

DESARROLLO DE ANTICUERPOS CONTRA *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV *TABACI* CON LA UTILIZACIÓN DE SULFOXIMINA DE METIONINA

Marusia Stefanova Nalimova,¹ Ariel Basalto Perdomo,² María L. Larrinaga Arango,¹ María F. Coronado Izquierdo,¹ Geraldo H. N. Oliveira³

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

² Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera El Tumbadero, Km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana

³ Centro de Investigaciones y Desarrollo de Souza Cruz. Río de Janeiro, Brasil

RESUMEN

Las lesiones cloróticas redondas que caracterizan la enfermedad fuego salvaje (*Pseudomonas syringae* pv *tabaci*) son resultado de la tabtoxina bacteriana, cuyo homólogo químico y funcional es la sulfoximina de metionina. Se obtuvieron dos inmunosueros (Pt-3C1 y Pt-3C2) que reconocen las cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, donde se utilizó como inmunógeno la cepa Pt-3 de la especie *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, tratada con sulfoximina de metionina mediante un procedimiento de conjugación con peryodato de sodio. Para la inmunización se emplearon inyecciones intravenosas de dosis crecientes en conejos. Los sueros mostraron títulos de 1/2560 contra el inmunógeno por precipitación en tubos. El suero Aspa-3 anti *Pseudomonas syringae* pv *tomato* obtenido de la cepa Pt-3 provocó precipitación con valores significativamente inferiores, por debajo de 20% cuando se enfrentó a las mismas cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Los resultados señalan la posibilidad de utilizar la sulfoximina de metionina bajo el tratamiento descrito, para el desarrollo de sueros que pueden reconocer a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*.

Palabras claves: sulfoximina de metionina, antisuero, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*

ABSTRACT

Wild fire disease (*Pseudomonas syringae* pv *tabaci*) is characterized by round chlorotic lesions produced by bacterial tabtoxin, which chemical and functional homologous is metionine sulfoximine. Two immunosera (Pt-3C1 and Pt-3C2) that recognize *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* strains were obtained, using the *Pseudomonas syringae* pv *tomato* Pt-3 isolate as immunogen, treated with metionine sulfoximine by means of a procedure of conjugation with sodium periodate. Rabbits were intravenously injected with increasing doses of the immunogen. The presence of specific antibodies in the obtained sera was evaluated by precipitation in tubes. Sera showed titres of 1/2560 against the immunogen. Particularly As Pt-3 anti *Pseudomonas syringae* pv *tomato* serum, obtained against Pt-3 strain, caused precipitation with significantly inferior values, below 20%, when it was tested against the same strains of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Results show the feasibility of using metionine sulfoximine, under the described treatment, for the generation of antisera, which can recognize the bacterium *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*.

Key words: metionine sulfoximine, antibody, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad fuego salvaje (*Pseudomonas syringae* pv *tabaci*), que provoca pérdidas de consideración en el cultivo del tabaco [Lucas, 1975; Shoemaker, 1990], se caracteriza por lesiones cloróticas redondas de 3-5 mm de diámetro, con centros necróticos. El halo clorótico es resultado de la acción de la tabtoxina, un metabolito de las células bacterianas que ocasiona la interrupción del ciclo fotorrespiratorio y la inhibición de la fotosíntesis [Turner *et al.*, 1986; Turner, 1988; Bender *et al.*, 1999].

La sulfoximina de metionina está considerada como un análogo químico de la tabtoxina [Woolley *et al.*,

1952], introducida en hojas de tabaco como solución acuosa en concentraciones desde 0,05 hasta 0,1 mg/mL dio lugar la formación de halos cloróticos no distinguibles de los producidos por la tabtoxina de *P. syringae* pv *tabaci*, según informa Braun (1955). Se utilizó en la selección de mutantes resistentes a *P. syringae* pv *tabaci* y a la tabtoxina [Carlson, 1973].

La estructura de la sulfoximina de metionina, muy parecida a la estructura de la tabtoxina [Braun, 1955], y su actividad biológica similar sobre el tabaco, condujo a la consideración que sería posible obtener un

antisuero que pudiera reconocer a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, con la utilización como inmunógeno de una especie bacteriana biológicamente similar, bajo un tratamiento específico que propiciara la unión de unidades de sulfoximina de metionina a su superficie externa. Los resultados en esta dirección se exponen en el presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleo la especie *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, cepa Pt-3 del cepario del Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal, interceptada de frutos de tomate importado. A partir de un cultivo de 24 h en agar nutriente se preparó una suspensión bacteriana en buffer PBS que se lavó dos veces por centrifugación a 10 000 rpm, a 4°C durante 5 min.

Para la conjugación con la sulfoximina de metionina (SM), la suspensión bacteriana (3000 µL) se trató con igual volumen de peryodato de sodio (0,04 M) e incubó en la oscuridad por 20 min. A continuación se sometió a una diálisis durante toda la noche a 4°C contra acetato de amonio (0,01 M) y posteriormente se enfrentó a 2 mL de una solución de la sulfoximina de metionina (2 mg/mL) en agua destilada. Las bases de Schiff formadas entre la bacteria y el análogo se estabilizaron mediante la adición de 500 µL de una solución de borhidruro de sodio (4 mg/mL).

Para la obtención de anticuerpos policlonales contra el conjugado *Pseudomonas syringae* pv *tomato*-SM se

inmunizaron, por vía intravenosa, conejos de la raza chinchilla de dos meses de edad y 2,5-3 kg de peso, suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (Cenpalab). La suspensión del inmunógeno utilizada para la inmunización fue de una concentración por encima de 10⁹ UFC/mL, según la escala de Mc Farland. El protocolo contó de ocho inyecciones (dos por semana) de dosis crecientes a partir de 0,5 mL. Finalizada la inmunización, se determinaron los títulos frente a la suspensión del inmunógeno utilizado. Los inmunoseros obtenidos se guardaron a 4°C con azida sódica como preservante.

La reacción frente a cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de los antiseros obtenidos se evaluó en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo, de Souza Cruz, en Brasil. Se utilizó la prueba de aglutinación simple en placas Petri, en cuya superficie se mezclaron alícuotas de 20 µL de las suspensiones bacterianas y de los sueros. También se realizó una precipitación en tubos con lectura espectrofotométrica para cuantificar la precipitación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron dos antiseros denominados Pt-3C1 y Pt-3C2, cuyos títulos se mostraron elevados frente al inmunógeno, la precipitación en los tubos llegó hasta la dilución 1/2560, según la evaluación visual, la reacción inmunógeno-anticuerpo fue más fuerte con el suero Pt-3C2 (Tabla 1).

Tabla 1. Títulos alcanzados por los antiseros Pt 3 C1 y Pt 3 C2 frente al inmunógeno empleado

Ac/título	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
Pt-3C1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+
Pt-3C2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

+++ Precipitación fuerte ++ Precipitación mediana + Precipitación leve

Los antiseros Pt-3C1 y Pt-3C2 reaccionaron positivamente, por aglutinación en portaobjetos, con las cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, a simple vista se observaron los precipitados formados entre los antígenos y los anticuerpos. La reacción de estas cepas con el suero Pt-3, anti *Pseudomonas syringae* pv *tomato* ocurrió a los 3-5 min con precipitados ligeros.

La lectura espectrofotométrica de la reacción de precipitación en tubos evidenció que el antisuero Pt-3C2 reconoce, con una mayor afinidad, a las cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* del tipo mucoide, tabtoxina positivas (Fig. 1). El suero As Pt-3 anti *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (cepa Pt-3) mostró valores de precipitación significativamente inferiores por debajo del 20% cuando se enfrentó con las mismas cepas de *Pseudomonas*

syringae pv *tabaci* (Fig. 2). Este inmunosuero, sin embargo, reaccionó fuertemente con su cepa homóloga (Tabla 2) y reconoció, con una elevada afinidad, a otras

13 cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* que formaron, por inmunodifusión, una banda única de precipitación para una identidad total entre las cepas.

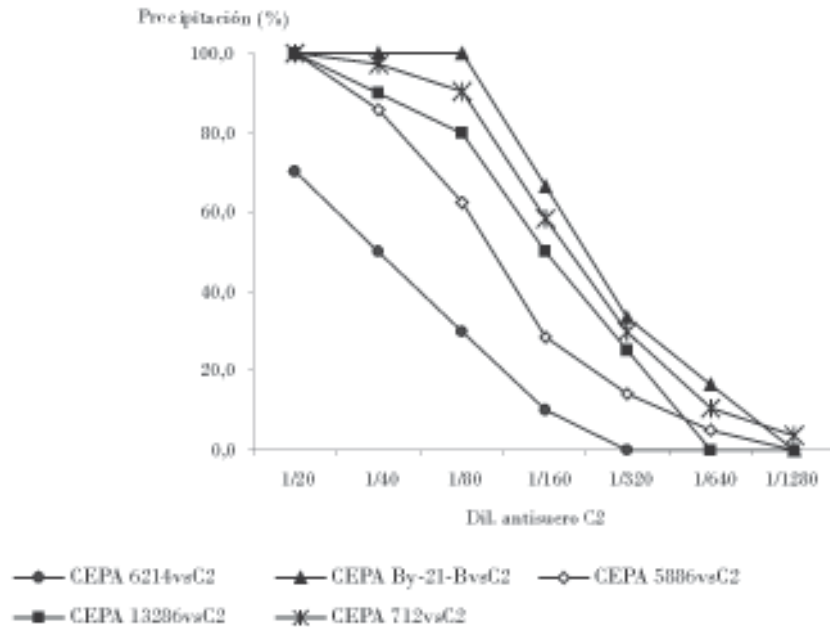


Figura 1. Porcentaje de precipitación del suero Pt-3C2 con cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*.

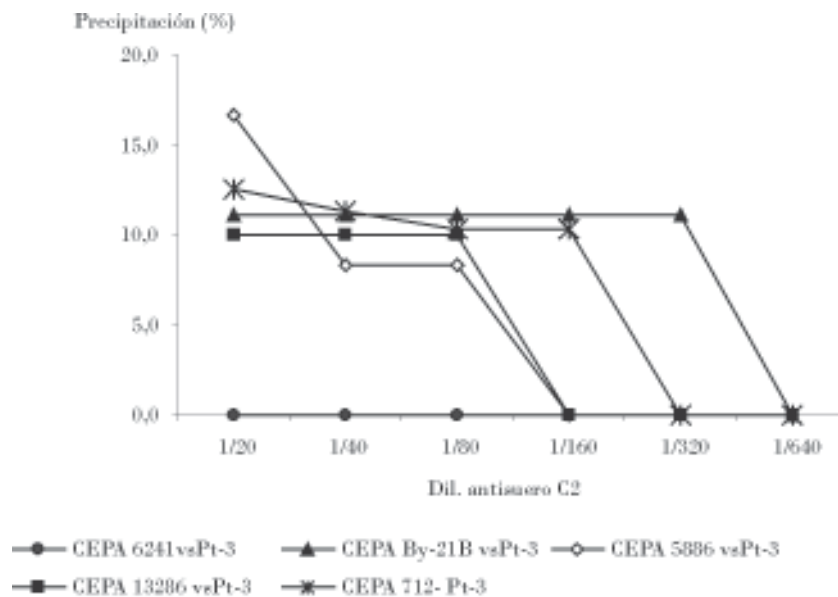


Figura 2. Porcentaje de precipitación del suero Pt-3 anti *Pseudomonas syringae* pv *tomato* con cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*.

Tabla 2 Titulación del suero As Pt-3 de *Pseudomonas syringae* pv *tomato* por inmunoprecipitación en tubos.

As Pt-3/título	1/20	1/40	1/80	1/160	1/ 320	1/640	1/1280
Cepa Pt-3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

+++ Precipitación fuerte ++ Precipitación mediana + Precipitación leve

El inmunógeno, resultado de la unión de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, como microorganismo transportador con la sulfoximina de metionina, mediante un procedimiento de oxidación y reducción de los grupos carbonilos de los carbohidratos condujo por una parte a la generación de anticuerpos contra *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, que reconocen cruzadamente a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, y por otra de anticuerpos que pueden reconocer a la tabtoxina y que potenciaron el reconocimiento de esta última bacteria. La reacción cruzada en este caso no representa un problema para el diagnóstico, ya que *Pseudomonas syringae* pv *tomato* no afecta al tabaco, y es su único hospedante el cultivo del tomate.

El grupo *syringae* del género *Pseudomonas* acoge a más de cuarenta bacterias fitopatógenas que producen diversos síntomas, definidas como necrosis, clorosis, agallas y chancros, y muestran un nivel alto de similitud en la biología, los factores de virulencia, tales como polisacaridos extracelulares, fitotoxinas, enzimas degradantes de células y fitohormonas [Gross, 1991;

Costacurta y Vanderleyden, 1995; Denny, 1995; Alfano y Collmer, 1996], y en el plano molecular [Scholz *et al.*, 1994]. Por otra parte, Lelliott *et al.* (1966) ubicaron varias especies, entre ellas a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, con comportamiento igual respecto a las pruebas de levano, oxidasa, pudrición en papa, arginina y la hipersensibilidad en hojas de tabaco (pruebas lopat) en el grupo *Ia*, y fue la diferencia entre ellos la especie de planta hospedante. La similitud en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas indica también la existencia de antígenos comunes, que no permiten que la inmunodifusión doble sea suficiente para diferenciar a especies de este grupo [Prestes *et al.*, 1998].

La metionina sulfoximina provoca en las hojas de tabaco lesiones necróticas, similares a las causadas por la tabtoxina de la bacteria [Braun, 1955]. Por ser un compuesto químico simple y cuantificable se ha utilizado como modelo para el estudio de la enfermedad fuego salvaje [Carlson, 1973; Basulto *et al.*, 2004] (Fig. 3).

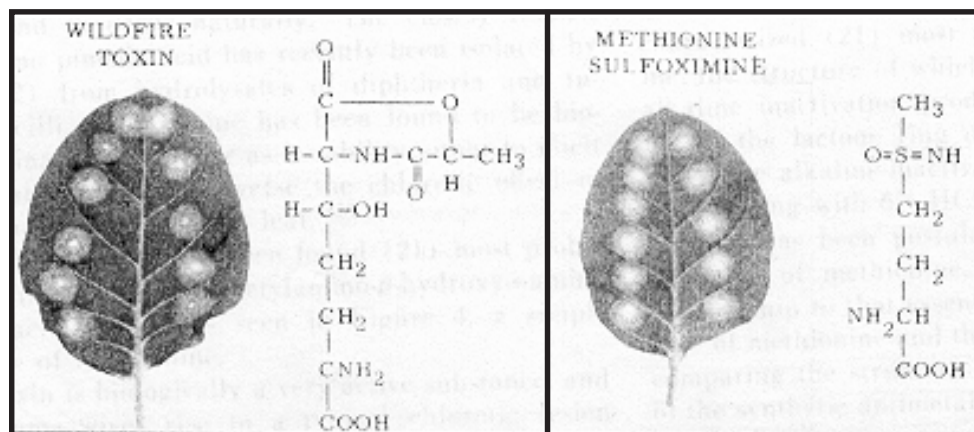


Figura 3. Comparación de la actividad biológica en hojas de tabaco de la tabtoxina (izquierda) y la sulfoximina de metionina (derecha) [tomada de Braun, 1955].

Definida como un hapteno, molécula que no es capaz de generar una respuesta inmune por sí sola, pudo contribuir, unida al microorganismo transportador mediante el procedimiento descrito, al desarrollo de anticuerpos para la tabtoxina, por lo que los resultados en el presente estudio aportan elementos a favor de la posibilidad del uso de la sulfoximina de metionina en el desarrollo de herramientas para el diagnóstico del patógeno.

CONCLUSIONES

- La metionina sulfoximina, conjugada con *Pseudomonas syringae* pv *tomato* como microorganismo transportador, condujo al desarrollo de sueros que pueden reconocer a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*.

REFERENCIAS

- Alfano, J. B.; A. Collmer: «Bacterial Pathogens in Plants: Life up Against the Wall», *Plant Cell* 8:1683-1698, 1996.
- Basulto, A.; M. Stefanova; H. García: «Efecto de metionin sulfoximina en tejido foliar de *Nicotiana tabacum*», *Cubatabaco* 5 (2):13-18, 2004.
- Bender, C. L.; F. Alarcón-Chaidez; D. C. Gross: «*Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases», *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (2):266-292, 1999.
- Braun A. C.: «A Study on the Mode of Action of the Wildfire Toxin», *Phytopathology* 45:659-664, 1955.
- Carlson P. S.: «Methionine Sulfoximine-Resistant Mutants of Tobacco», *Science* 180:1366-1368, 1973.
- Costacurta, A.; J. Vanderleyden: «Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria», *Crit. Rev. Microbiol.* 21:1-18, 1995.
- Denny, T. P.: «Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis», *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:173-197, 1995.
- Gross, D. C.: «Molecular and Genetic Analysis of Toxin Production by Pathovars of *Pseudomonas syringae*», *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:247-278, 1991.
- Lelliot, R. A.; E. Billing; A. C. Hayward: «A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic *Pseudomonads*», *J. Appl. Bacteriology* 29:470-489, 1966.
- Lucas G. B.: *Diseases of tobacco*, Biologycal Consulting Associated, Raleigh, NC, EE.UU., 1975.
- Prestes, E. B.; I. M. G. Almeida; L. O. S. Beriam; V. A. Malavolta Jr.; T. Yano: «Variabilidad entre aislados de *Pseudomonas* patogenicos ao pepino», *Summa Phytopathologica* 24:210-215, 1998.
- Scholz, B. K.; J. L. Jakobek; P. B. Lindgren: «Restriction Fragment Length Polymorphism Evidence for Genetic Homology Within a Pathovars of *Pseudomonas syringae*», *Applied and Environmental Microbiology* 60 (4):1093-1100, 1994.
- Shoemaker, P. B.: «Foliar Diseases Caused by Bacteria», *Compendium of Tobacco Diseases*, The American Phytopathology Society, APS Press, EE.UU., 1990.
- Turner, J. G.; R. R. Taha; J. Debbage: «Effects of Tabtoxin on Nitrogen Metabolism», *Physiologia Plantarum* 67 (4):649-653, 1986.
- Turner, J. G.: «Inhibition of Photosynthesis in *Nicotiana tabacum* Leaves Treated with Tabtoxin and its Relation to Pigment Loss», *Physiologia Plantarum* 74 (3):549-555, 1988.
- Woolley, D. W., G. Schaffner; A. C. Braun: «Isolation and Determination of Structure of a New Amino Acid Contained Within the Toxin of *Pseudomonas tabaci*», *J. Biol. Chem.*, 198,807-813, 1952.