

DETECCIÓN DE *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* EN TOMATE EN EL ESTADO DE SONORA, MÉXICO

Jesús Borboa Flores^{1*}, Edgar O. Rueda Puente¹, Evelia Acedo Félix², Juan F. Ponce³, Manuel Cruz³, Onécimo Grimaldo Juárez³, Adrián M. García Ortega⁴ y Wong Corral F. J.

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Blvd. Luís Encinas y Rosales s/n, Col. Centro. 8300, Hermosillo, Sonora, México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carr. a La Victoria Km. 06, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

³ Instituto de Ciencias Agrícolas. Carr. a Delta s/n. 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México.

⁴Laboratorio de Biología Molecular, Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California. Km 1.5 Carr. a San Felipe s/n, Col. Xochimilco. 21380, Mexicali, Baja California, México.

INTRODUCCIÓN

En México la horticultura es una de las actividades agrícolas de mayor importancia, tanto en el plano social como en el económico, por la captación de divisas y la generación de empleos (Sandoval, 2004). El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una hortaliza afectada durante su producción por el cáncer bacteriano (OEPP/EPPO, 2005), el cual se encuentra distribuido en todas las zonas productoras de tomate del mundo y se considera como una enfermedad poco frecuente, pero severa y de gran importancia económica (Chang *et al.*, 1991). El agente causal de esta enfermedad es conocido como *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*) (Gleason *et al.*, 1993). Desde el primer informe de la enfermedad causada por *Cmm* en los EE.U.U., el cáncer bacteriano se ha dispersado en el mundo y ha causado pérdidas serias a las cosechas de tomate del invernadero y del campo, que mata plantas jóvenes y reduce la producción comercial. La reducción en la producción se puede asociar con la pérdida directa de la planta, o con frutos de menor tamaño y cantidad. En Ontario, Canadá se han registrado pérdidas de producción de 20 % o mayores (Dhanvantari, 1993); en Francia de 20 a 30 % (OEPP/EPPO, 2005); en Illinois, EE.UU de 46 % (Chang *et al.*, 1992); y de 10 % después de la pérdida de la planta en Queensland, Australia (Dullahide *et al.*, 1983).

La bacteria se transmite por semilla infectada y posteriormente penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidatídes de la hoja (Gleason *et al.*, 1993). El marchitamiento marginal de foliolos es uno de los primeros síntomas de la enfermedad en plantas de todas las edades. Posteriormente aparecen estrías necróticas que se extienden desde la parte inferior del pecíolo hasta el punto que se une con el tallo, ya que la bacteria es un invasor sistémico de tejidos del floema, médula y corteza. El objetivo del presente trabajo fue determinar si *Cmm* está presente en tomate, en el Estado de Sonora, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo en plantas (plántula, hoja desarrollada y fruto)

El muestreo se hizo en nueve localidades en sistema de invernaderos, casa sombra y campo a cielo abierto, previa inspección de surcos a pasos equidistantes, de acuerdo con las dimensiones de los sitios de cultivo. En la Figura 1 se muestran los sitios de muestreo (CONAGUA, 2006). Este sistema permite obtener un intervalo de confianza mínimo de 95 % en la detección, en niveles de infección de 0.1 % y con 5 % de confiabilidad en el muestreo (IPFSAPH, 2001). Los síntomas a los que se dirigió el muestreo, fueron los atribuibles a la bacteria *Cmm*, descritos anteriormente (Chang *et al.*, 1992; Gleason *et al.*, 1993; Blancar 1996).

Aislamiento e identificación

Se obtuvo savia de las plantas colectadas mediante un macerado en mortero de porcelana y una porción se sembró en cajas de petri en medios de cultivo: NBY (Caldo nutritivo 0.8 %, extracto de

levadura 0.2 %, K₂HPO₄ 0.2 %, KH₂PO₄ 0.025 %, agar 1.5 %). Las cajas se incubaron a 29 °C por 48 h, y a las colonias resultantes se les hicieron pruebas morfológicas y bioquímicas de acuerdo con las recomendaciones de OEPP/PEPO (2005) y Schaad *et al.* (2000).

Detección serológica

Una porción de savia se empleó para la detección serológica de *Cmm*, con un juego comercial (DAS-ELISA, Agdia ®, Inc.), que consiste en un ensayo “sándwich” de doble anticuerpo, conforme a las instrucciones del fabricante. Una vez terminada la reacción, se observó el desarrollo de color cada 15 min a 405 nm en un lector (Bio-Rad ®) durante 1 h.

Extracción de ADN genómico total a partir de tejido vegetal

Las partes de la planta que se utilizaron para la extracción de ADN genómico fueron: semilla, tallo, follaje y fruto. El ADN genómico total se obtuvo mediante la metodología descrita por Chomczynski *et al.* (1997), que utiliza el reactivo DNAzol-ES ® (MRC, Inc.). Para la obtención del ADN genómico a partir de cepas aisladas de *Cmm*, se utilizó la misma técnica de Ausubel *et al.* (2002) y Sambrook *et al.* (2001).

Detección de *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* por PCR

Se amplificó el espaciador intergénico situado entre los genes ribosomales 16S y 23S, mediante los iniciadores PSA-4: 5'-TCA-TTG-GTC-AAT-TCT-GTC-TCC-C-3' y PSA-R:5'-TAC-TGA-GAT-GTT-TCA-CTT-CCC-C-3', de acuerdo con las especificaciones de Pastrik y Rainey (1999), y se amplificó un fragmento de 270 pb.

También se amplificó por PCR un fragmento de ADNr 16S, de 480 pb, con las condiciones de PCR e iniciadores fD1 y rP2, desarrolladas por Weisburg *et al.* (1991). Los fragmentos de PCR se enviaron a secuenciar a la Universidad de San Diego, Cal. EE.UU., y los resultados se compararon con las bases de datos públicas disponibles, mediante BLAST en las bases de datos del GenBank (Benson *et al.*, 2008).

El volumen total de la reacción fue de 25 µL y como testigo positivo se utilizó ADN genómico extraído de una cepa de referencia. Como testigo negativo se utilizó agua grado biología molecular. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturización inicial a 94 °C/2.5 min, seguido de 40 ciclos con 3 segmentos de: 94 °C/30 s, hibridación a 63 °C/20 s, y extensión a 72 °C/45 s y la polimerización final se hizo a 72 °C por 5 min.

La electroforesis se hizo en gel de agarosa 2 %. Se utilizó amortiguador TBE (0.5 M, pH 8.3) y al preparar el gel se adicionó bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg-mL (Sambrook y Russell, 2001). El árbol de homología se obtuvo de la comparación de las secuencias en el programa DNAMAN versión 6.0 (Lynnon Corp.).

Pruebas de patogenicidad

Preparación del inóculo. Un cultivo bacteriano de 24 h en caldo NBY, se centrifugó por 15 min a 3900 g y el precipitado se resuspendió en solución salina al 0.85 %, se estandarizó el inóculo a una turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Se tomó una alícuota de 1 mL para hacer diluciones seriadas hasta 10⁻⁴ y conocer el número aproximado de células viables. Las diluciones se sembraron en placas con medio NBY por difusión, en volumen de 0.1 mL sobre el agar, la solución bacteriana se diseminó con una varilla de arrastre, y se incubaron a 30 °C por 48 h (Madigan *et al.*, 2006). Este inóculo de 1 x 10⁶ UFC/mL se utilizó para las pruebas de patogenicidad en semilla, plántula, y fruto del tomate (Pony Express F1).

Pruebas de patogenicidad en semilla. Se utilizaron 20 semillas previamente desinfestadas en solución de hipoclorito de sodio 1.0 % (v/v) y fueron embebidas en 200 mL de la suspensión bacteriana por 30 min; posteriormente se sembraron en vasos térmicos por separado, que contenían sustrato estéril tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.). Asimismo, otras 20 semillas se consideraron como testigo negativo al pasar por el mismo proceso, pero con uso de agua destilada estéril.

Pruebas de patogenicidad en plántula. Se tomaron 200 semillas previamente desinfestadas como se mencionó anteriormente, las cuales se germinaron en placas con sustrato estéril (mismas características anteriores); las condiciones en que se produjeron las plántulas fueron a 25 °C; el riego

se realizó con agua estéril. Después de 30 d de la emergencia, se inocularon 10 plántulas con la suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC/mL de *Cmm*, en forma de aspersión directa la planta. En cada tratamiento se utilizaron 10 plántulas como testigo negativo, que pasaron por los mismos procesos mencionados anteriormente pero con agua destilada estéril.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 237 muestras analizadas, de las cuales, 8 fueron de raíz, 11 de tallo, 189 de hojas, 15 de frutos y 14 de semilla, pertenecientes a 9 localidades. Se detectó el crecimiento de colonias sospechosas de *Cmm* en dos localidades, una con sistema de siembra en malla sombra y otra en invernadero, lo que correspondería a una incidencia de 0.27 y 0.11 %, respectivamente. En ambos casos, las plantas presentaron un grado de severidad leve en etapa inicial, y algunas con un grado de severidad avanzado.

La presencia de la enfermedad en cualquier sistema de cultivo del tomate, representa un foco de alerta roja, debido a que la bacteria se transmite por semilla y plántulas y sobrevive en el suelo por dos o tres años, lo que puede llevar a que se disemine y provoque fuertes pérdidas en la cosecha, como ha ocurrido en otras regiones (Gleason *et al.*, 1993). La presencia de la enfermedad se ha reportado más comúnmente en siembra en invernaderos, y se atribuye a la alta humedad relativa en estos sistemas de siembra, situación similar a la observada en el presente trabajo. En la región Mediterránea de Turquía, Basim *et al.* (2004) reportaron la aparición de la enfermedad en sistema de producción de tomate en invernadero con una incidencia que varió de 26 a 65 %, que provocó grandes pérdidas económicas, y una gran variedad de síntomas como marchitamiento, coloración marrón oscuro a negro en las lesiones de los márgenes de las hojas y en las fases avanzadas de la enfermedad, con tejido vascular de color marrón claro, síntomas que concuerdan con los observados en este trabajo.

Detección serológica

Por medio de la técnica de ELISA se detectaron cinco muestras positivas de *Cmm* (3 de tallo, 1 de hoja y 1 de semilla), mediante el juego comercial recomendado por las normas OEPP/EPPO (2005). Esta técnica es la recomendada cuando se va a analizar un número grande de muestras, ya sea de material vegetal o bien de colonias aisladas. En el presente trabajo únicamente se utilizó para la detección directa en el material vegetal, por lo que sólo se puede concluir que esta técnica fue útil en la detección primaria de la bacteria; es decir, dio idea de la presencia del patógeno en las plantas, pero no se analizaron colonias aisladas.

Aislamiento y caracterización fenotípica de *Cmm*. Se seleccionaron colonias que presentaron las características morfológicas y bioquímicas de la bacteria en estudio, colonias de color amarillo a naranja, con crecimiento aeróbico a 30 °C, de consistencia mucoide en medio de cultivo NBY. La tinción mostró la presencia de bacilos Gram negativos. Mediante la caracterización bioquímica se seleccionaron las colonias que presentaron crecimiento en NaCl 6 %, fermentaron glucosa, sacarosa y maltosa, pero no fermentaron arabinosa ni xirosa; además utilizaron glicerol y manitol como fuentes de carbono y no expresaron actividad de citocromo oxidasa (Schaad *et al.*, 2000).

Detección e identificación por técnicas moleculares. Se detectó la presencia de *Cmm* por la amplificación de un fragmento de ADN específico de 270 pb mediante PCR. Las siete muestras positivas fueron dos de tallo, dos de hoja y tres de semilla (Figura 1). La presencia de *Cmm* se corroboró una vez que fueron aisladas las colonias mediante PCR, con los mismos resultados de amplificación del fragmento de 270 pb (datos no mostrados). La identificación de las colonias se hizo mediante la secuenciación del fragmento de 480 pb, amplificado por PCR del ADNr. Se encontró que los fragmentos obtenidos pertenecen a cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, ya que al compararlas con las secuencias de las bases de datos públicas mostraron una homología de 99 %. La Figura 2 muestra el árbol de similitud de las secuencias de dos de las cepas aisladas (D y H); La cepa D pertenece a los aislamientos de sistema de siembra en casa sombra, mientras que la cepa H a sistema de siembra en invernadero.

La homología de las secuencias de las bases de datos con las cepas D y H aisladas es alto, con 99 % entre ellas, así como a las secuencias de cepas obtenidas de las bases de datos con las que fueron comparadas (AB29958, EU686335 y DSM 46364), mientras que con *Micobacterium* spp., la cual pertenece al mismo grupo taxonómico, la homología es de 87 % y sólo comparte un 36 % de homología con *Escherichia coli*. Li y De Boe (1995) compararon la secuenciación casi completa de los genes 16S rRNA de las cepas tipo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. m* subsp. *insidiosus*, *C. m* subsp. *sepedonicus* y *C. m* subsp. *nebraskensis*, y las cuatro especies mostraron una disimilitud de apenas 1 % en sus genes ribosómicos, lo cual es mayor para otras especies y subespecies del mismo género.

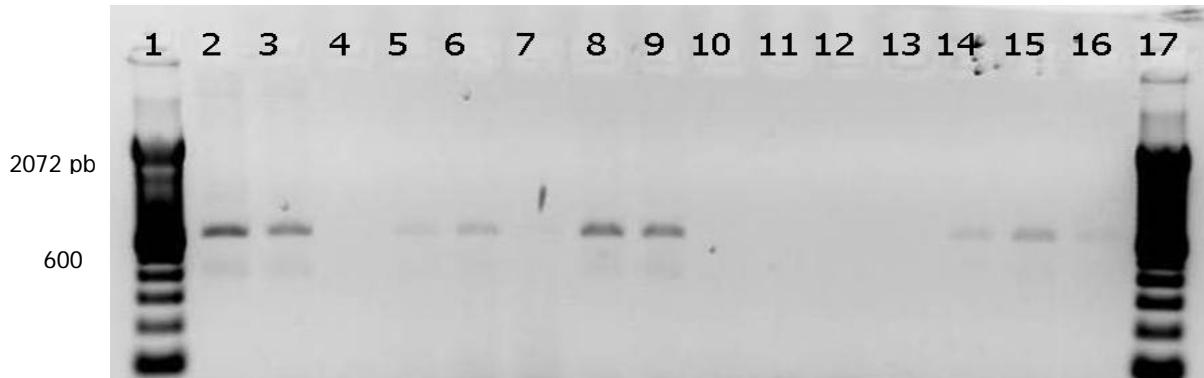


Figura 3. Detección por PCR de un fragmento de ADN específico para la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* en muestras de diversos tejido de planta de tomate con síntomas de cáncer bacteriano. 1 y 17 100 bp, ADN ladder; 2 y 3 testigos positivos; 4, testigo negativo; 5 y 6, tallo (+); 7, tallo (-); 8 y 9, hoja (+); 10, 11 y 12, hoja (-); 13, semilla (-); 14, 15 y 16, semilla (+).

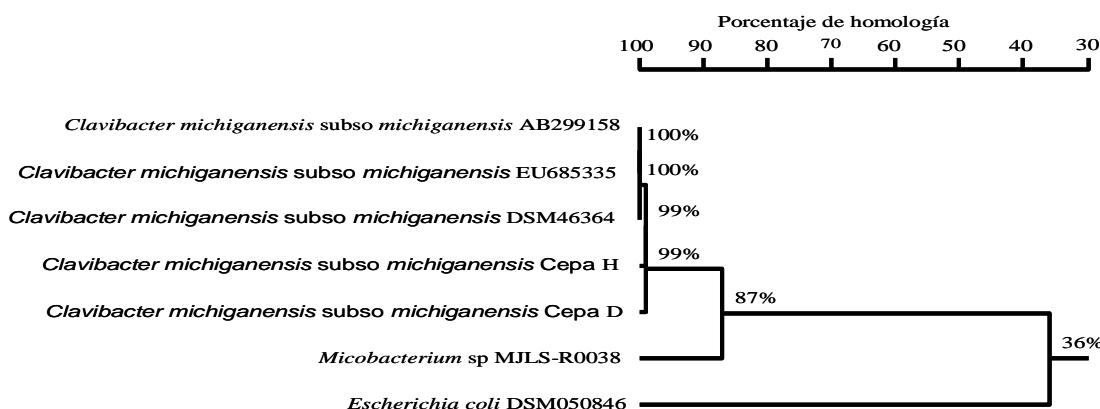


Figura 4. Árbol de homología de la comparación de las secuencias del fragmento del ADNr amplificado de las cepas H y D aisladas en este trabajo, con tres secuencias parciales de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, de *Micobacterium* spp. y *Escherichia coli*.

Pruebas de patogenicidad

Las semillas tratadas con la solución bacteriana germinaron a las 48 h, y a los 7 d alcanzaron altura de 5 cm; las plántulas fueron marchitándose progresivamente hasta morir totalmente por efecto de la solución bacteriana, mientras que la semilla tratada con agua destilada no manifestó síntoma alguno y continuó su crecimiento. Las plantas que fueron tratadas con el inóculo bacteriano en las formas de aspersión directa sobre la planta, mostraron síntomas a los 3 d de incubación en contraste con las plantas testigo inoculada con agua estéril, en las que no se observaron síntomas de marchitez. Esto

confirma que los aislamientos obtenidos corresponden al agente causal de la enfermedad y que se trata de una cepa fuertemente virulenta, por lo que es necesario que se busque la forma de controlarla dentro de los sistemas agrícolas aislados, y de evitar su diseminación.

CONCLUSIONES

En el Estado de Sonora, México, la enfermedad conocida como marchitez bacteriana en tomate, inducida por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, está presente en sistemas de producción bajo invernadero y casa sombra, así como en semilla, identificada tanto por las técnicas de aislamiento en medios de cultivo y ELISA, como por la reacción en cadena de la polimerasa. Sin embargo, no se encontraron síntomas de la enfermedad en plantaciones de tomate en campos a cielo abierto. No fue posible determinar la procedencia de la infección, ya que no se encontró ningún otro caso en plantaciones de tomate ni tampoco en semilla muestreadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K (2002).** Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. Inc. 1512 p.
- Benson D A, I Karsch-Mizrachi, D J Lipman, J Ostell and D L Wheeler (2008).** GenBank. Nucleic Acids Research 36, Database issue D25–D30.
- Blancar D (1996).** Enfermedades del tomate. INRA Estación de Patología. Ed. Mundi-Prensa. España. 109 p.
- Chang R J, Ries S M and Pataky J K (1991).** Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* by practices used to produce tomato plants. *Phytopathology* 81: 1276-1281.
- Chang R J, Ries S M and Pataky J K (1992).** Local sources of *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* 82:553-560.
- CONAGUA Comisión Nacional del Agua CONAGUA (2006).** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Red de estaciones climatológicas de la región Norte. www.conagua.gob.mx (Mayo del 2007).
- Dhanvantari B N (1993).** Seed-borne infection in tomato bacterial canker. Proce. 9th Annual Tomato Disease Workshop. pp. 33-36.
- Dullahide S R, Moffett M L Heaton J B, Giles J (1983).** Effect of time of inoculation of *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* on yield of trellised tomatoes. *Australasian Plant Pathol.* 12:15-16.
- Gleason M, Braun E J and Peterson R H (1993).** Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 81:1519-1523.
- IPFSAPH (2001).** National Seed Health System: Reference Manual B (Seed Health Testing and Phytosanitary Field Inspection Methods Manual). pp: 44-52. <http://www.ipfsaph.org/servlet/CDS>. (Febrero de 2005).
- Li X and De Boer SH (1995).** Comparison of 16S ribosomal RNA genes in *Clavibacter michiganensis* subspecies with other coryneform bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:925-929.
- Madigan M T, Martinko J M y Parker J (2006).** Brock, Biología de los Microorganismos. 10^a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid. pp. 142-149.
- OEPP/EPPO 2005.** Diagnostic *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 7/42(1) Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 35:271-273.
- Pastrik K H and Rainey F A (1999).** Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathol.* 147:687-693.

- Sandoval B C (2004).** Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos Agricultura y la Alimentación. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. p.1.
- Sambrook J, Russell D W, Sambrook J (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. p. 999.
- Schaad N W, J Jones B, W Chun. (2000).** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria. Ed. APS Press. U.S.A. pp:1-15.
- Weisburg W G, S M Barns, D A Pelletier, and D J Lane. (1991).** 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.