

DETECCIÓN EN SEMILLAS DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*, AGENTE CAUSAL DEL CÁNCER BACTERIANO DEL TOMATE

A. Miguel,¹ A. García,² Zenaida Amat¹ y Irina Pérez²

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

² Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal, Ayuntamiento 231 e/ San Pedro y Lombillo, Cerro, Ciudad de La Habana

RESUMEN

El cáncer bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) es una de las enfermedades más importantes en este cultivo. La principal fuente de introducción y transmisión es a través de semillas donde el patógeno puede sobrevivir por años con niveles de inóculo muy bajos, lo que hace difícil su detección. Se realizó un estudio con el objetivo de estandarizar el método más idóneo, en nuestras condiciones, para detectar esta bacteria, conjugando la técnica serológica IFI con la siembra en medio semiselectivo. Utilizando semillas artificialmente infectadas se emplearon las siguientes variantes: maceración en tampón PBS una hora a 100 rpm sin centrifugación, PBS 24 horas a 4°C con centrifugación y PBS una hora a 100 rpm con centrifugación, tomando como control el método OEPP de maceración en tampón PBT por 24-72 horas a 4°C con centrifugación. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el método PBS una hora con centrifugación y el control OEPP, por lo que se procedió a comparar la sensibilidad de ambos tomando porcentajes de semillas infectadas, de donde se concluye que el método seleccionado responde correctamente, obteniéndose resultados positivos en la IFI en concentraciones de semillas infectadas mayores al uno por ciento mientras que la técnica cultural es sensible, al menos hasta el 0,1% de semillas infectadas, por lo que se propone como prueba confirmativa del diagnóstico.

Palabras claves: tomate, *Clavibacter michiganensis*, semillas, métodos de diagnóstico, cáncer bacteriano

ABSTRACT

Bacterial canker of tomato is an important disease caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). The main source of inoculum are infected seeds where the pathogen can survive for many years. The aim of this study was to obtain the best method in our conditions to detect this bacterium in seed lots based in dilution plating in semiselective media and the serological technique Immunofluorescence staining (IFAS). The best result for extract this quarantined pathogen was achieved macerating the seeds in phosphate buffer (PBS) 1 hour at 100 rpm at room temperature plus centrifugation. As control was taken the method proposed by EPPO. Whereas by IFAS we only detect the target in lots with more than 1% of infection, the bacterium was obtained in KBT at least, in lots with 0.1 percentage of artificially infected seeds of tomato. Then we considered this probe as the confirmative one in seed testing of Cmm.

Key words: tomato, *Clavibacter michiganensis*, seeds, diagnosis methods, bacterial canker

INTRODUCCIÓN

El cáncer bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davies, Gillaspie, Vidaver & Harris es una de las enfermedades más importantes del tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) a nivel mundial [Fatmi y Schaad, 1989; Fatmi y Schaad, 1991].

Aunque el patógeno puede sobrevivir en el suelo, en malezas y en otros cultivos de interés, se considera que la principal fuente de diseminación de la enfermedad es a través de las semillas contaminadas, encontrándose el microorganismo tanto sobre la cubierta como en el interior de ellas [Fatmi y Schaad, 1989; Dhanvanta-

ri, 1989]. Se ha demostrado que la sobrevivencia del patógeno en semillas supera los diez años [Franken et al., 1993] y que la enfermedad se puede transmitir de una cosecha a otra y ocasionar drásticas epifitias, aunque el porcentaje de infección en un lote de siembra sea inferior al uno por ciento.

La enfermedad ocasiona una severa reducción de la cantidad y la calidad de los frutos, los cuales de obtenerse pierden su capacidad comercial [Van Vaerenbergh y Chaveau, 1987]. Además la enfermedad representa un peligro potencial para otros cultivos importantes como la berenjena y el pimiento.

Este es un organismo cuarentenado debido a que la enfermedad no está presente en el país, por lo que el objetivo del trabajo consistió en obtener un método, a partir de cepas de referencia, de diagnóstico en semillas sensible, confiable y objetivo en las actuales condiciones para los diferentes niveles del sistema de sanidad vegetal, el cual debe poder insertarse dentro del programa integrado de detección de patógenos bacterianos en semillas de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

Se procedió a la extracción del patógeno de lotes de semillas artificialmente infectados, tomando tres submuestras de cinco gramos cada una y añadiendo cada submuestra a un erlenmeyer con 50 mL del tampón correspondiente.

Se probaron las siguientes variantes empleando tampón fosfato (PBS pH 7,2) como líquido de extracción:

Método 1: Maceración por una hora con agitación (100 rpm) a temperatura ambiente.

Método 2: Maceración por 24 horas a 4°C seguida de centrifugación a 7 000 rpm por 15 minutos.

Método 3: Maceración por una hora con agitación (100 rpm) a temperatura ambiente seguido de centrifugación a 7 000 rpm por 15 minutos.

Como control se utilizó el método empleado por la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (OEPP), consistente en maceración en tampón PBTween 20 (pH 7,45) por 24-72 horas a 4°C, seguido de centrifugación [Chaveau, 1992; Franken *et al.*, 1993].

El pellet obtenido en todos los casos se resuspendió en 1 mL de PBS, y se prepararon tres diluciones seriadas en cada caso (10^{-1} a 10^{-3}).

Aislamiento de Cmm

Se tomaron 50 µL de cada una de las tres diluciones seriadas, y se sembraron empleando espátula de Drigalsky en placas con los medios KBT y KBP. El medio KBT consiste en *Pseudomonas* Agar F (Difco) suplementado con telurito de potasio, cicloheximida y ácido nalidíxico, mientras que el KBP es similar, pero con la sustitución del telurito de potasio por polimixina B

[Dhavantari, 1988; Chaveau, 1992]. Las placas petri inoculadas se incubaron a 28°C. Las colonias de Cmm comienzan a aparecer al cuarto día y en ambos medios se muestran redondeadas, convexas, de coloración gris oscuro con márgenes más claros en KBT, mientras que en KBP son de color amarillo pálido [Chaveau, 1992]. Se contaron las colonias típicas y se les realizó una aglutinación en portaobjetos a algunas tomadas al azar con un inmunosuero policlonal.

Microscopía de inmunofluorescencia

Se empleó un inmunosuero policlonal (1:800) obtenido en el INISAV y levantado en conejo, tomando como antígeno una suspensión de células enteras de la cepa 21G del patógeno. Se utilizó la variante inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleando el original y la primera dilución seriada obtenida (10^{-1}) en cada caso. Se chequearon 30 campos y se promedió el número de células observadas para dar el resultado en células/campo.

Prueba de sensibilidad

Se seleccionó el método de extracción 3 tomando como control el método propuesto por la OEPP. Se siguieron los mismos pasos, pero usando porcentajes de semillas infectadas de 2%, 1%, 0,5%, 0,3% y 0,1% del total de las submuestras de cinco gramos. La metodología de identificación se basó en este caso en inmunofluorescencia indirecta y siembra en medio semiselectivo KB. El medio KBP no se empleó por razones que más adelante detallaremos.

Análisis estadístico

En todos los resultados obtenidos se empleó la prueba estadística de comparación de medias basadas en la distribución *t* de Student con un intervalo de confianza del 95% ($p = 0,95$). Se señalan las diferencias significativas en las tablas, cuando existen, con un asterisco.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en cuanto a los métodos de extracción, tomando como testigo el método propuesto por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (OEPP) se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Resultados respecto a los métodos de extracción mediante la siembra en medio semiselectivo KBT

Xm (UFC/Placa)	Método 1			Método 2			Método 3		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Variantes	500	12,3	1,2	45,0	8,5	1,5	90,0*	15	3,8
Método OEPP	933*	126,0*	15,0*	44,0	14,0*	1,6	46,6	17	5,2

* Diferencias significativas

Tabla 2. Resultados respecto a los métodos de extracción mediante inmunofluorescencia indirecta (dilución 10^{-1})

Células/campo	Método 1	Método 2	Método 3
Variantes	3,7	9,4	9,7
Método OEPP	8,5*	8,7	9,1

* Diferencias significativas

Los resultados obtenidos del enfrentamiento de la variante seleccionada (método 3) respecto al siste-

ma propuesto por la OEPP se muestran en las *Tablas 3 y 4*.

Tabla 3. Resultados de sensibilidad del método 3 respecto al control OEPP en medio semiselectivo KBT (UFC/Placa)

Porcentaje infección	2%			1%			0,5%			0,3%			0,1%		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Método 3	83*	12*	3,0*	163	26	6	34*	3	0,7*	185	48*	7*	26*	2*	0,3*
OEPP	53	5	0,3	184*	47*	5	30	3	0,3	187	37	4	4	1	0,1

* Diferencias significativas

Tabla 4. Resultados de sensibilidad del método 3 respecto al control OEPP para inmunofluorescencia indirecta (células/campo)

Variante (10^{-1})	2%	1%	0,5%	0,3%
Método 3	4,62*	1,15	Negativa	Negativa
Método OEPP	1,87	0,95	Negativa	Negativa

* Diferencias significativas

Al enfrentar el método de extracción 1 con el método empleado por la OEPP (control), este último demostró, de acuerdo con la comparación de las medias obtenidas con la IFI y la siembra en medio semiselectivo, una diferencia significativa respecto al primero, por lo que se decidió comprobar si esta diferencia era consecuencia del tiempo de extracción (24 horas en incubadora refrigerada a 4°C) o a la concentración de la muestra basado en una centrifugación a 7 000 rpm por espacio de 15 minutos.

Se enfrentó el control OEPP con los métodos 2 y 3, resultados que mostraron que la diferencia significativa se debe al paso de centrifugación con la respectiva concentración de células que el proceso conlleva y no al tiempo de incubación.

Una vez comprobada la importancia de este paso, se enfrentaron ambos métodos, pero disminuyendo los porcentajes de semillas infectadas. Las pruebas realizadas desde el 2% al 0,1% no muestran en general diferencias respecto a los métodos de extracción probados, incluso mostrando una ligera mejoría en la extracción por una hora.

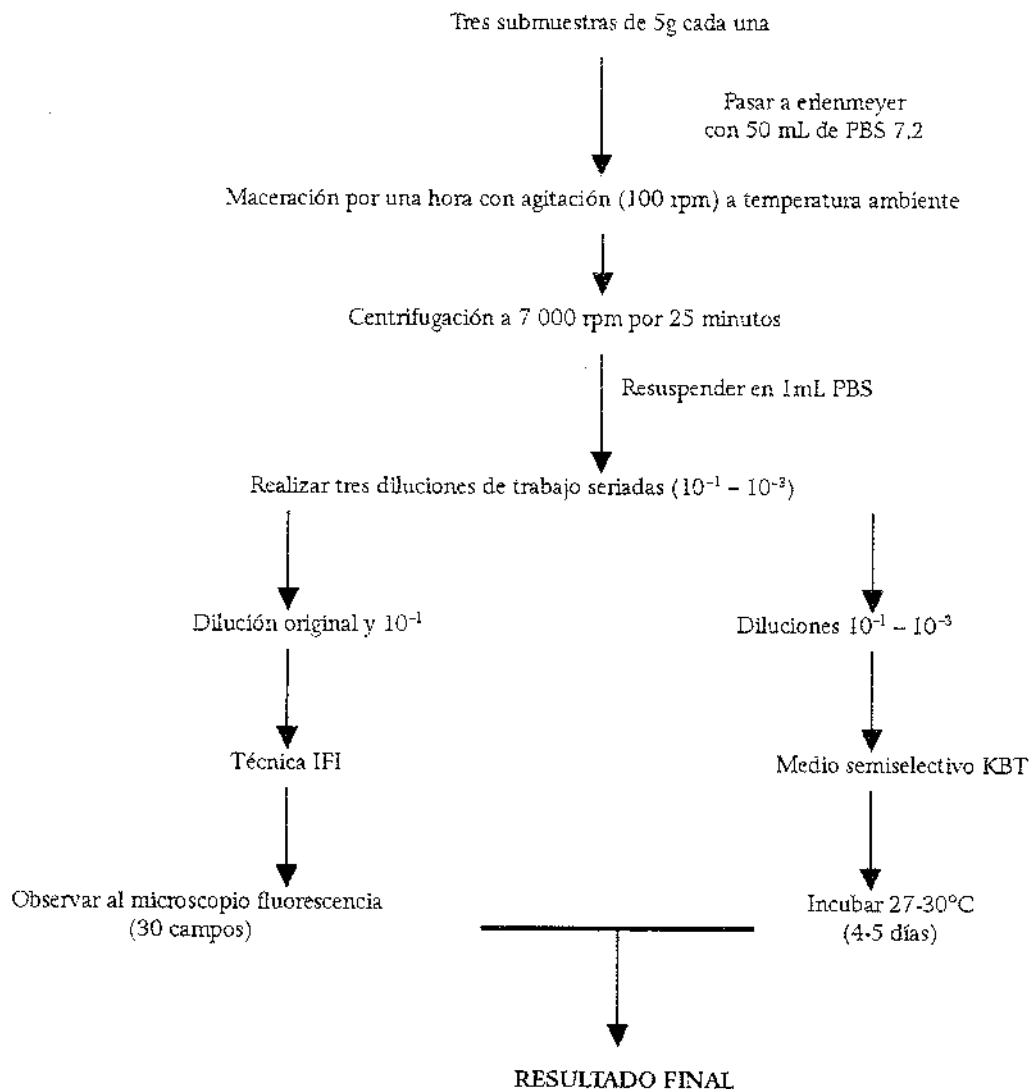
Respecto a la inmunofluorescencia indirecta, se observaron células típicas corineformes como se describen en la literatura [Chaveau, 1992; Franken *et al.*, 1993] en la primera dilución seriada, mientras que en los originales no se pudo definir el patógeno debido a la existencia en gran cantidad de partículas –que también son concentradas con la centrifugación– que interfieren en el resultado. En general esta técnica es útil hasta niveles de infección superiores al uno por ciento.

Respecto a los medios de cultivo, el KBT no resultó idóneo según nuestros resultados por el alto número de contaminantes de más rápido crecimiento que *Cmm*, lo que afectó sensiblemente el recobrado del patógeno. Sin embargo, el KBT muestra un recobrado alto con un muy escaso crecimiento de saprófitos, obteniéndose muchas veces un cultivo puro de la bacteria.

El medio KBT resulta útil hasta grados de infección de al menos un 0,1% del total, lo que nos lleva a concordar con la metodología de la OEPP, que toma como prueba confirmativa del diagnóstico para *Cmm* en semillas la siembra en medio de cultivo semiselectivo con la IFI como una prueba complementaria de mucha utilidad [Chaveau, 1992].

Esta metodología que proponemos se inserta dentro de la ya establecida en nuestro país para la detección de patógenos bacterianos en semillas de tomate y pimiento, además de que se adapta mejor a las condiciones objetivas de nuestros laboratorios, los cuales, en su mayoría, no poseen el equipamiento necesario ni todos

los reactivos que requiere el sistema de detección de la OEPP. Gracias a nuestro sistema de detección también economizamos tiempo, ya que el diagnóstico se obtiene en menos de ocho horas de trabajo, mientras que por la propuesta OEPP se requiere de 48-72 horas (Figura).



Metodología para la detección de *Cmm* en semillas de tomate

CONCLUSIONES

- El método de extracción 3-PBS una hora y agitación a 100 rpm con centrifugación— es adecuado para diagnosticar semillas infectadas con *Cmm*.
- La técnica IFI se debe usar como complemento a la siembra de diluciones en medio agarizado, ya que es incapaz de detectar porcentajes de infección inferiores o iguales al uno por ciento.
- El medio semiselectivo KBP no mostró alta eficacia en el recobrado del patógeno.
- La siembra en medio semiselectivo KBT es la prueba confirmativa del diagnóstico de semillas infectadas; ya

que es capaz de detectar, al menos, el 0,1% de infección, identificándose fácilmente *Cmm* con un muy escaso crecimiento de saprófitos.

REFERENCIAS

- Chaveau F. J.: «*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Test Methods for Tomato Seeds», *Bulletin EPPO* 22(2): 219-224, 1992.
- Dhavantari, B.N.: « Comparison of Selective Media for Isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*», *Phytopathology* (EUA) 78, 1988.

- : «Effect of Seed Extraction Methods and Seed Treatments on Control of Tomato Bacterial Canker», *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 400-408, 1989.
- Fatmi, M.; N.W. Schaad: «Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomato Seeds», *Detection of Bacteria in Seeds*, APS Press 45-49, 1989.
- : «Seed Treatments for Eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from Naturally Infected Tomato Seeds», *Plant Disease* 75(4), 1991.
- Franken, A. A.; G. C. Kamminga; Y. E. Birnbaum: «Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomato Seeds by Immunofluorescence Microscopy and Dilution Plating», *Neth. J. Pl. Path.* 99:125-137, 1993.
- Kritzman G.: «A Method for Detection of Seedborne Bacterial Diseases in Tomato Seeds», *Phytoparasitica* 19(2): 133-141, 1991.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: *Bacterial Canker of Tomato*, United Kingdom: MAFF Publications, 1982.
- Van Vaerenbergh J. C. P.; J. F. Chauveau: «Detection of *Corynebacterium michiganensis* in Tomato Seed Lots», *Bulletin EPPO* 17: 131-138, 1987.