas, profesores, familiares, colegas y amigos que en alguna forma participaron en mis estudios y me enseñaron con su ejemplo.

Y especial gracias a mi gran amor Alejandro Sánchez, hoy mi ángel en el cielo y mi guía espiritual, que me dio la fortaleza para terminar mi carrera, y la enseñanza de que la vida comienza cada día. QEPD.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	8
1. La viticultura en el mundo, en Argentina y en Mendoza.....	9
2. <i>Agrobacterium spp</i>	11
2.1 Definición.....	11
2.2 Clasificación taxonómica de <i>Agrobacterium</i>	12
2.2.1 Clasificación en biovares.....	12
2.3 Patogenicidad de la bacteria.....	13
3. <i>Agrobacterium vitis</i>	14
3.1 Distribución geográfica.....	14
3.2 Hospederos.....	14
3.3 Características de la enfermedad.....	14
3.4 Sintomatología.....	14
3.5 Etiología de la bacteria.....	15
3.6 Diseminación.....	16
3.7 Tendencia para la infección.....	17
3.8 Mecanismo de infección de <i>Agrobacterium vitis</i>	17
3.8.1 Plásmido Ti.....	18
3.8.2 Proceso de inducción tumoral.....	18

4. Opciones de manejo.....	19
4.1 Seleccionando el material a plantar en el viñedo.....	19
4.2 Manejo cultural.....	19
4.3 Manejo químico y biológico.....	20
5. Metodología para la detección.....	20
5.1 Introducción.....	20
5.2 Fundamentación de la técnica por aplicación de PCR.....	21
5.2.1 Termociclador.....	22
5.3 Electroforesis.....	23
5.3.1 Fundamentos.....	23
5.3.2 Electroforesis de geles de agarosa.....	24
5.3.3 Cuba de electroforesis.....	24
5.4 Revelado de geles.....	25
5.4.1 Visualización de geles / Transiluminador.....	25
5.5 Medición de la concentración de ADN.....	26
5.5.1 Picodrop.....	26
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y METODOS.....	28
1.1 Material vegetal.....	28
1.2 Materiales y equipos de laboratorio.....	28
1.3 Compuestos químicos y reactivos.....	28
1.4 Método analítico.....	29

1.4.1	Preparación de la muestra.....	29
1.4.2	Aislamiento.....	29
1.4.3	Medio de cultivo semiselectivo.....	30
1.4.4	Siembra en medio de cultivo RS.....	31
1.4.5	Extracción de ADN.....	32
1.4.6	Amplificación por PCR.....	33
1.4.7	Preparación del gel de agarosa.....	35
1.4.8	Siembra y electroforesis.....	37
1.4.9	Revelado.....	37
2	Modificación de la técnica de Eastwell y colaboradores.....	38
3	Ensayos para la comprobación de adaptaciones de la técnica.....	39
3.1	Temperatura de crianza para el desarrollo de las colonias bacterianas.....	39
3.2	Concentración de ADN necesario para la reacción de PCR.....	39
3.3	Ensayo de amplificación a distintas concentraciones de ADN.....	39
3.4	Concentración del gel de agarosa.....	39
3.5	Tiempo de corrida de electroforesis.....	40
3.6	Modificación del volumen de siembra para la electroforesis.....	40
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
	CONCLUSIONES.....	48
	Perspectivas.....	49
	BIBLIOGRAFIA.....	50
	ANEXOS.....	53

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Debido a la importancia de la viticultura en nuestra zona el presente trabajo tiene como objeto el estudio de una técnica para la detección del procarionte *Agrobacterium vitis*, que causa una enfermedad llamada “agalla de corona”, de importancia a nivel mundial. Las vides infectadas pueden albergar cepas patógenas como no patógenas y permanecer sin síntomas hasta que las vides sean perjudicadas (Burr, 1983; Katz, 1984). La bacteria puede causar agallas que interfieren con la función del sistema vascular de la planta reduciendo su vigor y productividad. Las viñas con agallas, frecuentemente, producen menor crecimiento de raíces, y la parte de la planta con agallas puede morir. Las primeras agallas aparecen a principio de verano, son blancas, carnosas y forman callos. Las agallas se vuelven marrones a final del verano y el otoño comienza a secarlas dando un aspecto de corcho. Cuando las agallas son numerosas o cuando se localizan en las raíces principales o en la corona, interrumpen el transporte del agua y de los nutrientes, de modo que las raíces van muriendo gradualmente, y a veces provoca la muerte de la planta completa (Plantpro, 2013).

Para limitar la extensión de la agalla de corona en viñedos, es importante asegurar que los materiales de propagación estén libres de *Agrobacterium vitis* antes de la plantación. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) rápidamente sustituye a muchos métodos lentos tradicionales para diagnosticar *Agrobacterium sp.* Sin embargo, muchos primers existentes tienen limitaciones debido a la diversidad de las especies de *Agrobacterium*. Por ejemplo, algunos primers son limitados, otros fallan en distinguir las cepas patógenas y las cepas no patógenas y otros dan amplificaciones que no son reproducibles o bien son no específicos. En nuestro país aún no se ha desarrollado una técnica específica que permita la detección de cepas virulentas de *Agrobacterium vitis* y evaluar su presencia en plantas afectadas con o sin la sintomatología descrita. (Eastwell 1995)

Es importante entonces, contar en nuestro medio con herramientas analíticas que permitan determinar la presencia de la bacteria en vides y/o suelos para controlar la diseminación y propagación de la misma, permitiendo así a las empresas mejorar la competitividad de sus productos tanto en el mercado interno como externo y garantizar la seguridad y calidad de la materia prima principal de la industria vitivinícola.

El método consiste en la extracción / purificación de ADN bacteriano, identificación por método PCR, amplificación del PCR y revelado del producto PCR por medio de migración por electroforesis. El desarrollo de esta metodología pretende ser una herramienta importante para la industria vitivinícola, para proteger la calidad y sanidad de las vides que son materia prima de la industria del vino y garantizar programas de monitoreo de presencia / ausencia de la bacteria para tener una herramienta que permita tomar decisiones a tiempo.

1. La viticultura en el mundo, en Argentina y en Mendoza

La vid pertenece a la familia de las Vitáceas, lianas o arbustos de aspecto sarmentoso y provisto de zarcillos. En particular, en el género *Vitis* se distingue la especie *Vitis vinífera*, a la que pertenecen la gran mayoría de las variedades utilizadas para vinificar. Las uvas adecuadas son la clave indispensable para el éxito en la elaboración de vino, y de forma muy especial, para un vino de alta calidad enológica.

Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2011) los diferentes países de la Unión Europea cultivan el 59,5 % de la superficie mundial de viñedos y el 70% de la producción de uva se destina a la elaboración de vinos.

Los principales países productores de vinos son Francia, Italia y España. En América, el mayor productor es Estados Unidos y en Sudamérica, es Argentina seguido de Chile (OIV, 2011).

La República Argentina, actualmente, posee una superficie cultivada con vid de 221.202 ha, representando el 2,81 % de la superficie mundial.

En el país se observa un predominio de variedades de vinificar que representan el 92,30 % del total implantado, las variedades de mesa constituyen el 5,6 % de la superficie y las pasas el 1,73 % (Figura 1)

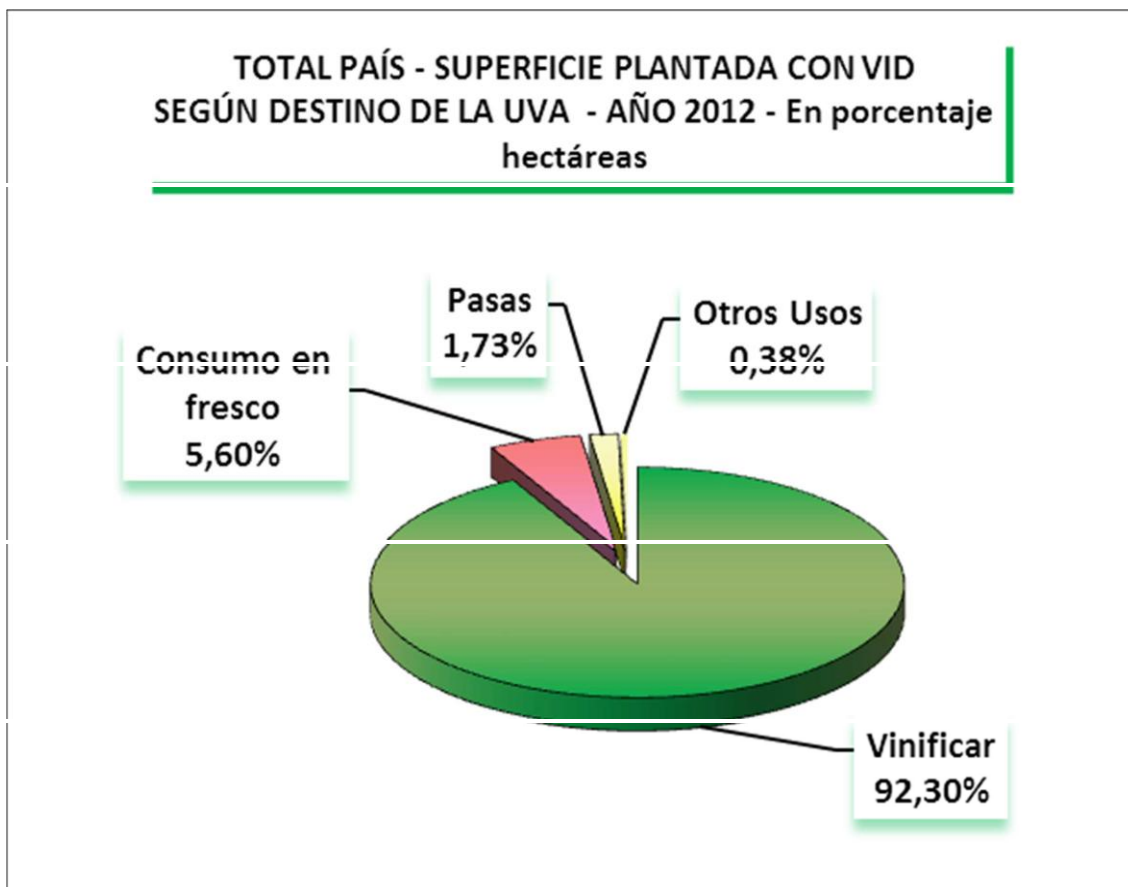


Figura 1: Superficie plantada con vid en el país según destino de la uva, Año 2012

Fuente: INV, 2014

De un total de 25.207 viñedos en la Argentina el 66 % de los viñedos del país se encuentran en la provincia de Mendoza, el 21 % en San Juan, el 5 % en La Rioja y el 5 % en Catamarca (INV, 2012).

En el encepado prevalecen las variedades de vinificar y en éstas las tintas como resultado de la adecuación de las hectáreas plantadas hacia variedades de alta calidad enológica para hacer frente a la demanda de vinos de calidad y así cumplimentar los requerimientos tanto del mercado interno como externo. El 98,4% de la superficie plantada con vides en Mendoza es con variedades de vinificar (Figura 2) (INV, 2012).

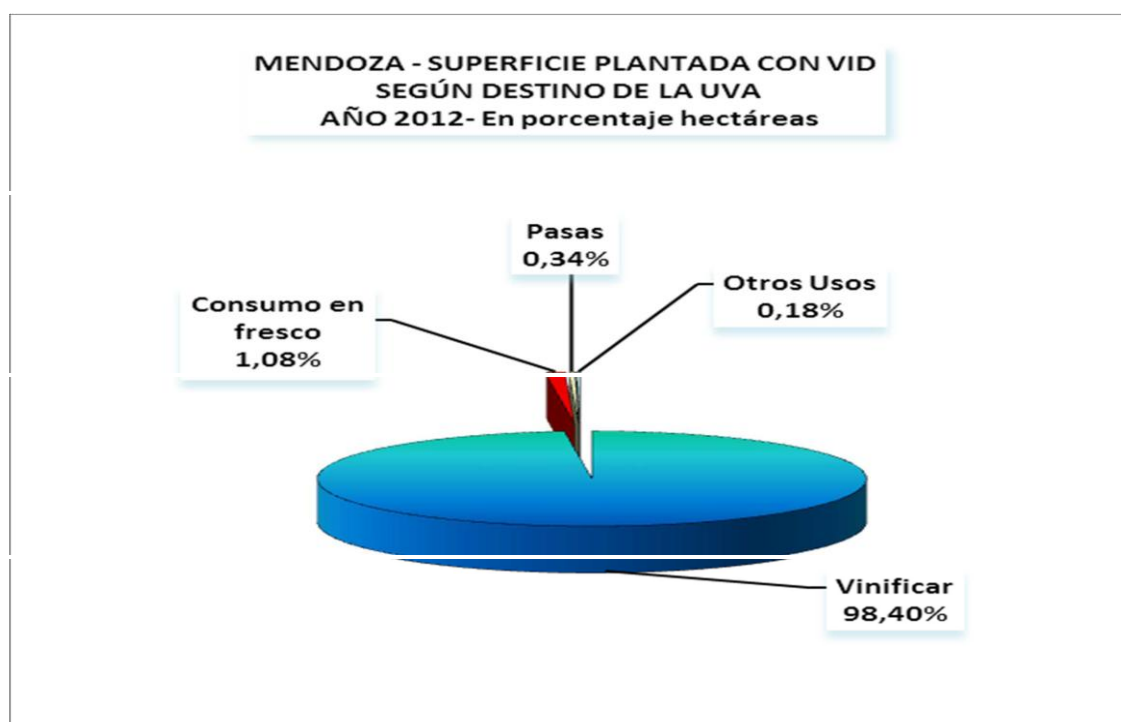


Figura 2: Superficie plantada con vid en Mendoza según destino de la uva, Año 2012
Fuente: INV, 2014

La reducción del mercado interno ocurrida en la década del 90, debido a la disminución del consumo, ha generado un sostenido incremento de las exportaciones de vinos, que ha sido acompañada con una mejora en la tecnología de elaboración utilizada. Esto ha hecho que en los últimos 10 años la República Argentina se haya incorporado a los países exportadores de vinos, en el decimoprimer lugar con productos de excelente calidad (INV, 2011).

Todos estos cambios en la composición, calidad y oferta de vinos, ha multiplicado las oportunidades de negocios, favorecidas por el reconocimiento de las características cualitativas de los vinos argentinos en el exterior, que se encuentran comprendidos en franjas de precios que les permiten competir en los mercados tradicionalmente consumidores de vinos de otras regiones productoras (INV, 2011).

La inserción en los mercados internacionales generó una notable innovación en la Vitivinicultura Argentina, motivada principalmente por la necesidad de adecuarse a las nuevas

exigencias de los mercados importadores. Para ello, la industria vitivinícola argentina realizó un proceso de reconversión hacia **viñedos de alta calidad enológica** para brindar materias primas adecuadas para la elaboración de vinos conforme a las exigencias de los mercados externos (INV, 2011).

2. *Agrobacterium* ssp

2.1 Definición

Agrobacterium es un género de bacterias que pueden causar tumores en las plantas. Esta capacidad tumorigénica viene dada por su habilidad natural para transferir ADN a las células vegetales (Francis y Spiker, 2005)

Agrobacterium tumefaciens (Smith and Townsend, 1907) (= *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck and van Delden, 1902); = *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden) Young *et al.*) es la especie más comúnmente estudiada de este género. En plantas causa la *enfermedad de las agallas del cuello*, denominada así porque produce agallas o tumores, a menudo en la zona donde se une la raíz al tallo (cuello, o también llamado corona) (Figura 5). Los tumores son producidos por la transferencia de un segmento de ADN (ADN-T) del plásmido bacteriano Ti (abreviatura de tumor-inducing). La especie próximamente relacionada, *A. rhizogenes*, puede inducir la formación de raíces pilosas, y presenta un plásmido distinto denominado Ri (abreviatura de root-inducing). La especie *Agrobacterium vitis*, restringida generalmente a la vid, puede presentar plásmido Ti. (Francis y Spiker, 2005)

La Figura 3 muestra una agalla o tumor producido por el género *Agrobacterium*.



Figura 3. Agallas o tumores producidos por el género *Agrobacterium*

Zona: Ugarteche – Lujan de Cuyo Mendoza

2.2 Clasificación taxonómica de *Agrobacterium*.

Tradicionalmente, las especies del género se clasificaban de acuerdo con su capacidad patogénica; estas comprendían *A. tumefaciens*, especie polífaga que induce la formación de agallas en cuello y raíz; *A. rubi*, que induce la formación de agallas sobre un rango de hospedantes limitado, principalmente frambueso; *A. vitis*, específico de vid; *A. larrymoorei*, que provoca agallas aéreas en *Ficus benjamina*, y *A. rhizogenes* que induce el desarrollo de raíces en cabellera. Por otra parte, se ubicaban las especies no patogénicas, como *Agrobacterium radiobacter*. Posteriormente, el género aparece dividido en 4 especies, *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* y *A. vitis*, las cuales, con excepción de *A. rubi*, se subdividen a su vez en biovares sobre la base de características fisiológicas y bioquímicas (Alippi, Lopez y Belatti, 2011).

Síntesis de la clasificación taxonómica de *Agrobacterium*:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Proteobacterias alfa

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Agrobacterium*

Especies:

Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium rhizogenes

Agrobacterium rubi

Agrobacterium vitis

2.2.1 Clasificación en biovares

Basándose en una serie de características bioquímicas, se clasificaron las agrobacterias en tres biovares que se corresponden, en la actualidad, con tres de las especies del género. Las características de cada biovar se muestran en la Tabla 1 y se han establecido en función de las temperaturas máximas de crecimiento y su capacidad para utilizar determinados ácidos orgánicos, polialcoholes e hidratos de carbono. (Pérez 2003).

Tabla 1: Principales características que diferencian las especies del género *Agrobacterium*

PRUEBAS	ESPECIES		
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>
Producción de 3-cetolactosa	+	-	V
Crecimiento en 2 % NaCl	+	-	+
Crecimiento a 35°C	+	V	V
Acción en litmus milk	Alcalina	Acida	Alcalina
Película en citrato amónico-férrico	+	-	-
Reacción oxidasa	+	V -	V -
Utilización de citrato	V -	+	+
Producción de ácido a partir de:			
Eritritol	-	+	-
Melecitosa	+	-	-
Producción de álcali a partir de:			
Ácido malónico	-	+	+
Ácido L-tartárico	-	+	+
Ácido múxico	-	+	-

Fuente: (Pérez 2003)

+: 80% o más cepas positivo;

V: entre el 21-79% de cepas positivas;

-: 80% o más cepas negativas.

2.3 Patogenicidad de la bacteria

Agrobacterium es un género polifilético que pertenece a la subdivisión alfa de la subclase *Proteobacteria*, familia *Rhizobiaceae*. Incluye tanto especies fitopatógenas que inducen la formación de agallas en el cuello o la proliferación de raíces en cabellera, según contengan el plásmido Ti o Ri, respectivamente; como especies no patógenas cuyo hábitat natural es el suelo. *Agrobacterium* infecta a más de 600 especies ubicadas dentro de 90 familias de dicotiledóneas, que incluyen cultivos de importancia económica como frutales (ciruelos, durazneros, perales, frambuesos, nogales, cerezos, arándanos), hortícolas (tomate, pimiento, berenjena), industriales (girasol, olivo, vid, soja), ornamentales (rosales, crisantemos) y forestales (álamos, sauces) (Alippi A, Lopez A y Balatti P 2011).

Las especies patógenas de *Agrobacterium* comparten una característica: contienen un plásmido de entre 200 y 800 kbp denominado **plásmido Ti (tumor-inducing)** o Ri (*root-inducing*), según su capacidad de inducir en el hospedante la formación de agallas en la zona del cuello o la corona y/o agallas aéreas en la parte inferior del tallo, o la proliferación de raíces en cabellera, respectivamente. Esto es el resultado de un mecanismo complejo y único codificado en el plásmido, por medio del cual la bacteria transfiere ADN del plásmido Ti o Ri, que se expresa y por ello afecta a las células vegetales. La virulencia está determinada por diferentes regiones

presentes en estos plásmidos; estas incluyen el ADN de transferencia (T-DNA) y los genes de virulencia (*vir*). Si bien los plásmidos Ti y Ri varían en gran medida entre las diferentes cepas bacterianas, siempre contienen genes *vir* similares. El plásmido ADN-T se integra semi-aleatoriamente en el genoma de la célula huésped, y los genes de virulencia del ADN-T se expresan causando la formación de una agalla. El ADN-T lleva genes de enzimas biosintéticas para la producción de aminoácidos inusuales, típicamente **octopina o nopalina**. También lleva genes para la biosíntesis de hormonas de las plantas, como **auxinas y citocininas**. Estos alteran el equilibrio hormonal en la célula, de forma que la planta no puede controlar la división de esas células, formándose tumores. La relación de auxina y citocinina determina la morfología del tumor. (Alippi A, Lopez A y Balatti P 2011).

3. *Agrobacterium vitis*

3.1 Distribución geográfica

La bacteria *Agrobacterium vitis* (*Ophel y Kerr*) se distribuye por las siguientes zonas geográficas: Europa, América y Oceanía. En el caso concreto de Argentina se encuentra en cualquier zona vitícola y es muy común en los viveros.

3.2 Hospederos

En general, el principal hospedero de esta bacteria es la vid; aunque puede producir tumores en otras especies herbáceas y leñosas tras ser inoculada.

3.3 Características de la enfermedad

Las cepas, tanto patógenas como no patógenas, pueden sobrevivir epifíticamente sobre el vegetal; hasta la producción de una herida. La superproducción de células vegetales puede causar que las agallas interfieran con la función del sistema vascular de la planta reduciendo su vigor y productividad. Las plantas con agallas frecuentemente producen menor crecimiento de raíces, y en algunos casos puede morir. (Lastra Pozo y Lopez Gonzalez)

3.4 Sintomatología

La sintomatología característica es la aparición de tumores de entre 0,5 - 1 cm hasta 10 cm de diámetro y se pueden presentar de forma aislada o agrupados. Los tumores pueden aparecer en distintas partes de la planta: raíces, cuello y sarmientos ya que la bacteria migra sistémicamente. (Lastra Pozo y Lopez Gonzalez)

Los tumores son debidos a la superproducción de auxinas y citocininas que originan hipertrofia e hiperplasia de las células vegetales. Las primeras agallas aparecen a principio de verano; son blancas, carnosas y forman callos. Las agallas se vuelven marrones hacia el final del verano y durante el otoño se secan dando un aspecto de corcho por endurecimiento y oscurecimiento de la epidermis (Figura 4). Cuando las agallas son numerosas o cuando se localizan en las raíces principales o en la corona, interrumpen el transporte del agua y de los nutrientes, de modo que las raíces y/o coronas mueren gradualmente, y en algunos casos provoca la muerte de la planta completa (Lastra Pozo y Lopez Gonzalez).

En los sarmientos provoca también desgarramiento longitudinal de la corteza formándose en el interior de las heridas numerosos tumores o nódulos. La presencia de tumores puede no ir acompañada de la muerte de la cepa, pero en todos los casos reduce el crecimiento, vigor, productividad y calidad de la uva. Además, se producen heridas y necrosis, que pueden servir de puerta de entrada a numerosos patógenos (Lastra Pozo y Lopez Gonzalez).



Figura 4: Características del tumor producidas por *Agrobacterium vitis*
Cátedra de Fisiología Vegetal Facultad de Cs. Agrarias UNC

3.5 Etiología de la bacteria

- Bacteria con forma bacilar (forma de bastón), (Figura 5)
- Gram–negativa,
- Mótil con flagelos periféricos que permiten su movimiento
- No esporulada.
- Químio–organoheterótrofa, utiliza una amplia gama de fuentes de carbono.
- Las cepas causantes de tumores tienen un plásmido conjugativo denominado Ti, directamente relacionado con la inducción tumoral.
Son bacterias aerobias, aunque se han descrito algunas cepas con capacidad de anaerobiosis en presencia de nitrato. La mayoría de las cepas son capaces de crecer en bajas concentraciones de oxígeno en el interior de los tejidos de la planta. (Pérez 2003)
- Presentan supervivencia sistémica.
- La morfología de las colonias es variable según el medio en que se cultive, pero la mayor parte son de forma circular, mucosas, convexas, de color blanco a amarillo hueso. En algunos casos adquieren tonalidad rojiza o anaranjada, según los componentes del medio. El crecimiento en medios con hidratos de carbono va acompañado de una abundante producción de polisacáridos extracelulares en forma de mucus.
- Colonias en medio **semi-selectivo RS**: son medianas y pequeñas, de color rojo oscuro característico, lisas y de forma irregular. (Figura 6)
- Temperaturas óptimas de desarrollo: 25 – 28 °C, letal 51 °C.

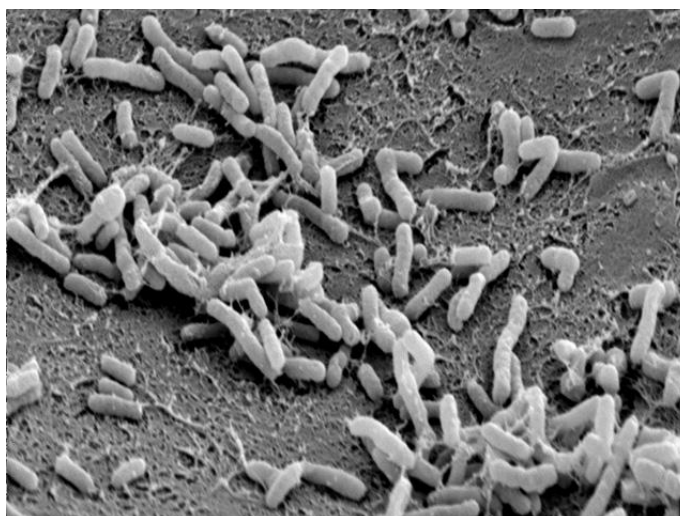


Figura 5: Fotografía electrónica de *Agrobacterium vitis*.



Figura 6: Colonias características de *Agrobacterium vitis*
Cátedra de Fisiología Vegetal Facultad de Cs. Agrarias UNCuyo.

3.6 Diseminación

La enfermedad se disemina comúnmente, por suelo, agua, aire, sustrato, material vegetal y por toda labor cultural que provoque heridas con herramientas contaminadas. (Morillo Gomez, 2011)

La supervivencia sistémica de estas bacterias favorece la dispersión de la enfermedad, ya que pueden permanecer latentes durante varios años en plantas asintomáticas, permitiendo su diseminación a cortas y largas distancias en el material vegetal. Precisan de una herida o micro lesión para poder penetrar en la planta por lo que tanto factores climáticos (heladas, granizos), como culturales (poda, labores de mantenimiento de suelo) o el ataque de distintos parásitos favorecen su diseminación. El exceso de abonado, o el desequilibrio entre nitrógeno y potasio y el uso de determinados patrones y variedades parecen también favorecer los ataques de la

bacteriosis. Generalmente las bacterias son más abundantes en células vegetales ubicadas ya sea cerca o en la superficie donde se desarrolla la enfermedad (Morillo Gomez, 2011)

3.7 Tendencia para la infección.

Una de las características más importantes de *Agrobacterium vitis* es su capacidad para moverse y sobrevivir en el interior de la planta de vid. Esta “**supervivencia sistémica**”, permite a la bacteria tomar ventaja de las lesiones provocadas por la congelación u otros factores externos y causar la enfermedad no solo a nivel del suelo, sino también en las partes aéreas de la planta. En la primavera, conforme la savia comienza a moverse de las raíces a los brotes, las células bacterianas son transportadas a través de la planta. La bacteria también puede diseminarse a través de cortes aparentemente sanos. Las plantas de vid pueden permanecer sin mostrar síntomas de la enfermedad por varios años hasta que las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo cuando se presentan lesiones por las heladas. Las agallas también se pueden formar en sitios que no son brotes, en la base de las estacas enraizadas, y en los injertos. Las plantas con agallas reducirán su vigor y rendimiento. La bacteria también puede causar la muerte (por necrosis) de las raíces. Un ataque grave puede matar a todas las plantas del viñedo (Fritz W. y Stephen J. 2014)

Aún cuando las plantas de vid infectadas sean removidas del viñedo, *A. vitis* puede sobrevivir por varios años en las raíces o en los restos de plantas que quedan en el suelo. Como consecuencia, la erradicación de este patógeno de un viñedo infectado puede ser muy difícil. (Fritz W. y Stephen J., 2014)

Las lesiones por congelación y otro tipo de heridas en la vid juegan un papel muy importante en el proceso de infección de las plantas. Las lesiones no solo proporcionan un modo de entrada a través del corte, sino que también producen compuestos que al responder al estrés de la planta, atraerán a las bacterias a estos sitios (Fritz W. y Stephen J. 2014)

3.8 Mecanismos de infección de *Agrobacterium vitis*

La mayoría de los genes involucrados en la formación de tumores de *Agrobacterium* están codificados en plásmidos. En el género *Agrobacterium* el plásmido más característico es el Ti y la mayoría de los genes que contiene juegan papeles directos o indirectos en la tumorigénesis. Este plásmido tiene un tamaño de entre 150 a 250 Kb, aunque se han encontrado plásmidos Ti de hasta 500 Kb. El contenido medio de G+C del plásmido es del 55%, aunque algunas regiones son más ricas en A-T, como el T-DNA. Se han contabilizado hasta 198 ORFs y probablemente todas codifican proteínas funcionales (Pérez P, 2003).

Existe una gran diversidad de plásmidos Ti y se clasifican según el tipo de opina que sintetizan. Los más estudiados son los plásmidos de nopalina/agrocinopina (como pTiC58 y pTiT37) y los plásmidos de octopina/manopina (pTiB6, PtiAch5, pTiR10 y pTi15955). Los plásmidos de tipo octopina tienen en común unas 65 Kb respecto al pTiC58 (Perez P 2003).

La organización genética del plásmido Ti puede verse como una disposición en mosaico donde las regiones están más o menos bien conservadas. Globalmente, presenta una estructura modular con genes de funciones similares agrupados juntos. Así, se pueden definir cinco componentes: La región del T-DNA, que codifica las secuencias que son transferidas a la planta

huésped; la región *vir*, que dirige el procesamiento y transferencia del T-DNA; los loci *tra* y *trb*, que dirigen la transferencia conjugativa del plásmido Ti y que, a diferencia de los otros componentes, no están agrupados sino separados por 60 Kb; la región *rep* que se requiere para la replicación del plásmido Ti; y los genes que dirigen la adquisición y el catabolismo de las opinas (Pérez P 2003). (Figura 7)

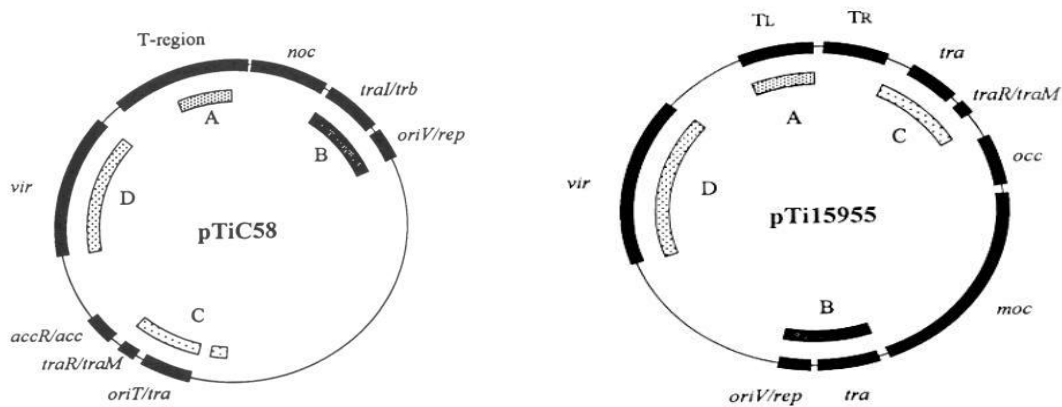


Figura 7. Organización funcional del plásmido Ti tipo nopalina (pTiC58) con sus diferentes áreas y del plásmido tipo octopina (pTi15955).

Fuente: Perez P. 2003

3.8.1 Plásmido TI

La región del plásmido que se transfiere a la célula huésped, se denomina t-DNA. En ella, se encuentran genes para la síntesis de una o varias auxinas, de una o varias citocininas y de opinas. Las **auxinas y citocininas** son las responsables de la formación del tumor, por proliferación y crecimiento exacerbados de las células vegetales. **Las opinas son derivados de aminoácidos, que sirven de principal de nutriente de *Agrobacterium vitis*, sirviéndole a la bacteria de fuente de energía, por oxidación aerobia.** (Morillo Gomez, S. 2011)

La región t-DNA, se encuentra flaqueada por dos secuencias constituidas por repeticiones directas de 23 nucleótidos, en alguna ocasión 25, que delimitan que zona del plásmido se va a movilizar. Estas secuencias se denominan borde derecho e izquierdo del t-DNA. Todo lo ubicado entre ambas, pasará a la célula vegetal. (Morillo Gomez, S. 2011)

Los genes de virulencia son los encargados de transferir y proteger el t-DNA. Se encuentran como un operón. En la región que no se transfiere quedan los genes para el catabolismo de opinas. (Morillo Gomez, S. 2011)

Como todo plásmido, para poder permanecer en la bacteria sin perderse, porta el origen de replicación de *Agrobacterium vitis*. En conclusión, la función del plásmido es convertir a la planta en una factoría productora de opinas, para satisfacer los requerimientos energéticos de la bacteria. (Morillo Gomez, S. 2011)

3.8.2 Proceso de Inducción tumoral

Los descubrimientos más importantes del mecanismo de infección se basan en las siguientes características: la tumorigénesis requiere la transferencia de fragmentos de DNA

oncogénico a células de la planta infectadas; este proceso evolucionó a partir de un sistema de transferencia conjugativa; los genes que dirigen este proceso se expresan en respuesta a señales químicas que libera el huésped. Se han descrito al menos siete pasos en la inducción tumoral (Llop, 2003):

- 1) Reconocimiento de una célula vegetal susceptible,
- 2) Unión de la bacteria a la célula vegetal,
- 3) Inducción de la expresión de los genes *vir*,
- 4) Producción de una copia transferible del T-DNA,
- 5) Transferencia del complejo-T a la célula vegetal,
- 6) Integración del complejo-T en el genoma nuclear de la planta, y
- 7) Expresión de los genes que contiene el T-DNA.

4- Opciones de manejo

4.1 Seleccionando el Material a Plantar en el Viñedo

El uso de variedades resistentes a la agalla de la corona es una de las mejores herramientas para el control. La susceptibilidad de las plantas de vid a *A. vitis* varía entre las variedades de vid. En general, las variedades de *Vitis vinífera* son muy susceptibles a esta enfermedad, mientras que las variedades americanas y los híbridos franceses-americanos presentan cierta resistencia a este patógeno. Las investigaciones realizadas han demostrado que el injerto de un vástago susceptible a un patrón resistente reduce significativamente la incidencia de la agalla de la corona en condiciones normales de campo. Aunque no se conoce bien, la resistencia aparentemente en el vástago susceptible puede limitar la supervivencia de *A. vitis* en el porta injerto resistente o en la producción de compuestos por el patrón que son inhibidores de la bacteria. La propagación llamada “punta de tallos” o “yemas apicales” (shoot tip), ha sido también utilizada para producir materiales vegetativos libres de *A. vitis*. Los investigadores han sido incapaces de detectar la bacteria en estos brotes verdes. En Nueva York, las vides propagadas a partir de cortes verdes de yemas apicales permanecen libres de agalla de corona bajo condiciones de climas fríos aún después de 7 años de crecimiento. Otra alternativa es la utilización de material vegetativo certificado. Mientras que el uso de material vegetativo certificado es considerado una práctica de manejo buena, hay que tener en cuenta que el que la bacteria no haya sido detectada no garantiza completamente que el material vegetativo esté libre de la bacteria. (Fritz Westover 2014)

4.2 Manejo Cultural

Prácticas culturales que mitiguen los daños mecánicos y los daños causados por el congelamiento han probado ser la manera más eficiente para el manejo de esta enfermedad. La selección adecuada del sitio del viñedo es crítica en las nuevas plantaciones de vid, por ejemplo, evitar suelos pesados en áreas húmedas donde son más probables las heladas (zonas bajas). (Fritz Westover 2014)

Otra manera de ayudar al control de esta enfermedad es realizar una buena limpieza y desinfección cuando se eliminan las plantas que han sido infectadas. También tener mucho cuidado en eliminar la mayor cantidad del sistema radical de las plantas enfermas cuando esto sea posible. El patógeno que provoca la agalla de la corona puede estar presente en altos niveles

en el sistema radical de las plantas infectadas. El remover y destruir la mayor parte del material vegetativo de la planta cuando sea posible, reduce la habilidad del patógeno para sobrevivir en el suelo. (Fritz Westover 2014)

Algunos estudios han demostrado que la incidencia de la agalla de corona está correlacionada positivamente con el daño causado por nematodos. Por lo tanto, los productores deben realizar análisis del suelo para detectar la presencia de nematodos antes de que se realice la plantación del viñedo. Deben evitarse áreas que estén infectadas con el nematodo agallador de las raíces y utilizar siempre material genético (porta-injertos) resistentes a los nematodos. (Fritz Westover 2014)

4.3 Manejo Químico y Biológicos

Aunque varios productos químicos y de control biológico se encuentran disponibles para el control de la agalla de corona causada por *A. tumefaciens* estos productos están dirigidos a otros cultivos, y no son efectivos para el control de esta enfermedad en plantas de vid infectadas con *A. vitis*. No existen productos químicos o controles biológicos confiables para el control de *A. vitis*. Sin embargo, las investigaciones que se realizan actualmente en control biológico son prometedoras. Por ejemplo, se han identificado cepas antagónicas a *A. vitis* que no producen agallas y pudieran usarse en un futuro para el control biológico de la agalla de la corona en vid. Su eficiencia y su viabilidad comercial están siendo evaluadas actualmente alrededor del mundo. (Fritz Westover 2014)

5- Metodología para la detección

5.1 Introducción

Las metodologías existentes para proporcionar resultados potenciales de *Agrobacterium vitis* (*Agrobacterium tumefaciens* biovar 3) están basadas en métodos que implican cultivar las muestras sobre medios selectivos por Ejemplo el medio YEM-RCT y posterior identificación de la bacteria por morfología de las colonias (aparecen mucosas, convexas, circulares, con márgenes enteros y de color negro más marcado en la parte central, probablemente debido a una acumulación de cristales negros de telurito metálico). Actualmente existen otras metodologías que están disponibles para mejorar su identificación ya que cuando se extrae una muestra de *A. vitis* a partir de cortes del tumor, es muy frecuente encontrar concentraciones relativamente bajas de este patógeno. Además, es necesario *a posteriori*, descartar la presencia de otros patógenos de las muestras. Para ello, se recurre al empleo de medios de cultivo selectivos que permitan el crecimiento exclusivo de *A. vitis* y de esta manera se puede disponer de material puro y en alta concentración, sin contaminaciones que pudieran interferir en la posterior PCR. (Adriana M. Alippi, Ana C. López, Pedro A. Balatti, 2011)

Otros métodos de ensayo que pueden nombrarse son: el indexado biológico que se detecta por susceptibilidad a la enfermedad pero cuya sensibilidad es muy baja o con el test de ELISA que detecta una proteína del patógeno y cuya sensibilidad es moderada a baja. Es recomendable usar más de un método de ensayo para resultados más fiables. (Judith Monis, Ph.D)

5.2 Fundamentación de la técnica por aplicación de PCR.

La **reacción en cadena de la polimerasa**, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1987 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo fragmento original que se toma como molde; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar, con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de enfermedades, identificar personas o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida. (Wikipedia)

La técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN-polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente. Para ello es necesario realizar *in vitro* las condiciones adecuadas para conseguir copias de fragmentos de ADN. El ADN se encuentra en forma de doble hélice. Para que se pueda amplificar cada hebra, es necesario que se rompan los enlaces existentes para que se mantenga esa estructura. Este proceso se realiza elevando la temperatura aproximadamente a 95 °C durante un breve periodo de tiempo. A esta etapa se la denomina desnaturalización. Posteriormente, se necesita que los cebadores (oligonucleótidos o secuencias cortas de ADN de unos 20 nucleótidos diseñadas para que flanqueen una zona específica de ADN que se quiera amplificar) se anclen a sus secuencias complementarias. Para ello, la temperatura juega un papel importantísimo, puesto que cada pareja de cebadores (siempre se habla de parejas puesto que se debe tener un primer o cebador por un lado y otro por el otro para que se amplifique el mismo fragmento por ambos lados y producir la amplificación de la zona flanqueada) hibrida (se une al ADN) a una temperatura que, generalmente, puede variar entre 45 y 65 °C. Hay protocolos en los que se utilizan variaciones de temperatura para obtener un mejor rendimiento. Finalmente, se necesita una extensión de los fragmentos flanqueados por los primers gracias a la acción de una enzima llamada ADN-polimerasa y que tiene su temperatura óptima de reacción a 72 °C. Por lo tanto y en resumen se tienen en todo el proceso 3 fases: desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión de los fragmentos. Al final de todo el programa, se introduce una fase de extensión más larga para que se termine de obtener un mayor número de copias (Figura 8) (Wikipedia)

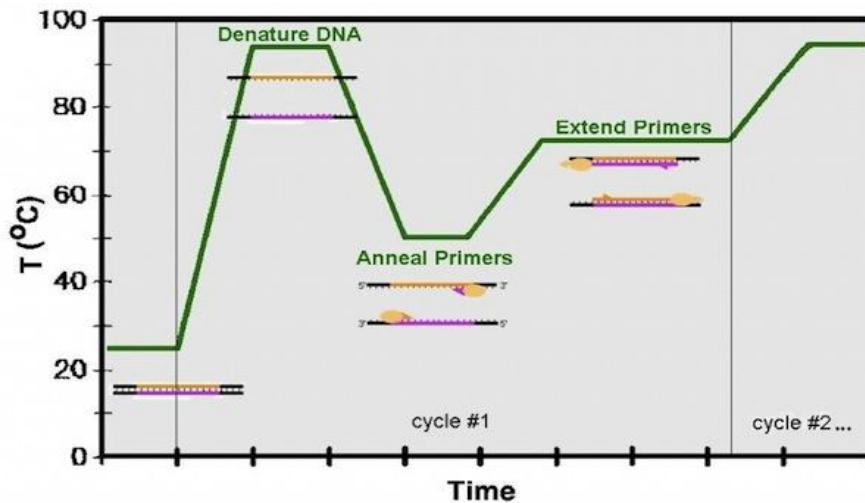


Figura 8: Ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN

5.2.1 - Termociclador

Todo este proceso se realiza en un termociclador (Figura 9) en donde las reacciones se preparan en frío y los tubos o placas de reacción se depositan en el equipo que es programado para realizar los ciclos descritos anteriormente. En cada ciclo de amplificación, el fragmento de ADN diana aumentará en el número de copias de forma exponencial. Esto provoca que, al final de un programa básico, se obtengan aproximadamente hasta 100 millones de copias del fragmento deseado. Las variaciones de tiempo dependen principalmente de la longitud de los fragmentos. Cuanto mayor es el fragmento a amplificar, mayor es el tiempo de ciclado. (Wikipedia)

Al principio, las ADN-polimerasas que se utilizaban no eran termorresistentes. Esto provocaba que, en cada ciclo, había que añadir ADN polimerasa para que se pudiera extender la amplificación. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy posesivas (Taq) con otras capaces de hacer corrección de errores (Pfu, Vent). Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado gracias al empleo de un termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. (Wikipedia)



Figura 9: Termociclador Eppendorf - Mastercycler gradient

Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias - UNC

Para separar los productos obtenidos por PCR y luego poder identificarlos, es necesario realizar una electroforesis en gel de agarosa.

5.3 Electroforesis

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa. Fue empleado por primera vez por en el año 1937, pero su importancia se incrementó cuando en los años cincuenta **E. L.Durrum y Arne W.K. Tiselius**, impulsaron la electroforesis de zona, nombre que se asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte. (Poutou, 2003)

5.3.1 Fundamentos

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo). El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión. La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el

tiempo. Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también. (Poutou,2003)

5.3.2 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método bastante utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero lineal extraído de algas marinas, en el cual las moléculas de ADN de doble cadena migran de manera inversamente proporcional al logaritmo en base 10 (\log_{10}) de sus tamaños moleculares. Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfato de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo al polo positivo (Puerta, Ureña, 2005).

Entre los factores que afectan la tasa de migración del ADN en los geles de agarosa se incluyen: el tamaño del fragmento, concentración de agarosa, la conformación del ADN, voltaje aplicado y el buffer utilizado (Puerta, Ureña, 2005).

Con la electroforesis, los fragmentos de ADN migrarán a una razón inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño o peso molecular. A mayor tamaño, menor será la migración del fragmento y a menor tamaño, mayor será la migración del fragmento. El movimiento de los fragmentos de ADN va a producir un patrón de bandas, donde cada banda corresponde a un fragmento de un tamaño particular. El tamaño de cada fragmento puede ser determinado utilizando un marcador o una escalera de ADN cuyos fragmentos tienen pesos moleculares conocidos. El marcador sirve de control y migrará paralelo a las bandas de ADN que deseamos analizar. (Puerta, Ureña, 2005).

5.3.3 Cuba de Electroforesis

Consiste en una cuba, una bandeja de gel, un peine, y una fuente de electricidad con electrodos (power supply). (Figura 10).



Figura 10: Cuba de electroforesis
Cátedra de Fisiología Vegetal Facultad de Cs. Agrarias UNC.

5.4 Revelado de geles

Cuando se ha completado la electroforesis, las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo. Entonces se pueden “revelar” mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles. Se emplean compuestos como el bromuro de etidio, “gel red” para los ácidos nucleicos, o tinción de plata, azul de coomassie o tinción fluorescente, para las proteínas. Asimismo, se emplean otros métodos para visualizar la separación de la mezcla en el gel. Si el reactivo es fluorescente bajo la luz UV, se fotografía la placa bajo dicha luz. También, si las moléculas contienen átomos radiactivos se puede efectuar una autoradiografía. Para visualizar los geles es necesario posteriormente utilizar un transiluminador.

5.4.1 Visualización de geles – Transiluminador

El transiluminador (Figura 11) es un aparato que permite visualizar las bandas de ADN en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o gel red. Está equipado con tubos fluorescentes de 312 nm (UV-B) y un amplio filtro UV. Sobre su base, dispone de una campana de observación que hace de cámara oscura ofreciendo protección frente a los rayos UV y eliminando interferencias y aumentando el contraste. Dicha campana de observación está equipada con una puerta frontal para manipular el gel cómodamente y una amplia ventana de observación que reduce la fatiga ocular. Además, dispone también de lámparas de luz blanca para iluminación del recinto interior. El transiluminador presenta la posibilidad de acoplar cámaras digitales con los adaptadores adecuados para fotografiar y documentar los geles.



Figura 11: Transiluminador Gene Flash / Cátedra de Botánica Facultad de Cs. Agrarias UNC

5.5 Medición de la concentración de ADN

5.5.1 Picodrop

El Picodrop (figura 12) es un instrumento de laboratorio cuya técnica de aplicación es por espectrofotometría para micro volúmenes trabajando típicamente con 2 o 3,5 μl de muestra y realizando una lectura directa sobre un chip lo que elimina la posibilidad de contaminación cruzada entre muestras, el mismo opera con un programa denominado Picodrop Spectrometer en donde luego de introducir las muestras se ve reflejado en la computadora el resultado de la concentración de ADN en $\text{ng}/\mu\text{l}$. presente en la muestra así como también refleja los valores de las absorbancias desde 230 hasta 340 nm y calcula la relación de absorbancias a 260/280 y a 260/230, valores que nos darán una idea de la pureza del ADN extraído y de las posibles interferencias producidas por proteínas y/o hidratos de carbono que pudieran estar presentes:

- Absorbancia 260/280 debe ser aproximadamente igual o mayor a 1.8
- Absorbancia 260/230 debe ser aproximadamente igual o mayor a 2.0

Los ácidos nucleídos tienen un máximo de absorción a 260 nm. La mayoría de proteínas presenta un máximo de absorbancia a 280 nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina) y los hidratos de carbono tienen su máximo de absorbancia a los 230 nm.



Figura 12: Picodrop
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias - UNC

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis del presente trabajo sugiere que es posible identificar *Agrobacterium vitis* empleando técnicas basadas en PCR, previa adecuación y validación de un protocolo disponible a nivel internacional.

El objetivo de este estudio es poner a punto una metodología de detección de *Agrobacterium vitis* sensible y de bajo costo basada en la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la polimerasa).

MATERIALES Y METODOS

1.1 Material vegetal

Para la ejecución de los ensayos se utilizaron muestras de distintas variedades de vides entre ellas: Sauvignon Blanc, Shiraz, Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon y Chardonnay que presentaban agallas o tumores.

En la Tabla 3 se pueden observar las muestras extraídas por variedad, clon o selección, portainjerto, fecha de extracción y observaciones de la sintomatología de infección por *Agrobacterium vitis* observada que fueron tomadas para realizar los análisis pertinentes.

Numero de Muestra	Variedad	clon/ Selección	Portainjerto	Lote	Fecha Producto
1	S Blanc	169	101,14	198	27/06/2013
2	Shiraz	470	101,14	194	28/06/2013
3	Malbec	Pedriel	R110	226	27/08/2013
4	Bonarda	Tupungato	Franco	61	13/06/2013
5	Bonarda	Tupungato	Franco	61	13/06/2013
6	Malbec	Agrelo	Franco	281	24/06/2013
7	Cabernet Sauvignon	169	P1103	149	07/06/2013
8	Malbec	Pedriel	101,14	178	11/06/2013
9	Chardonnay	121	101,14	155	07/06/2013
10	Cabernet Sauvignon	169	P1103	148	07/06/2013

1.2 Materiales y equipos de laboratorio

Para la realización de esta tesina se emplearon los materiales y equipos de laboratorio detallados en el ANEXO.

1.3 Compuestos químicos y reactivos

Los compuestos químicos y reactivos empleados se detallan en el ANEXO.

1.4 Método analítico

Se siguió la metodología propuesta por Kenneth C. Eastwell y colaboradores (1995).

1.4.1 Preparación de muestra

Las muestras fueron conservadas envueltas en film resistente, al resguardo de la luz con un polietileno negro y llevadas a cámara frigorífica a 4 °C hasta el momento de su uso.

Previo al ingreso del material al laboratorio se procedió a retirar muestras al azar de la Cámara de frío y separar en dos submuestras:

- a- Por un lado se tomaron las agallas o tumores cuidadosamente y se colocaron en bolsas estériles de polipropileno identificándolas con el nombre de la variedad, clon o selección masal y la letra “**T**” que representó la palabra **Tumor**.
- b- Por otro lado se tomaron las raíces de plantas con tumores y cuidadosamente se colocaron también en bolsas estériles de polipropileno que se identificaron con el nombre de la variedad, el clon o selección masal y la letra “**R**” que represento la palabra **Raíz**.

1.4.2 Aislamiento

De las bolsitas estériles con muestras de raíces o de tumores que llegaron al laboratorio se cortaron con bisturí trocitos pequeños y se pesaron 2 gr de cada uno por separado. Las muestras así pesadas se molieron para romper los tejidos vegetales en mortero (Figura 13) teniendo la precaución de desinfectar el mismo entre muestra y muestra con solución de etanol al 70 %. De esta manera se logró una suspensión de bacterias por cada muestra.



Foto 13: Proceso de molienda de raíces de plantas con sintomatología de *Agrobacterium vitis*.

Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias UNC

Las muestras molidas se colocaron en bolsas estériles con filtro interno marca Bioreba y se les agregaron 5 ml de H₂O UP (Ultra Pura) del lado de la muestra y 5 ml más del lado en el que no encontraba la muestra (Figura 14).



Foto 14: Bolsas estériles Bioreba con material vegetal con sintomatología de *Agrobacterium vitis*.
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias UNC

Las bolsas fueron cerradas y sometidas a presión manual durante unos segundos para terminar de moler el material vegetal y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso.

1.4.3 Medio de cultivo semiselectivo

Se utilizó el medio de cultivo semi-selectivo RS (Roy y Sasser, 1983). Para el mismo se pesaron en balanza analítica, los siguientes compuestos para preparar 500 ml de medio de cultivo:

- 0,1 gr de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,35 gr de KHP_2O_4
- 0,45 gr de K_2HPO_4
- 2,00 gr de Aldonitol
- 0,07 gr de Extracto de levadura
- 0,1 gr de ClNa
- 0,5 gr de H_3BO
- 7,5 gr de Agar
- 500 ml de Agua desmineralizada

Las sales y compuestos pesados, a excepción del agar, fueron disueltos en agua desmineralizada y luego se llevó a un volumen final 500 ml empleando un matraz aforado. Posteriormente, se volcó el contenido en un vaso de precipitado y se llevó a ebullición sobre tela de amianto para disolver los diferentes compuestos. Seguidamente, se ajustó el pH a 7,2 con KOH . En un erlenmeyer de 1000 cc se colocó primero el agar pesado y luego la solución con el pH ajustado; sin mover se colocó un tapón de algodón, se envolvió en papel madera y se llevó a autoclave para su esterilización a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos y a 1,25 atm de presión.

Las sustancias termolábiles empleadas fueron pesadas por separado y colocadas en tubos tipo Eppendorf estériles, ya que al ser sensibles al calor no pudieron ser esterilizados en autoclave con el resto de la solución.

Por $\frac{1}{2}$ litro de medio de cultivo preparado se utilizaron:

- 0,01 gr de Trimethoprima

- 0,05 gr de Cycloheximida
- 0,01 gr de D-cycloserina
- 0,04 gr de Triphenyltetrazolium chloridrato

A cada uno de los tubos se les agrego 1 ml de agua UP para disolver los antibióticos y se mezclaron en un vaso de precipitado.

Una vez esterilizado el medio de cultivo se dejó enfriar hasta una temperatura de 50 °C y luego se llevó a cámara de flujo laminar, donde se agregaron los antibióticos por filtración estéril empleando filtro de 0,22 micrones. Finalmente se procedió al fraccionamiento del medio de cultivo en cajas de Petri de 9 mm.

1.4.4 Siembra en medio de cultivo RS

Se tomaron 50 µl de la suspensión de bacterias desde las bolsas almacenadas y estas fueron sembradas en el medio de cultivo RS bajo campana de flujo laminar (Figura 15).

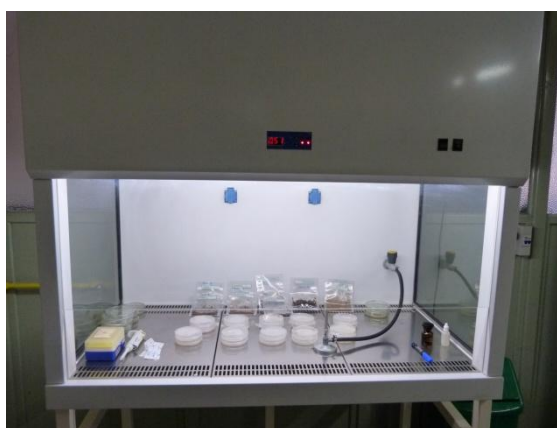


Figura 15: Cámara de flujo laminar
Cátedra de Fitopatología – Facultad de Cs. Agrarias- UNC

Las cajas fueron identificadas, selladas con parafilm y colocadas en una estufa a 28 °C en condiciones de oscuridad. Las cajas se identificaron teniendo en cuenta la siguiente simbología:

T: Tumor (molienda realizada con tejido vivo fresco de los tumores).

R: Raíz (raíces sin síntomas provenientes de plantas con tumor).

1 T (1)
Muestra Tumor N° de caja

1 R (1)
Muestra Raíz N° de caja

Las primeras colonias de *Agrobacterium vitis* (color rojo oscuro) aparecieron después de transcurridos 5 – 7 días de incubación (Figura 16).

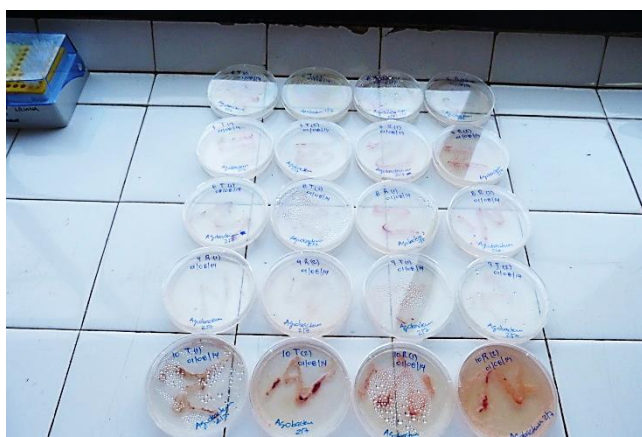


Figura 16: Cajas de Petri con colonias típicas de *Agrobacterium vitis*
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias UNC

1.4.5 Extracción del ADN

Las colonias de color rojo se colectaron en condiciones estériles y se colocaron en microtubos tipo Eppendorf, luego a cada tubo se le agregaron 150 μ l de H₂O UP estéril. La identificación de los tubos se hizo teniendo en cuenta la siguiente simbología:

1	T	(1)	ADN 1	;	1	R	(1)	ADN 1
Muestra	Tumor	N° de caja	Extrac. ADN		Muestra	Raíz	N° de caja	Extac. ADN

Las tapas de los tubos tipo Eppendorf se sellaron con parafilm y se homogenizó su contenido en un vortex. Posteriormente, se llevaron los tubos a baño María a 100 °C durante 10 minutos (Figura 17) e inmediatamente transcurrido este tiempo fueron retiradas del baño y transferidas a un recipiente con hielo molido durante 10 minutos más (Figura 18)



Figura 17: Tubos con suspensión de colonias en etapa de Baño María a 100 °C
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias UNC

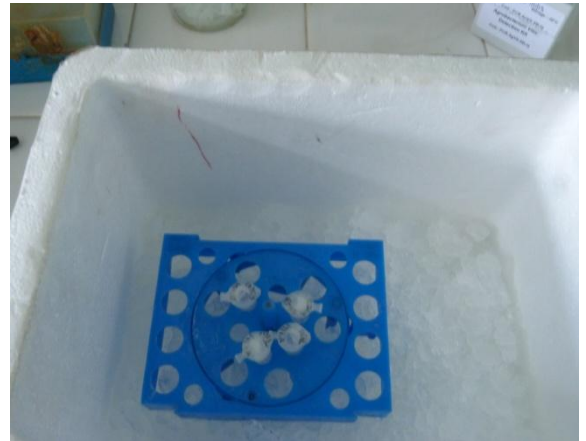


Figura 18: Tubos con suspensión de colonias en etapa de baño de frío con hielo molido.
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias - UNC

Luego, las suspensiones fueron centrifugadas durante 3 minutos a 4°C a una velocidad de 10.000 rpm y de esta manera las muestras estuvieron listas para ser amplificadas tomándose 3 µl del líquido sobrenadante. Cuando esta reacción no se realizó inmediatamente, las muestras fueron conservadas en freezer a -20 °C.

1.4.6 Amplificación por PCR

Los primers empleados para identificar la bacteria *Agrobacterium vitis* y el plásmido Ti responsable de la patogenicidad fueron, respectivamente: PehA y VirA. Los mismos fueron importados de Francia del laboratorio Novatech. Se adquirió además el master mix, un control positivo y un control negativo)

La secuencia de nucleótidos de ambos primers se detalla a continuación:

- PehA1 5' – CGATGGCGGCGAGGATTT – 3'
- PehA2 5' – ATCGGGCGTGAAACAAGT – 3'
- VirAR 5' – CGGCAATTCGTATCACGGA – 3'
- VirAF 5' – TTCAGTCGCGCAAGCAGTT – 3'

Para la Reacción de PCR se empleó el kit comercial “Qualiplante molecular kits” Todos los volúmenes fueron medidos con micro pipeta automática. Se emplearon tubos tipo Eppendorf de 0.5 ml y se pipetearon los siguientes volúmenes de reactivos:

- 22 µl de Máster Mix ya preparada + 3 µl de ADN bacteriano
- 22 µl de Máster Mix ya preparada + 3 µl de Control (+)
- 22 µl de Máster Mix ya preparada + 3 µl de Control (-)

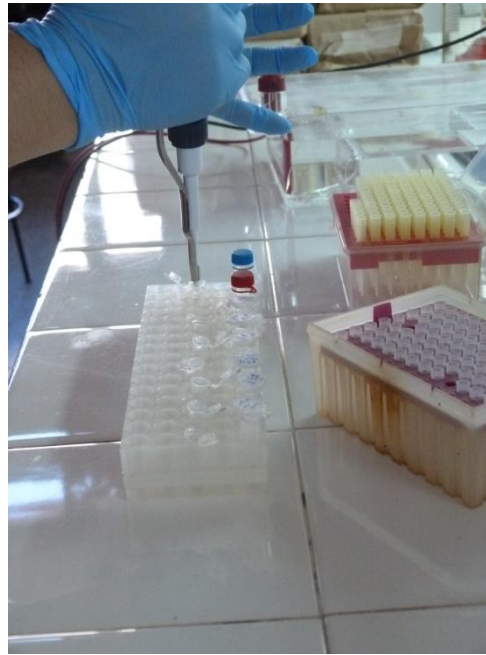


Figura 19: Reacción de PCR preparada
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias – UNC

La identificación de los tubos se realizó teniendo en cuenta la siguiente simbología (Figura 20):

1	T	(1)	PCR1	;	1	R	(1)	PCR1
Muestra	Tumor	N° de caja	Reac PCR		Muestra	Raíz	N° de caja	Reac PCR



Figura 20: Tubos tipo Eppendorf con su identificación correspondiente.
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias - UNC

Cada tubo se cerró bien, se centrifugó y luego se colocó en el termociclador para la reacción de PCR.

Los ciclos de amplificación de los fragmentos empleados fueron los propuestos por Eastwell y Kenneth (1995) de acuerdo a la siguiente secuencia y que se especifican en la Tabla No 4:

Tabla 4: Ciclos de amplificación para *Agrobacterium vitis*

Pasos	Temp. °C	Duración	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	15 min	1
Desnaturalización	94	1 min	39
Templado	60	1 min	
Elongación	72	1 min	
Final de elongación	72	5 min	1
Almacenaje / Enfriado	4	infinito	

El termociclador fue programado para reproducir los ciclos de amplificación según las siguientes características:

Programa: AGROBACTER

Vol. Tubo: 0.5 ml

Vol. Reacción: 25 µl

Una vez finalizado el programa de PCR, los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en **geles de agarosa al 2 %**. (Eastwell y Kenneth 1995)

1.4.7 Preparación del gel de Agarosa

En un erlenmeyer de 250 ml se pesaron 2 gr de agarosa y se introdujeron en el mismo con la precaución de no tocar sus paredes, luego se le agregaron, tratando de no realizar movimientos bruscos, 100 ml de buffer TBE (Tris, Borato, EDTA de Fe) al 0.5% y se colocó en un horno microondas a potencia media durante 30 segundos para su disolución.

El erlenmeyer fue retirado del horno microondas y fue agitado sucesivamente, luego se volvió a colocar durante 30 segundos más, con la precaución de que la solución no hirviera durante el calentamiento. La operación se repitió hasta que el líquido se observó translucido a contraluz (Figura 21).



Figura 21: Verificación de limpidez a contra luz de solución al 2 % de agarosa
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias - UNC

La solución de agarosa se dejó enfriar hasta 50 °C y luego se volcó en una “cama” de acrílico para electroforesis (Figura 22 y 23). Esta cama fue armada sobre una mesada lisa, pareja y a nivel. Luego, se colocaron los peines para armar los pocillos y una vez que el gel se entibió, rápidamente se disolvieron todas las burbujas con una punta fina.



Figura 22: Cama de electroforesis nivelada
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias - UNC

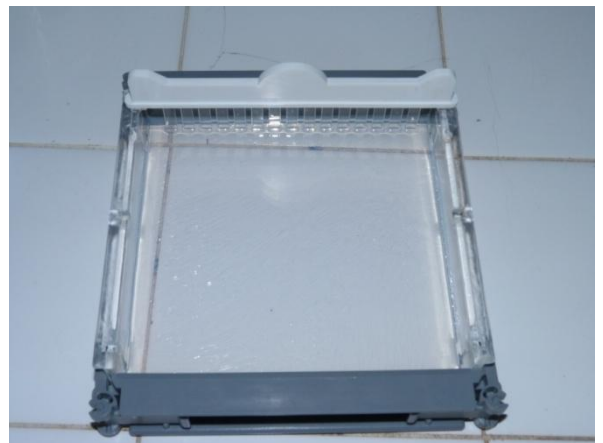


Figura 23: Cama de electroforesis con gel de agarosa
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias - UNC

1.4.8 Siembra y electroforesis

Una vez enfriado el gel de agarosa, se procedió a la siembra del mismo de acuerdo al siguiente orden (Figura 24)

- * Pocillo N° 1: 2 μ l de loading buffer (color azul) + 6 μ l de marcador molecular 100 bp
- * Pocillo N° 2: 2 μ l de loading buffer (color azul) + 6 μ l de Control (+)
- * Pocillo N° 3: 2 μ l de loading buffer (color azul) + 6 μ l de Control (-)
- * Pocillo N° 4 en adelante: 2 μ l de loading buffer (color azul) + 6 μ l de producto de PCR de cada muestra.

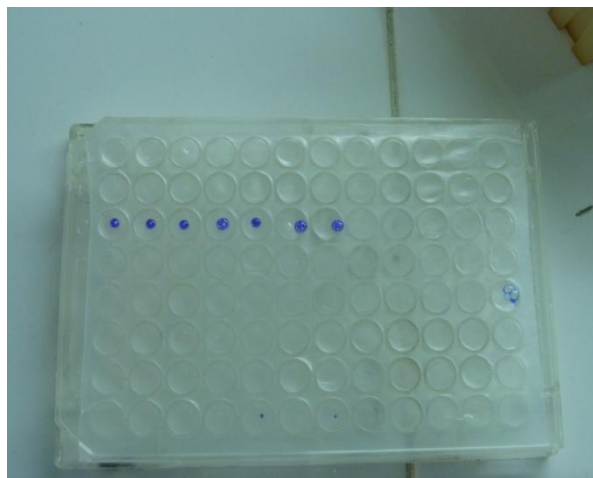


Figura 24: Mezcla de loading + Producto de PCR.
Cátedra de Fisiología Vegetal – Facultad de Cs. Agrarias – UNC

La electroforesis se realizó a **90 voltios durante 45 minutos** y posteriormente, el gel fue colocado en un recipiente plástico conteniendo 250 ml de una solución de Gel Red 3X, 0.5% C1Na. El mismo fue agitado en baño durante 20 min.

1.4.9 Revelado

Los fragmentos de ADN amplificados y separados fueron visualizados bajo luz UV en un transiluminador marca Gene Flash (Figura 25) y posteriormente se procedió a tomar fotografías de los geles para su posterior comparación.



Figura 25: Transiluminador en el momento de colocación del gel para ser fotografiado
Laboratorio de Botánica Este – Facultad de Cs. Agrarias - UNC

Los resultados fueron observados y evaluados teniendo en cuenta la Tabla 5

Tabla 5: Tamaño de los fragmentos, virulencia de la bacteria e interpretación de los datos de acuerdo a la presencia de las diferentes bandas.

Fragmento			Interpretación	Virulencia	
466 bp	382 bp	320 bp		SI	No
			Negativo		
x	x	x	Positivo <i>A vitis</i>	x	
x	x		Positivo <i>A vitis</i>	x	
x		x	Positivo <i>A vitis</i>	x	
x			Positivo <i>A vitis</i>		x
	x	x	Positivo <i>A tumefaciens</i>	x	
	x		Positivo <i>A tumefaciens</i>	x	
		x	Positivo <i>A tumefaciens</i>	x	

2. Modificación de la Técnica de Eastwell y colaboradores:

Con el propósito de optimizar la obtención de resultados, se modificó la técnica original de Eastwell y col, (1995), considerando las siguientes variables:

- Temperatura de incubación para desarrollo de las colonias bacterianas.
- Concentración de ADN necesario para la reacción de PCR.
- Ensayo de amplificación a distintas concentraciones de ADN

- Concentración del gel de agarosa.
- Tiempo de corrida de electroforesis
- Modificación del volumen de siembra para la electroforesis.

3. Ensayos para la comprobación de modificaciones de la técnica

3.1 Temperatura de incubación para el desarrollo de las colonias bacterianas

La técnica indica una temperatura de incubación de las suspensiones bacterianas de 28 ° C en la oscuridad y según los estudios de Eastwel y col; 1995 indicaron que las primeras colonias características de *Agrobacterium vitis* aparecen después de 5 – 7 días de incubación. Para corroborar la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria se incubaron las cajas de Petri conteniendo la suspensión de bacterias sembradas a **28 ° C** y otra tanda se colocó a **23 ° C**, **ambas en condiciones de oscuridad.**

3.2 Concentración de ADN necesario para la reacción de PCR.

La técnica indica que las colonias sospechadas deben ser sopadas en condiciones estériles sin tener en cuenta la concentración de ADN colectado y ser agregados a 150 µl de agua ultra pura estéril para su extracción.

En este trabajo se sometieron las muestras a la reacción de PCR previa medición de la concentración de ADN con un espectrofotómetro marca Picodrop (Figura 12) para corroborar si era necesario un mínimo de concentración de ADN para que la reacción fuera positiva. Para ello, primero se cargó el tip con un blanco de agua ultra pura estéril y luego se hicieron pasar el resto de las muestras teniendo la precaución de usar un tip diferente para cada muestra. Se efectuaron dos lecturas por cada muestra y se calculó un promedio entre ambas lecturas. En el caso de concentraciones muy diferentes se efectuó una tercera lectura y se promediaron las dos más cercanas.

3.3 Ensayo de amplificación a distintas concentraciones de ADN

Para evaluar si la concentración de ADN al hacer la PCR era determinante en la observación de los productos amplificados, se realizó un ensayo de amplificación con distintas concentraciones. Para ello, se tomaron algunas de las muestras en las que se evaluó la concentración de ADN y se realizó una PCR. Se eligieron las muestras **6T1, 7R1, 7R2, 8R1, 9R2, 10T1**. El orden de siembra se realizó de forma creciente. En el caso de la muestra **7 R 1** se realizó una dilución para llevarlo a aproximadamente una concentración de ADN de 200 ng.µL⁻¹.

3.4 Concentración del gel de Agarosa

La técnica propuesta por Eastwel y col; 1995 emplea una **concentración del gel de agarosa del 2%** como la concentración más adecuada para la posterior visualización de los productos amplificados. En esta tesina también se probó una concentraciones del 2.5%.

3.5 Tiempo de corrida de electroforesis

La técnica propuesta por **Eastwel y col; 1995** emplea un tiempo de corrida en la cuba de electroforesis de **45 min a 90 voltios**. Al emplearse este voltaje y tiempo se observó que las bandas de amplificadas no se separaban bien y por esta razón se realizó **durante 70 minutos a 90 voltios**.

3.6 Modificación del volumen de siembra para la electroforesis

La técnica propuesta emplea 6 µl de PCR producto más 2 µl de loading buffer (color azul) para realizar la siembra para la electroforesis. En este trabajo se utilizó también un volumen de siembra de 10 µl de PCR producto para verificar la influencia del aumento de volumen en los resultados de la lectura.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al emplear la técnica siguiendo la metodología propuesta por Eastwel y col; 1995 tal como se describió en el apartado anterior, se observó que todo el material con sintomatología que se utilizó presentó desarrollo de colonias características de *Agrobacterium vitis*. Al hacer la amplificación de los ADN y posterior revelado se observó, en primera instancia, que la amplificación no fue óptima, pero cuando se realizaron las distintas adaptaciones de la técnica se vieron diferentes resultados encontrándose que podría tratarse de: *A vitis* virulento, NO virulento o *A tumefaciens*.

En las Figuras 26 a la 32 se pueden observar algunos de los patrones de bandas obtenidos en los gels de agarosa:

Figura 26: Revelado de la reacción de PCR y posterior electroforesis con concentración de gel de agarosa al 2,5%.

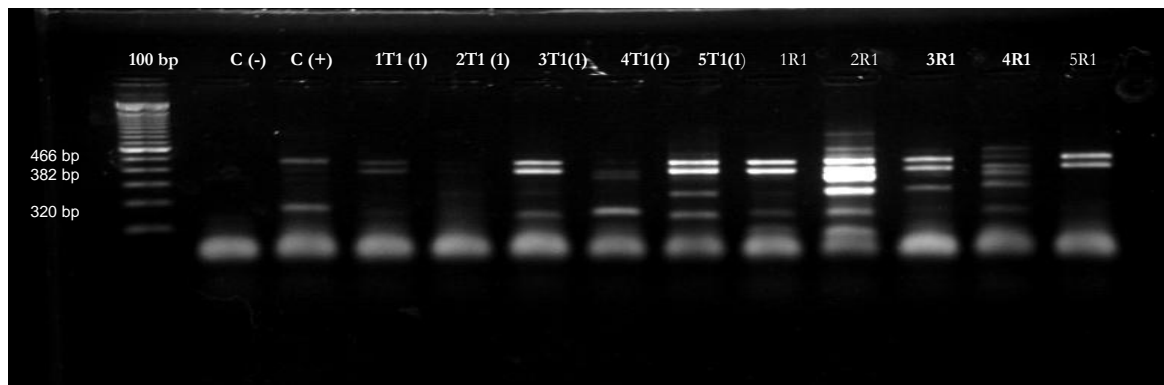


Figura 26: Gel de Agarosa al 2.5 %.

Orden de siembra: Marcador de peso molecular 100 bp, C (-), C (+), 1 T 1(1), 2 T 1(1), 3 T 1(1), 4 T 1 (1), 5 T 1 (1), 1 R 1, 2 R 1, 3 R 1, 4 R 1, 5 R 1

Figura 27: Revelado de muestras de tumores con concentración de gel de agarosa del 2%. En este caso se aumento el tiempo de corrida de electroforesis a 70 minutos y el tiempo de agitación a 40 minutos con el objeto de separar aun más los fragmentos obtenidos por la amplificación de PCR.

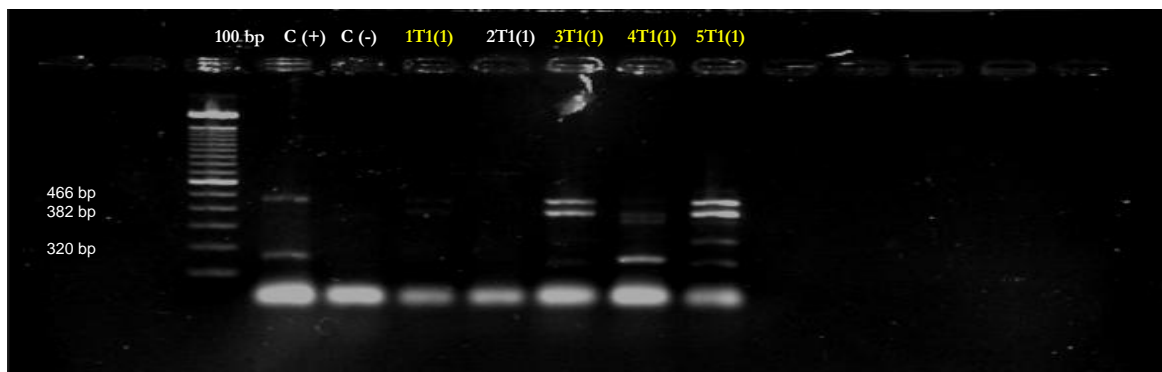


Figura 27: Gel de Agarosa al 2 %. Electroforesis 70 min. (90 Volt) Agitación 40 min.

Orden de siembra: Marcador de peso molecular 100 bp – C (+) – C (-) – 1 T 1(1)– 2 T 1(1) – 3 T 1(1)– 4 T 1(1) – 5 T 1 (1)

Figura 28: Revelado de muestras incubadas a 23 °C con concentración de gel de agarosa del 2%. Tiempo de corrida de electroforesis de 45 minutos a 90 Voltios y 25 minutos de agitación.

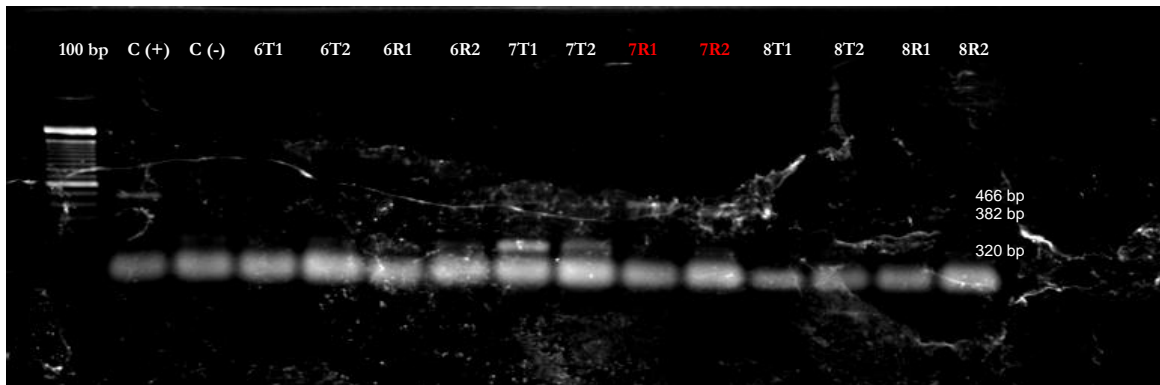


Figura 28: **Gel de Agarosa al 2 %. Electroforesis 45 min. (90 Volt) Agitación 25 min**
Orden de siembra: Marcador de peso molecular 100 bp; C (-); C (+); 6 T 1; 6 T 2; 6 R 1; 6 R 2; 7 T 1; 7 T 2; 7 R 1; 7 R 2; 8 T 1; 8 T 2; 8 R 1; 8 R 2

Figura 29: Revelado de muestras incubadas a 23 C con concentración de gel de agarosa del 2%. Tiempo de corrida de electroforesis de 45 minutos a 90 Voltios y 25 minutos de agitación.

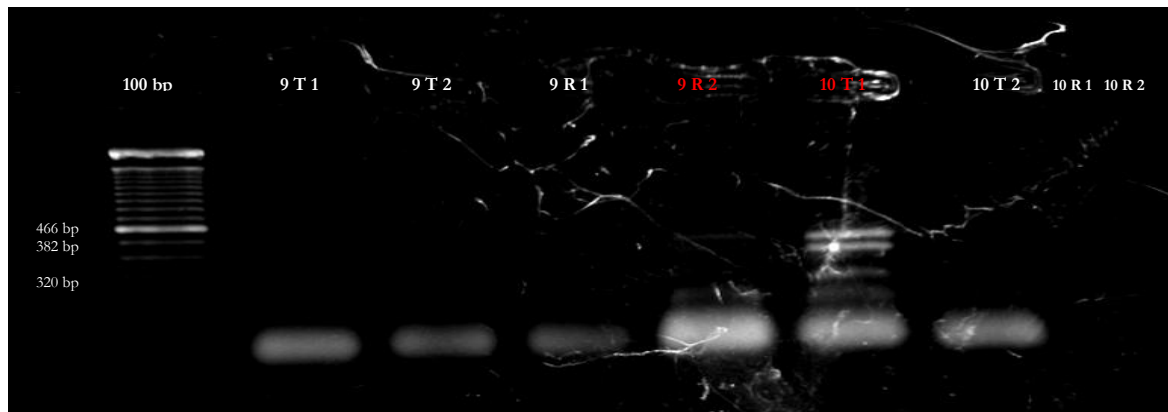


Figura 29: **Gel de Agarosa al 2 %. Electroforesis 45 min. Agitación 25 min**
Orden de siembra: Marcador de peso molecular 100 bp; 9 T 1; 9 T 2; 3 T 1; 9 R 1; 9 R 2; 10 T 1; 10 T 2; 10 R 1; 10 R 2

Figura 30: Revelado de repeticiones positivas de la muestras anteriores mas dos muestras negativas al azar (6 T 1, 8 R 1) en donde se modifico el volumen de reacción a 10 µl de PCR producto, los que fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % durante 70 minutos a 90 Voltios y 25 minutos de agitación.

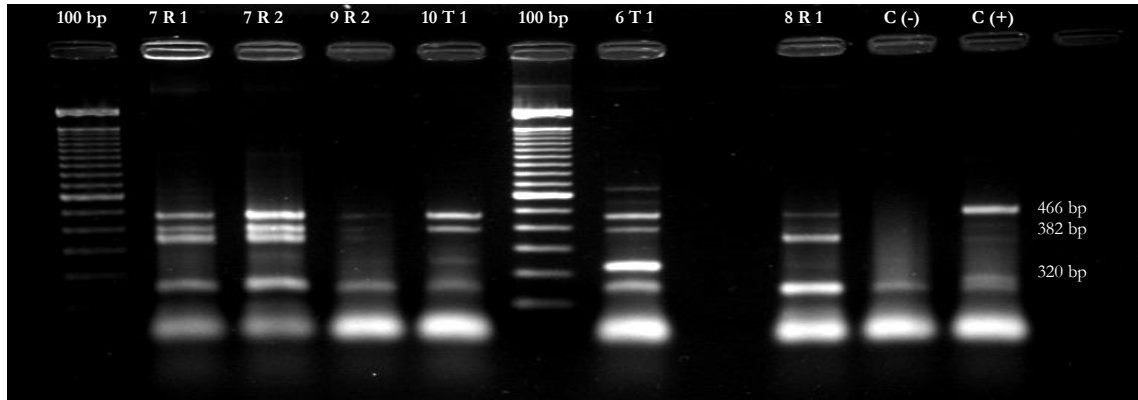


Figura 30: 10 µl de PCR producto. Gel de Agarosa al 2 %. Electroforesis 70 min. (90 Volt) Agitación 25 min.

Orden de siembra: Marcador de peso molecular 100 bp; 7 R 1; 7 R 2; 9 R 2; 10 T 1; 100 bp; 6 T 1; 8 R 1; C (-); C (+)

Figura 31: Revelado de repeticiones positivas de la muestras anteriores mas dos muestras negativas al azar (6 T 1; 8 R 1). Volumen de reacción a 6 µl de PCR producto que fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % durante 70 minutos a 90 Voltios y 25 minutos de agitación.

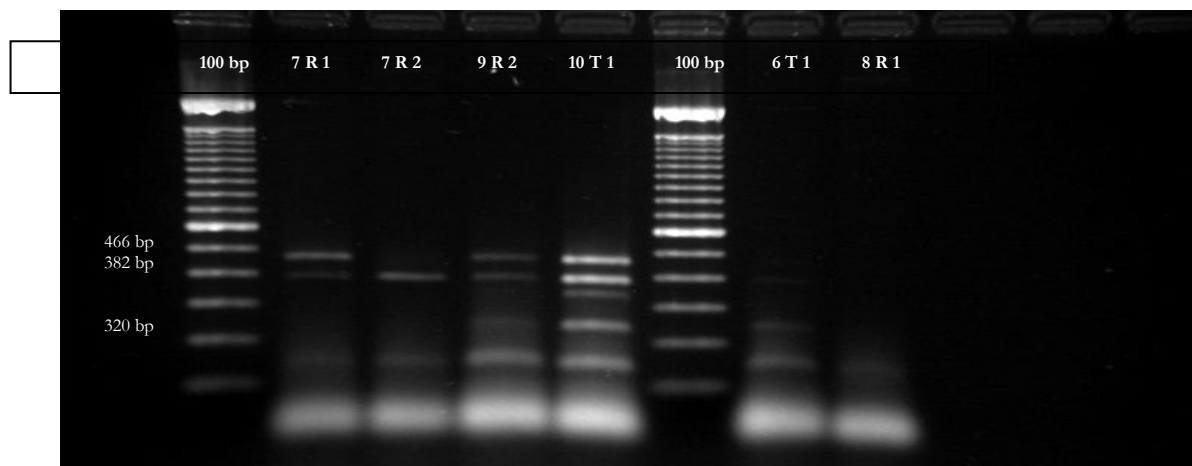


Figura 31: 6 µl de PCR producto. Gel de Agarosa al 2 %. Electroforesis 70 min. (90 Volt) Agitación 25 min.

Orden de siembra: Marcador de peso molecular 100 bp; 7 R 1; 7 R 2; 9 R 2; 10 T 1; 100 bp; 6 T 1; 8 R 1

3.2.1 Temperatura de crianza para el desarrollo de las colonias bacterianas

En todos los casos que se extrajeron muestras a partir de materiales que presentaban la sintomatología descrita, se observó crecimiento y desarrollo de colonias características. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6

Tabla 6: Tabla de resultados: Temperatura de crianza vs. Desarrollo de colonias bacterianas.

Temperatura de Incubación	Desarrollo		Tiempo de crecimiento		Características de las colonias	
	SI	NO	5-7 días	7-10 días	Más abundantes	Menos abundantes
28 ° C	X		X		X	
23 ° C	X			X		X

3.2.2 Concentración de ADN necesario para la reacción de PCR.

La Tabla 7 muestra las lecturas de concentración de ADN para cada una de las muestras, así como también los valores de absorbancias a 230, 260 y 280 nm y sus respectivas relaciones para determinar la pureza y calidad del ADN extraído.

Tabla 7: Tabla de Resultados de concentración de ADN, lectura de absorbancia a 230, 260, 280, relación 260/280 y 260/230 nm.

ID	Muestra	Fecha/ Hora	Resultado	230	260	280	A260/280	A260/230
1	6T1- 15/8	16/09/2014 13:09	47,7 ng/μL	1,318	0,953	0,417	2,288	0,723
2	6T1-15/8	16/09/2014 13:11	52,1 ng/μL	1,548	1,042	0,48	2,172	0,673
3	7R1- 15/8	16/09/2014 13:11	279,9 ng/μL	6,822	5,598	2,812	1,991	0,821
4	7R1-15/8	16/09/2014 13:13	228,9 ng/μL	5,044	4,577	2,031	2,253	0,907
5	7R2- 15/8	16/09/2014 13:14	114,5 ng/μL	2,88	2,289	1,027	2,229	0,795
6	7R2-15/8	16/09/2014 13:15	117,6 ng/μL	2,815	2,353	1,036	2,27	0,836
7	8R1- 15/8	16/09/2014 13:16	113,1 ng/μL	3,042	2,262	1,136	1,991	0,744
8	8R2-15/8	16/09/2014 13:17	125,6 ng/μL	3,365	2,513	1,298	1,936	0,747
9	9R1- 15/8	16/09/2014 13:18	46,9 ng/μL	1,267	0,938	0,42	2,234	0,740
10	9R1-15/8	16/09/2014 13:19	83,6 ng/μL	2,594	1,672	0,879	1,903	0,645
11	9R1- 15/8	16/09/2014	52,0 ng/μL	1,375	1,04	0,476	2,187	0,756

		13:19						
12	10T1-15/8	16/09/2014 13:20	47,5 ng/μL	1,274	0,951	0,494	1,924	0,746
13	10T1-15/8	16/09/2014 13:20	50,7 ng/μL	1,28	1,014	0,504	2,011	0,792
15	6T2- 15/8	09/10/2014 12:47	24,8 ng/μL	0,85	0,496	0,326	1,523	0,584
16	6T2- 15/8	09/10/2014 12:48	24,0 ng/μL	0,711	0,479	0,345	1,39	0,674
17	6R1- 15/8	09/10/2014 12:53	56,7 ng/μL	1,636	1,135	0,56	2,027	0,694
18	6R1- 15/8	09/10/2014 12:54	33,2 ng/μL	1,03	0,663	0,407	1,63	0,644
19	6R1- 15/8	09/10/2014 12:57	27,5 ng/μL	0,55	0,55	0,366	1,504	1,000
20	6R2- 15/8	09/10/2014 12:59	86,7 ng/μL	2,617	1,735	0,944	1,839	0,663
21	6R2- 15/8	09/10/2014 13:00	37,9 ng/μL	1,202	0,757	0,453	1,672	0,630
22	6R2- 15/8	09/10/2014 13:01	39,4 ng/μL	1,159	0,788	0,471	1,674	0,680
23	7T2- 15/8	09/10/2014 13:03	53,8 ng/μL	1,342	1,077	0,447	2,407	0,803
24	7T2- 15/8	09/10/2014 13:04	61,3 ng/μL	1,6	1,225	0,54	2,271	0,766
25	7T1- 15/8	09/10/2014 13:13	55,7 ng/μL	1,669	1,115	0,519	2,148	0,668
26	7T1- 15/8	09/10/2014 13:15	57,0 ng/μL	1,633	1,14	0,525	2,171	0,698
27	8T1- 15/8	09/10/2014 13:16	88,5 ng/μL	1,633	1,77	0,665	2,661	1,084
28	8T1- 15/8	09/10/2014 13:17	100,6 ng/μL	1,911	2,012	0,794	2,532	1,053
29	8T2- 15/8	09/10/2014 13:46	24,7 ng/μL	0,385	0,493	0,138	3,581	1,281
30	8T2- 15/8	09/10/2014 13:47	50,6 ng/μL	1,101	1,012	0,425	2,379	0,919
31	8T2- 15/8	09/10/2014 13:48	38,1 ng/μL	0,852	0,763	0,29	2,628	0,896
32	9T1- 15/8	09/10/2014 13:51	49,0 ng/μL	1,386	0,98	0,415	2,362	0,707
33	9T1- 15/8	09/10/2014 13:52	45,3 ng/μL	1,124	0,906	0,386	2,346	0,806
34	9T2- 15/8	09/10/2014 13:57	66,8 ng/μL	1,274	1,337	0,627	2,133	1,049
35	9T1- 15/8	09/10/2014 13:58	51,8 ng/μL	0,816	1,035	0,406	2,553	1,268
36	9R2- 15/8	09/10/2014 13:58	20,5 ng/μL	0,549	0,41	0,238	1,725	0,747
37	9R2- 15/8	09/10/2014 13:59	13,0 ng/μL	0,333	0,26	0,145	1,794	0,781
38	10T2-15/8	09/10/2014 14:00	82,7 ng/μL	1,999	1,653	0,769	2,151	0,827
39	10T2- 15/8	09/10/2014 14:01	77,8 ng/μL	1,727	1,555	0,696	2,234	0,900
40	10R1-15/8	09/10/2014 14:03	164,6 ng/μL	3,827	3,292	1,527	2,156	0,860
41	10R1-15/8	09/10/2014 14:04	130,4 ng/μL	2,589	2,607	1,097	2,377	1,007
42	10R2-15/8	09/10/2014 14:06	173,3 ng/μL	4,373	3,466	1,706	2,031	0,793
43	10R1-15/8	09/10/2014 14:07	179,7 ng/μL	4,586	3,594	1,743	2,062	0,784

44	8R1-15/8	09/10/2014 14:08	108,6 ng/μL	2,849	2,172	1,096	1,983	0,762
45	8R2-15/8	09/10/2014 14:09	79,6 ng/μL	1,458	1,591	0,703	2,263	1,091
46	8R1-15/8	09/10/2014 14:10	82,8 ng/μL	1,518	1,657	0,716	2,316	1,092

En la **Tabla 8** se observan los promedios de las concentraciones de ADN de cada una de las muestras ensayadas. Las muestras resaltadas correspondieron a aquellas que se eligieron para realizar el ensayo de amplificación a distintas concentraciones de ADN.

Tabla 8: tabla de resultados de concentración de ADN

Muestra	Resultado
6 T1- 15/8	49,9 ng/μL
6 T2-15/8	24,4 ng/μL
6 R1- 15/8	30,35 ng/μL
6 R2-15/8	38,65 ng/μL
7 T1 -15/8	56,35 ng/μL
7 T2 -15/8	57,55 ng/μL
7 R 1 -15/8	254,4 ng/μl
7 R 2 -15/8	116,5 ng/μl
8 T 1 -15/8	94,55 ng/μl
8 T 2 -15/8	31,4 ng/μl
8 R 1 -15/8	110,85 ng/μl
8 R 2 -15/8	81,2 ng/μl
9 T 1 -15/8	47,15 ng/μl
9 T 2 -15/8	59,3 ng/μl
9 R 1 -15/8	49,45 ng/μl
9 R 2 -15/8	16,75 ng/μl
10 T 1 -15/8	49,1 ng/μl
10 T 2 -15/8	80,25 ng/μl
10 R 1 -15/8	147,5 ng/μl
10 R 2 -15/8	176,5 ng/μl

3.2.3 Ensayo de amplificación a distintas concentraciones de ADN

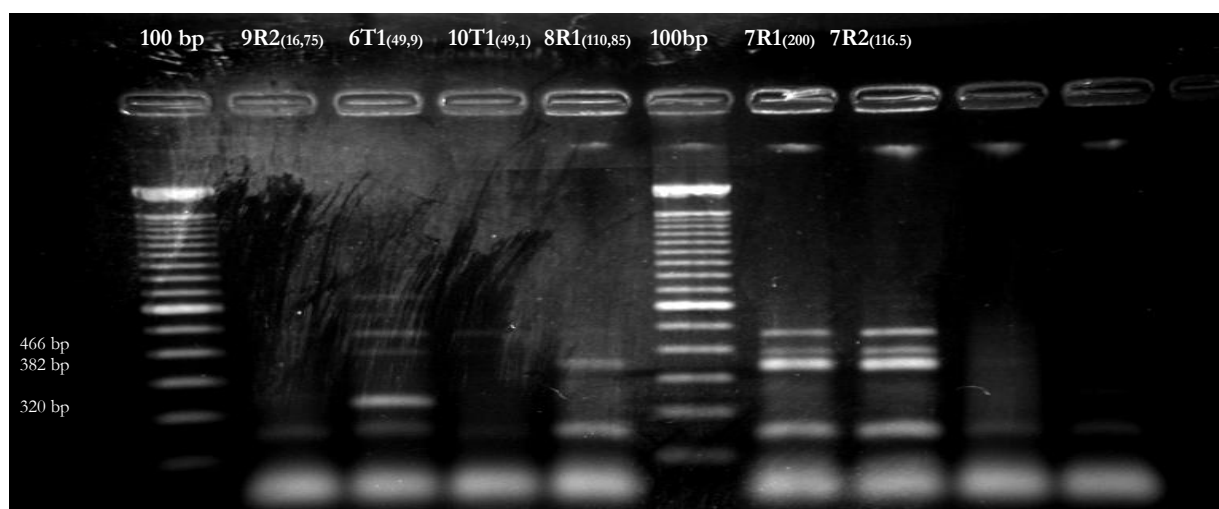


Figura 32: Revelado del gel con distintas concentraciones de ADN

Orden de siembra: Marcador de peso molecular 100 bp; 9 R 1; 6 T 1; 10 T 1; 8 R 1; 100 bp; 7 R 1; 7 R 2

3.2.4 Concentración del gel de Agarosa

La **Tabla 9** muestra los resultados de efectividad con las dos concentraciones de gel de agarosa ensayadas.

Tabla 9: Tabla de resultados de Efectividad de la concentración del gel de Agarosa.

Concentración del GEL	Resultados visuales de la amplificación del GEL		
	Muy Efectivo	Menos efectivo	NO efectivo
2%	X		
2,50%		X	

3.2.5 Tiempo de corrida de electroforesis

La Tabla 10 muestra los resultados de la efectividad en la visualización de las bandas amplificadas en el gel de agarosa con respecto a los dos tiempos de corrida por electroforesis probados.

Tabla 10: Tabla de Resultado: Efectividad de visualización del Gel vs. Tiempo de corrida de electroforesis.

Tiempo de Corrida a 90 Voltios	Resultados visuales de la amplificación del GEL		
	Muy Efectivo	Menos efectivo	NO efectivo
45 min		X	
70 min	X		

CONCLUSIONES

El presente estudio permitió poner a punto un sistema de identificación de cepas de *Agrobacterium vitis* empleando PCR.

Para ello fue necesario adecuar la técnica y estudiar algunos aspectos pudiendo concluir que:

- a- El 100% del material con sintomatología descrita que se utilizó para el presente trabajo presentó desarrollo positivo y bien diferenciado de colonias características de *Agrobacterium vitis*. En cuanto a las temperaturas de incubación tanto a 23 °C como a 28 °C. Se observó un desarrollo de colonias típicas, pudiendo destacar que a 28 °C las colonias se visualizaron de forma abundante a los 5 – 7 días de incubación. Si bien a 23 °C también se observó un desarrollo; pudo apreciarse que las colonias tardaron más tiempo en hacerse visibles (de 7 – 10 días) y si bien, mantuvieron las mismas características morfológicas, se mostraron un poco más pobres en volumen comparadas con las colonias crecidas a mayor temperatura.
- b- Al efectuar los ensayos de concentración de ADN para determinar si existía una concentración mínima del mismo para su posterior amplificación, se observó que si bien todas las lecturas positivas obtenidas presentaban una concentración mayor o igual a 49 ng/μl de ADN, no fue posible generalizar esta situación ya que no en todos los casos en donde se registró una concentración elevada de ADN, los resultados de amplificación por PCR fueron positivos.
- c- Al realizar el ensayo de amplificación con distintas concentraciones de ADN, en todos los casos las muestras positivas amplificaron. Los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones de ADN superiores a 116 ng/μl. Se puede concluir que a ésta concentración o superior, la visualización de la amplificación fue más óptima.
- d- Al trabajar con dos concentraciones diferentes de gel de agarosa (2 % y 2.5 %) se observó que si bien la amplificación tuvo buenos resultados en ambos casos, fue mucho más efectiva cuando se trabajó con concentraciones al 2 % tal como lo indicaba la técnica original, pudiéndose visualizar mejor las bandas.
- e- En cuanto a los tiempos de corrida del gel en la cuba de electroforesis, se observó que a los 45 minutos las bandas no se separaron de forma clara como para poder realizar una buena lectura. Al prolongar la electroforesis a 70 minutos, los resultados de la separación de los productos amplificados fueron mucho más efectivos, facilitando la lectura.
- f- Al aumentar el volumen de siembra para la electroforesis a **10 μl de PCR producto** las bandas obtenidas se observaron más definidas y nítidas facilitando la lectura.

PERSPECTIVAS

Al poner a punto esta técnica por PCR se podrán prestar servicios al sector vitivinícola, para detectar, de una manera inequívoca, la presencia e identificar *Agrobacterium vitis* a partir de raíces y coronas infectadas de plantas vid, la misma podría ampliarse también para muestras de suspensiones de tierra o agua con posibles infecciones.

Por otro lado considero que la realización de esta tesina fue muy enriquecedora para completar mi formación como Licenciada en Bromatología ya que permitió introducirme en técnicas de biología molecular, sus principios básicos y metodológicos los cuales no formaban parte del plan de estudio de la carrera.

BIBLIOGRAFIA

1. AI QUIMICOS (2009) GONZALEZ P. Electroforesis como método electro analítico. Blog de cursos y estudiantes de Químicas del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas en la Universidad de las Américas Puebla. <http://al-quimicos.blogspot.com.ar/2009/04/electroforesis-como-metodo.html> (enero 2015)
2. ALIPPI A, LOPEZ A, BELATTI P (2011) Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. Revista Argentina de Microbiología. www.academia.edu/5272354/Articulo_cientifico_agrobacterium (Diciembre, 2014)
3. BURR , T. y KATZ, B.H. /1984. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Dis. 68:976-978
4. EASTWELL, K. C., WILLIS, L. G., and CAVILEER, T. D. (1995). A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 79(8), 822-827.
5. FRITZ W. y STEPHEN J. (Julio 2014). EXTENSION. "Agalla de la corona en uvas". (en línea). Oficina de Extensión en Texas AgriLife y Universidad de Wisconsin-Madison <https://www.extension.org/pages/60159/agalla-de-la-corona-en-las-uvas-crown-gall-in-grapes> (diciembre 2014).
6. INV, 2011. "Exportaciones Argentinas de vinos" http://www.inv.gov.ar/est_exportaciones.php?ind=2011 (agosto 2013)
7. INV, 2011. "Vitivinicultura Argentina" http://www.inv.gov.ar/vitiv_arg.php (agosto 2013)
8. INV, 2012. "Registros de Viñedos y Superficie 2011-2012" Departamento de estadísticas y estudios de mercado (Junio 2013) www.inv.gov.ar/index.php/men-estadisticas/.../42-est-menu-vinedos (Octubre 2013)
9. INV, 2010. "Registro de Viñedos y Superficie" http://www.inv.gov.a/est_varios.php?que=rg_vinedos (agosto 2013)
10. KUMAGAI, L and FABRITIUS A L, (2008) Detection and Differentiation of Pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in Grapevine using Multiplex Bio-PCR (Proceedings of the 2, Annual National Viticulture Research Conference University of California, Davis) <http://iv.ucdavis.edu/files/108864.pdf> (agosto 2013)

11. LASTRA POZO B y LOPEZ GONZALEZ. Comunicado Oral No 48 Estudios preliminares de la incidencia de *Agrobacterium* en viñedos de Galicia. Facultad de Biología Santiago de Compostela e Instituto Valenciano de investigaciones Agrarias, Moncada Valencia http://www.medioruralemar.xunta.es/fileadmin/archivos/investigacion/evoga/p_d44.pdf (Septiembre 2014)
12. MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL “Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua” http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412011000400008 (agosto 2013)
13. MORILLO GOMEZ S X, (2011). “Evaluación del Control de *Agrobacterium tumefaciens* mediante aplicación de agentes antibióticos en rosas.” Escuela Politécnica de Ciencias de la vida.
14. OIV, 2011 “Estadísticas Vitícolas Mundiales 2010 - 2011” [www.oiv.int/oiv/.../OIV Vine and Wine Outlook 2010-2011 ES.pdf](http://www.oiv.int/oiv/.../OIV_Vine_and_Wine_Outlook_2010-2011_ES.pdf) (Agosto 2013)
15. OPHEL y KERR - *Agrobacterium vitis*, Tumores de la vid <http://www.google.com.ar/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&v=0CDIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sef.es%2Fdescargar.php%3Fap%3D6%26e%3D2&ei=nPUgUrudBrCNigKasIG4AQ&usq=AFQjCNFg4zyahof7NJP95d-2TNBAq1xvQ&bvm=bv.51495398,d.cGE> (agosto 2013)
16. PEREZ P, (2003) Departamento de Protección vegetal y Biotecnología Universidad de Valencia “Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens*” <http://roderic.uv.es/handle/10550/15871> (agosto 2013)
17. PLANT PRO (2013) Todo sobre vid “ Verrugas y agallas de la corona” (En línea) http://www.plantprotection.hu/modulok/spanyol/grapes/crown_grap.htm (octubre 2014)
18. POUTOU, 2003 “Biología Molecular”
19. PUERTA C J y UREÑA C P (2005). Practicas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javerina (En línea) https://books.google.com.ar/books/about/Pr%C3%A1cticas_de_biolog%C3%ADa_molecul ar.html?id=pTrKpnFCIZQC&hl=es (diciembre 2014)
20. QUISPE HUMANSQUISPE DORA GRACIELA (2012), CONYTEC, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. “Identificación y caracterización molecular de

secuencias homólogas al T-DNA del plásmido Ti de Agrobacterium spp. insertados en el genoma de Ipomoea”. <http://dspace.concytec.gob.pe/handle/concytec/58> / http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1586/1/quispe_hd.pdf (agosto 2014)

21. SAGP Y A – INV – IRAM / CAMPOS M, NEBBIA I, GUIÑAZU R, LOPEZ JF, NIMO M (2006) “Buenas Prácticas Agrícolas para viñedos” http://www.inti.gob.ar/certificaciones/pdf/Guia_BPA_vinedos.pdf. (agosto 2013)

22. WIKIPEDIA “ Reacción en cadena de la polimerasa” http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa (agosto 2013)

23. WIKIPEDIA. “Agrobacterium” Francis and Spiker, 2005. Plant Journal. 41(3): 464. (En línea) <http://es.wikipedia.org/wiki/Agrobacterium> (Agosto 2014).

ANEXOS

Materiales y equipos de laboratorio

Para la realización de esta tesina se emplearon los siguientes materiales y equipos de laboratorio:

- Autoclave
- Balanza analítica marca Ohaus
- Erlenmeyer de 500 ml
- Erlenmeyer de 500 ml
- Matraz de 250 ml
- Peachímetro marca Altronix
- Agitador marca Poly Science
- Tubos tipo Eppendorf 200 μ l
- Tubos tipo Eppendorf 1500 μ l
- Tubos tipo Eppendorf 2000 μ l
- Vaso de precipitados 1000cc
- Tela de amianto
- Cámara de flujo laminar
- Jeringas descartables de 5 ml
- Filtro estéril
- Cajas de Petri de 9 cm
- Parafilm
- Freezer
- Micropipetas
- Puntas amarillas
- Puntas azules
- Puntas grises
- Bolsas estériles con filtro interno marca Bioreba
- Bisturí
- Mortero
- Estufa de cultivo
- Gradilla congelada
- Baño de agua termostatizado
- Vortex marca Vicking
- Centrífuga marca Hermle
- Termociclador de gradiente de temperatura marca Eppendorf
- Cuba de electroforesis: cama, niveladores y peines
- Probeta de 100 ml
- Microondas marca White-Westinghouse
- Recipiente plástico tipo tupper plástico
- Baño de agitación
- Transiluminador marca Gene flash

- Picodrop
- Computadora para procesamiento de los datos

Compuestos químicos y reactivos

Los compuestos químicos y reactivos empleados fueron los siguientes:

- MgSO₄·7H₂O
- KH₂PO₄
- K₂HPO₄
- Aldonitol
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio
- Agar bacteriológico
- Agua desmineralizada
- Trimethoprima
- Cycloheximida
- Triphenyltetrazoliumchloridrato
- D-cycloserina
- Agua ultrapura estéril
- Agua doblemente destilada
- Agarosa
- Tris Base (aclarar que es)
- Ácido Bórico
- EDTA de Na 0.5 M pH 8
- Marcador de peso molecular 100 bp
- Gel red
- Buffer de carga (Loading buffer)
- Hielo
- Etanol al 70%

Preparación de soluciones

Soluciones

Solución de Red gel al 3 x; 0.1 M CINA: El Red gel viene con una concentración de 1000 x. Esta solución se puede preparar y conservar para teñir varios geles.

Para preparar 250ml de Red gel al 3x; 0.1 M CINA vemos que:

$$\begin{aligned}C1 \cdot V1 &= C2 \cdot V2 \\1000x \cdot V1 &= 3x \cdot 250 \text{ ml} \\V1 &= 0,075 \text{ ml Red Gel} \\V1 &= \mathbf{75 \mu\text{l Red Gel}}\end{aligned}$$

Para aumentar la intensidad de brillo en el gel la solución se prepara al 0.1 M de CINA

$$\begin{aligned} C1 \cdot V1 &= C2 \cdot V2 \\ 5 \text{ M (CINa)} \cdot V1 &= 0.1 \text{ M (CINa)} \cdot 250 \text{ ml} \\ \mathbf{V1} &= \mathbf{5 \text{ ml de CINa 5 M}} \end{aligned}$$

Por lo tanto para preparar la solución se utilizo:

75 µl Red Gel + 5 ml de CINa 5 M + 245 ml de H2O destilada

Precaución: el Red gel se descompone con la luz por lo tanto la solución debe ser colocada en botella color caramelo cubierta con aluminio y almacenado en lugar fresco, seco y a la oscuridad.

