



Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

**“Desarrollo de nuevos métodos moleculares
para la detección de la bacteria fitopatógena
Clavibacter michiganensis subsp.
michiganensis causante del cancro
bacteriano en tomate”**



Valentina Croce Paullier

Tutora: Dra. María Inés Siri

Co-tutora: Dra. María Julia Pianzzola

Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias,
Facultad de Química, Universidad de la República
Setiembre, 2012

RESUMEN

El cancro bacteriano es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el mundo. Se considera una enfermedad poco frecuente pero severa y de gran importancia económica. El agente causal de esta enfermedad actualmente se clasifica como *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Cmm). Esta bacteria se presenta de manera esporádica, pero cuando lo hace puede llegar a ser muy destructiva por la capacidad que tiene de diseminarse fácilmente. El diagnóstico precoz de Cmm juega un papel fundamental en varias de las medidas que involucra el control de la enfermedad. Las semillas infectadas constituyen la fuente primaria de inóculo y son responsables de la ocurrencia de brotes severos de infección. Se requieren muy bajos niveles de contaminación de la semilla para iniciar una epidemia importante, lo que resalta la necesidad de contar con métodos confiables y de alta sensibilidad para realizar un control efectivo de la enfermedad. En el presente trabajo, en una primera instancia, se procedió a confirmar la identidad de algunas cepas uruguayas de Cmm aisladas a partir de plantas sintomáticas. Para ello, se utilizaron métodos moleculares básicos y ensayos de patogenicidad. En una segunda etapa se desarrolló un método molecular basado en PCR a tiempo real (Q-PCR) aplicable a la detección del patógeno en semillas de tomate. Primero, se optimizó el método de detección para lo cual se evaluaron varias mezclas de reacción comerciales y se comparó la sensibilidad de detección sobre diluciones seriadas de ADN genómico y de un cultivo puro de Cmm. Se seleccionó la mezcla de reacción *Quanti-Tec* (Qiagen), con la cual se logró detectar hasta 0,1 pg/μl de ADN y 10³ ufc/ml, respectivamente. Para aumentar la sensibilidad de detección en el extracto vegetal se incorporó una etapa de enriquecimiento de la muestra previo a la amplificación por Q-PCR. De esta manera, se optimizó un método de BIO-Q-PCR para la detección de Cmm en muestras de semilla de tomate. Para ello, se evaluaron diferentes condiciones de la etapa de enriquecimiento (medios de cultivo y tiempo de incubación) para la detección del patógeno. Posteriormente, se comparó la detección de Cmm en semilla de tomate mediante Q-PCR directa y BIO-Q-PCR. Así, se evaluó la sensibilidad de ambos métodos mediante el análisis de diluciones seriadas en muestras de semilla artificialmente infectadas. Los resultados indican que la detección en semilla por Q-PCR directa solo es posible cuando las concentraciones del patógeno son altas (10⁵ ufc/g de semilla). Por otro lado, se comprobó que la BIO-Q-PCR mejora notablemente la sensibilidad de detección de Cmm en muestras de semilla, logrando detectar hasta 55 ufc/g de semilla. Por último, el método desarrollado se aplicó a la detección de Cmm en lotes de semilla nacionales de diferentes variedades y orígenes. La implementación de esta herramienta de diagnóstico significa un importante aporte para la generación de semilla de tomate nacional de alta calidad y contribuye a evitar la diseminación de esta importante enfermedad en el cultivo de tomate en nuestro país.

ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
μl	microlitro
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i>
Cq	valor umbral de ciclo
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
cv.	cultivar
DNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
EtOH	etanol
ES	extracto de semilla
g	gramo
hs	horas
IPA	Isla de patogenicidad
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kb	kilobases
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramos
nm	nanómetros
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	picogramos
PM	peso molecular
pmol	picomol
Q-PCR	<i>quantitative polimerase chain reaction</i>
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
seg	segundos
SF	suero fisiológico
subsp.	Subespecie
TE	Buffer Tris EDTA
Tm	temperatura de fusión
ufc	unidad formadora de colonia
UV	ultravioleta

CONTENIDOS

1 - INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 El cultivo de tomate.....	- 2 -
1.2. Cancro bacteriano del tomate.....	- 4 -
1.3. Generalidades del patógeno	- 10 -
1.4. Diagnóstico y detección.....	- 14 -
1.5 Situación en Uruguay.....	- 20 -
1.6 Hipótesis de trabajo.....	- 20 -
2- OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO	- 21 -
2.1 Objetivo general	- 22 -
2.2 Objetivos específicos	- 22 -
2.3 Estrategia de trabajo	- 22 -
3- MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 24 -
3.1 Cepas utilizadas	- 25 -
3.2 Ensayos de patogenicidad	- 25 -
3.3 Caracterización molecular de las cepas de Cmm	- 26 -
3.4 Detección de Cmm mediante Q-PCR.....	- 29 -
4- RESULTADOS.....	- 34 -
4.1 Ensayos de patogenicidad	- 35 -
4.2 Caracterización molecular de las cepas de Cmm	- 36 -
4.3 Detección de Cmm mediante Q-PCR.....	- 40 -
5 - DISCUSIÓN	- 50 -
5.1 Pruebas de patogenicidad	- 51 -
5.2 Identificación de las cepas por métodos moleculares	- 51 -
5.3 Detección de Cmm mediante Q-PCR.....	- 51 -
6 – CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	- 56 -
6.1 Conclusiones.....	- 57 -
6.2 Perspectivas.....	- 57 -
7 – APÉNDICE.....	- 58 -
7.1 Medios de cultivo	- 59 -
7.2 Reactivos.....	- 61 -
7.3 Tablas de valores de Cq de las reacciones de Q-PCR	- 63 -
8- BIBLIOGRAFÍA	- 66 -

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 El cultivo de tomate

1.1.1 Generalidades

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia de las solanáceas. *L. esculentum* es la especie más cultivada y posee un gran número de especies silvestres relacionadas. El tomate es originario de América del Sur, entre las regiones de Chile, Ecuador y Colombia, pero su domesticación se inició en el sur de México y norte de Guatemala. Con la llegada de los españoles, su cultivo se expandió al continente europeo y de ahí a todo el mundo. Los italianos fueron los primeros en cultivar el tomate y probablemente los primeros que lo utilizaron en la alimentación humana, a mediados del siglo XVIII. Después de haber llegado a Inglaterra, fue llevado a los Estados Unidos, donde su consumo como fuente de alimento ocurrió aproximadamente en 1850, y a partir de esta fecha comenzó a tener mayor interés científico y agronómico. Sólo a partir del siglo XIX adquirió gran importancia económica mundial, hasta llegar a ser junto con la papa, la hortaliza más difundida y predominante del mundo (Jaramillo *et al.*, 2007).

En cuanto a sus propiedades nutricionales, es una rica fuente de vitaminas A, B1, B2, B6, C y E, y de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. Tiene un importante valor nutricional ya que incluye proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico. Además, es rico en licopeno (pigmento que le proporciona su característico color rojo), el cual es un antioxidante muy potente, que se ha demostrado que puede prevenir e incluso combatir el cáncer. También estimula el sistema inmune lo cual ayuda a detener las enfermedades degenerativas (Jaramillo *et al.*, 2007).

1.1.2 Producción a nivel mundial

El cultivo del tomate se realiza para consumo en fresco (tomate de mesa) y para propósitos industriales (pastas, concentrados, salsas, etc.), destinándose para el consumo en fresco el 75% de la producción mundial y el 25 % restante para la industria. China, India, Turquía, Egipto y Estados Unidos son los 5 países responsables del 57% de la producción mundial de tomate y el 55% del área cosechada (FAOSTAT data, 2009). China produce el 26% del volumen mundial para el consumo en fresco, mientras que Estados Unidos (principalmente California) produce el 35% del volumen mundial para la industria (Tlatilpa, 2010).

Tabla 1-1. Principales países productores de tomate en el mundo.

Fuente: FAOSTAT data, 2009

País	Producción (millones de toneladas/año)	Proporción relativa en el mundo (%)
China	30,1	26
EE.UU	12,4	11
Turquía	8,0	7
India	7,6	7
Egipto	6,8	6

1.1.2 Producción en Uruguay

En Uruguay, el tomate representa el segundo cultivo hortícola (luego de la papa), en términos de volumen físico y económico de la producción. La producción total de tomate en la última zafra relevada (2010) fue de 39.329 toneladas en una superficie de 651 hectáreas. La mayor parte de la producción se realiza en superficies pequeñas (promedio de 0,6 ha/productor) con un gran componente de mano de obra familiar. El cultivo nuclea a 1150 productores, de los cuales para la mayoría es una de las principales fuentes de ingreso (Tabla 1-2, MGAP-DIEA, 2011).

El tomate para consumo en fresco se cultiva tanto a campo como bajo cubierta. Los cultivos protegidos de tomate están presentes en las dos zonas de producción (Sur y Litoral Norte). La producción bajo cubierta continúa en aumento y representó en esta zafra el 69% del total de tomate de mesa. Los cultivos a campo están ubicados principalmente en la *Zona Sur*, son cultivos de estación y su producción se da durante la zafra de verano - otoño. La *Zona Litoral Norte* es la principal productora de cultivos producidos a contra estación (para oferta en invierno y primavera). En el año 2010 esta zona aportó 22.930 toneladas, el 58% de la producción total anual. El rendimiento promedio de esta zona en cultivo protegido fue el más alto registrado en las últimas cinco zafras, superando las 150 toneladas por hectárea (Tabla 1-2; Figura 1-1). El tomate para industria o tomate perita se cultiva principalmente en la *Zona Sur*, en condiciones de campo (MGAP-DIEA, 2011).

Tabla 1-2. Cultivo de tomate en Uruguay. Número de productores, superficie, producción y rendimiento; según zona y modalidad de producción. Zafra 2009-2010. Fuente: MGAP/DIEA-DIGEGRA, Encuesta hortícola 2010

Zona	Modalidad	Productores	Superficie (há)	Producción (ton)	Rendimiento (ton/há)
Sur	A campo (perita)	305	211	5.373	25,5
Sur	A campo (de mesa)	376	203	6.236	30,7
Sur	Protegido	228	53	4.790	90,4
Norte	A campo (industria)	5	35	609	17,5
Norte	Protegido	236	149	22.321	149,8
Total		1150	651	39.329	

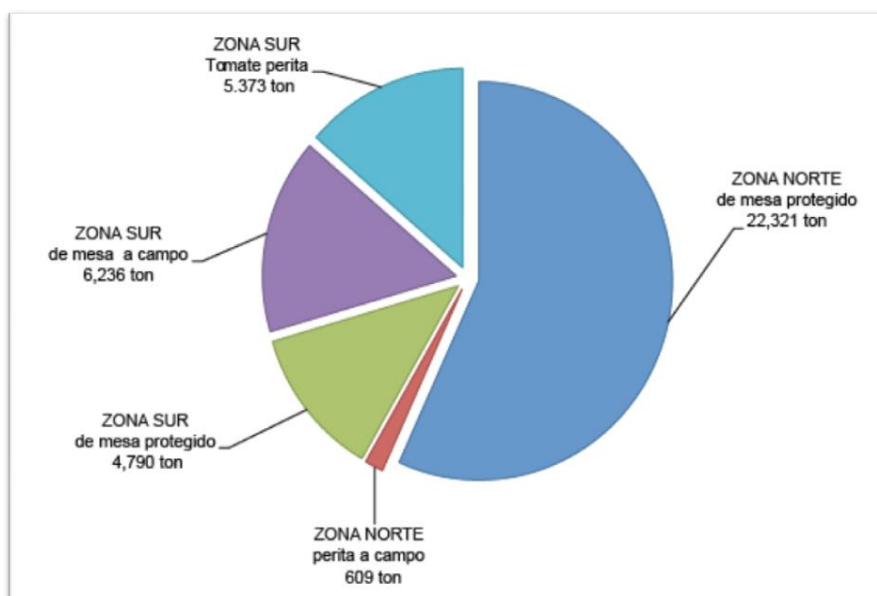


Figura 1-1. Gráfico de distribución de la producción de tomate en las principales zonas de Uruguay. Fuente: MGAP/DIEA-DIGEGRA, Encuesta hortícola 2010

1.2. Cancro bacteriano del tomate

1.2.1 Antecedentes de la enfermedad

El cancro bacteriano es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al cultivo de tomate. La enfermedad fue detectada por primera vez en 1909 en Michigan, EE.UU y desde entonces ha sido reportada en todas las regiones en que se cultiva tomate del mundo (De León *et al.*, 2011). Se considera una enfermedad poco frecuente pero severa y de gran importancia económica (Chang *et al.*, 1991). Puede encontrarse en varios miembros de la familia de las solanáceas pero el tomate es el único cultivo afectado donde las pérdidas son significativas desde el punto de vista económico (Gleason *et al.*, 1993).

El agente causal de esta enfermedad fue denominado por primera vez por Erwin F. Smith como *Bacterium michiganense*, y tuvo luego varios intentos de renombramiento siendo conocido hasta 1983 como *Corynebacterium michiganense*. En la década de 1980, gracias a nuevos conocimientos acerca de la composición de su pared celular, el patógeno fue reclasificado, y actualmente se denomina *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Cmm) (Gleason *et al.*, 1993).

1.2.2 Importancia y distribución

Desde el primer reporte de la enfermedad en EE.UU en 1909, Cmm se ha extendido por el mundo y ha causado importantes pérdidas tanto a nivel de campo como de invernadero, ya sea matando a plantas jóvenes o desfigurando los frutos (Borboa Flores *et al.*, 2009).

Esta bacteria se presenta de manera esporádica, pero cuando lo hace puede llegar a ser muy destructiva por la capacidad que tiene de diseminarse fácilmente.

Cuando se presenta puede acabar con todas las plantas en parcelas o invernaderos en cuestión de semanas. Como se observa en la Figura 1-2, el patógeno se encuentra distribuido prácticamente en todas las zonas donde se cultiva tomate en el mundo (EPPO, 2010).

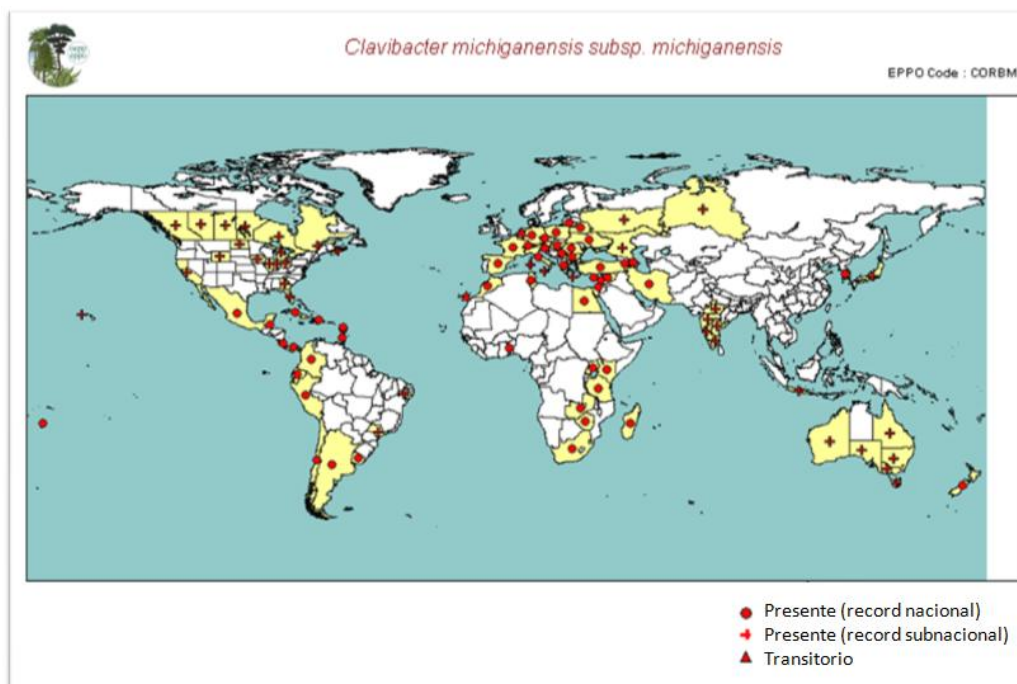


Figura 1-2. Mapa de distribución de Cmm. Fuente: EPPO, 2010

Entre el año 2000 y 2010, han habido varios reportes de cancro bacteriano en diversos países de Asia, Europa, América del Norte y Sudamérica (De León *et al.*, 2011). Algunos de los países donde se han reportado grandes epidemias de cancro bacteriano son: Israel, Japón, México y en Islas Canarias, España (Kleitman *et al.*, 2008; De León *et al.*, 2008; Borboa Flores *et al.*, 2009).

El cancro bacteriano se ha convertido en un problema serio en las regiones donde se cultiva tomate debido a que disminuye la producción y la calidad de los frutos, además de que acorta los ciclos del cultivo al devastarlos cuando encuentra las condiciones favorables. En promedio puede ocasionar pérdidas que van desde el 80 al 100 %, y en invernaderos puede acabar con el cultivo en cuestión de días (Tlatilpa, 2010).

1.2.3 Sintomatología

El cancro bacteriano del tomate es una enfermedad con un amplio rango de síntomas como la pérdida de áreas fotosintéticas, marchitamiento unilateral, retraso del crecimiento, canchales abiertos en el tallo, defoliación y muerte prematura. Los síntomas pueden ser sistémicos o localizados dependiendo del sitio donde se da la infección (Figura 1-3). Además del sitio de infección, los síntomas también dependen de la edad de la planta, de la susceptibilidad del cultivar y de las condiciones

ambientales. Dada esta variabilidad, no es efectivo basarse en los síntomas para diagnosticar la enfermedad (Gleason *et al.*, 1993).

Cuando la infección ocurre a través de heridas y estomas, o a través de semillas se llega a una infección sistémica que culmina en marchitamiento y cancro. También pueden ocurrir infecciones latentes que no muestran síntomas o los mismos son muy leves. Las plantas con infecciones de este tipo, constituyen una fuente de semillas contaminadas, y son la mayor causa de nuevos brotes de infección (Gartemann *et al.*, 2008).

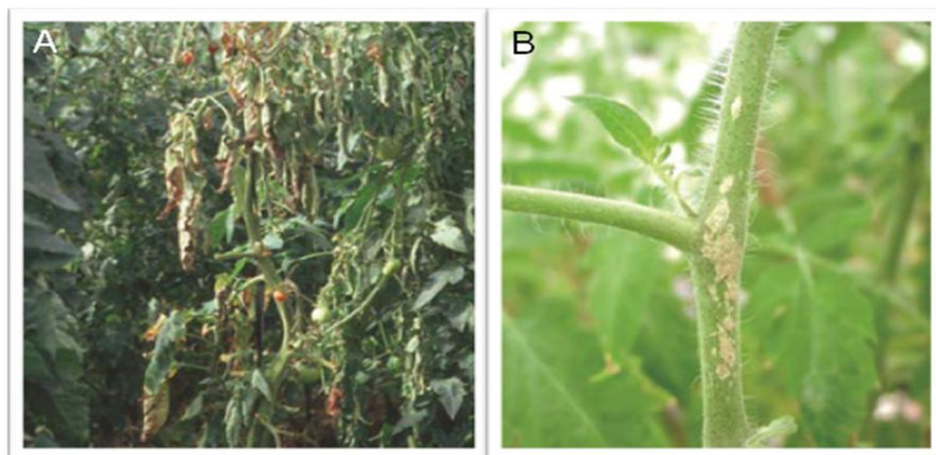


Figura 1-3. Síntomas provocados por infección sistémica (A) o localizada (B). A: marchitamiento generalizado; B: lesiones blancas similares a ampollas en tallo y pecíolo (De León *et al.*, 2011)

Las semillas contaminadas usualmente dan lugar a plántulas aparentemente sanas, ya que los síntomas aparecen cuando las plantas están maduras. Luego de la infección, existe un largo período latente antes de que aparezca cualquier síntoma. Bajo condiciones de invernáculo, el primer síntoma es el marchitamiento reversible de las hojas. Las hojas pueden mostrar primero áreas blancas y luego marrones necróticas. El marchitamiento rápidamente se vuelve irreversible y la totalidad de la planta se seca. En el campo, el primer síntoma es la desecación de los bordes de las hojas, principalmente las de más abajo. La planta se seca lentamente, por lo general sin mostrar marchitamiento. En etapas más avanzadas, aparecen pequeñas pústulas blancas en los vasos de las hojas y pecíolos. Pueden aparecer rayas marrones en tallos y pecíolos; las cuales pueden dividirse exponiendo cavidades amarillentas a rojizas-amarronadas, mostrando un síntoma semejante al cancro (Figura 1-4A) (EPPO, 2010).

Los frutos no maduran y caen, o lo hacen de manera desigual. Pueden mostrar unos puntos característicos denominados “*bird eye spots*” (Figura 1-4B). Estos puntos, al inicio son ligeramente elevados y blancos, pero luego forman centros de color marrón claro, rugosos, y rodeados por un halo blanco (EPPO, 2010).

En tallos cortados, pecíolos y pedúnculos, particularmente en sus uniones, se observa una decoloración blanca-amarillenta o roja-amarronada del tejido vascular y médula, y se evidencian cavidades dentro de la médula (Figura 1-3C). Estas decoloraciones sólo son visibles en etapas avanzadas de la enfermedad (EPPO, 2010).

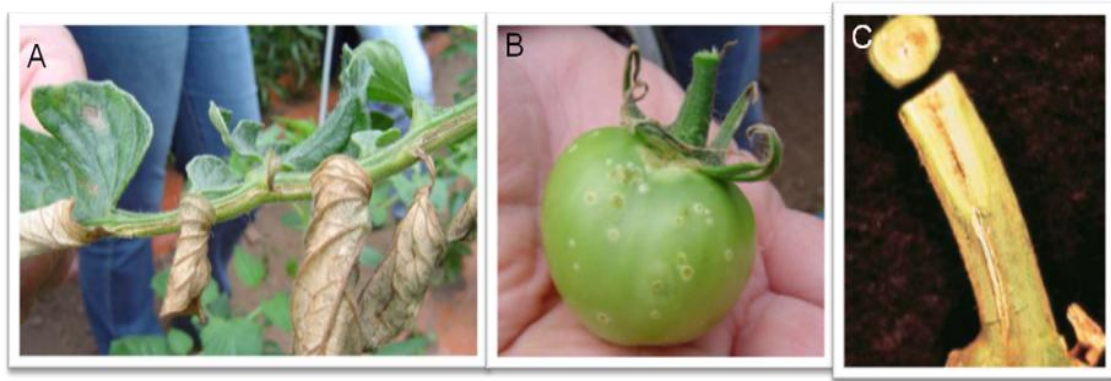


Figura 1-4. Síntomas de cancro bacteriano en tomate. A: Cancros abiertos en el tallo (Sandoval, 2004); B: “bird eye spots” en el fruto (Sandoval, 2004); y C: invasión en el xilema (Agrios, 2005).

Los síntomas del cancro bacteriano son usualmente confundidos con marchitamientos causados por *Verticillium* o *Fusarium spp.* (EPPO, 2010).

1.2.4 Ciclo de la enfermedad

La principal fuente de diseminación de la enfermedad es por semilla infectada (Figura 1-5, A), lo que ha contribuido a la distribución de la enfermedad en el mundo. El patógeno también puede diseminarse a través de suelo contaminado arrastrado por el viento, o de manera mecánica por las manos, herramientas de trabajo, poda y otras labores culturales (Figura 1-5, B) (Sandoval, 2004). La mayoría de las infecciones secundarias ocurren generalmente por la penetración de la bacteria a través de heridas en las raíces, tallos, hojas, y frutos durante el trasplante (Figura 1-5, C). Una vez dentro de la planta, la bacteria invade el sistema vascular, se traslada y multiplica en los vasos del xilema (Figura 1-5, D), y sale de ellos por el floema, médula y corteza, donde forman grandes cavidades que resultan en cancros (Agrios, 2005). Un estudio usando mutantes bioluminiscentes de Cmm permitió la visualización de la dinámica de la colonización bacteriana en la transmisión de semillas y la translocación de Cmm en plantas injertadas. Los resultados demostraron la ocurrencia de contaminación a través de los materiales utilizados para los injertos. Se observó la formación de agregados de la bacteria en hipocotíleos y cotiledones que luego se translocan en ambas direcciones desde la unión del injerto (Xu *et al.*, 2010). Una vez colonizada la planta, se da la aparición de los síntomas de la enfermedad (Figura 1-5, E).

Cmm puede sobrevivir por largos períodos en los restos de plantas infectadas (Figura 1-5, F). Su sobrevivencia varía según el clima, el tipo de suelo y microflora del suelo (Fatmi y Schaad, 2002). Se ha reportado que el patógeno también puede sobrevivir en hospederos alternativos, incluyendo especies solanáceas y no solanáceas (Gleason *et al.*, 1993).

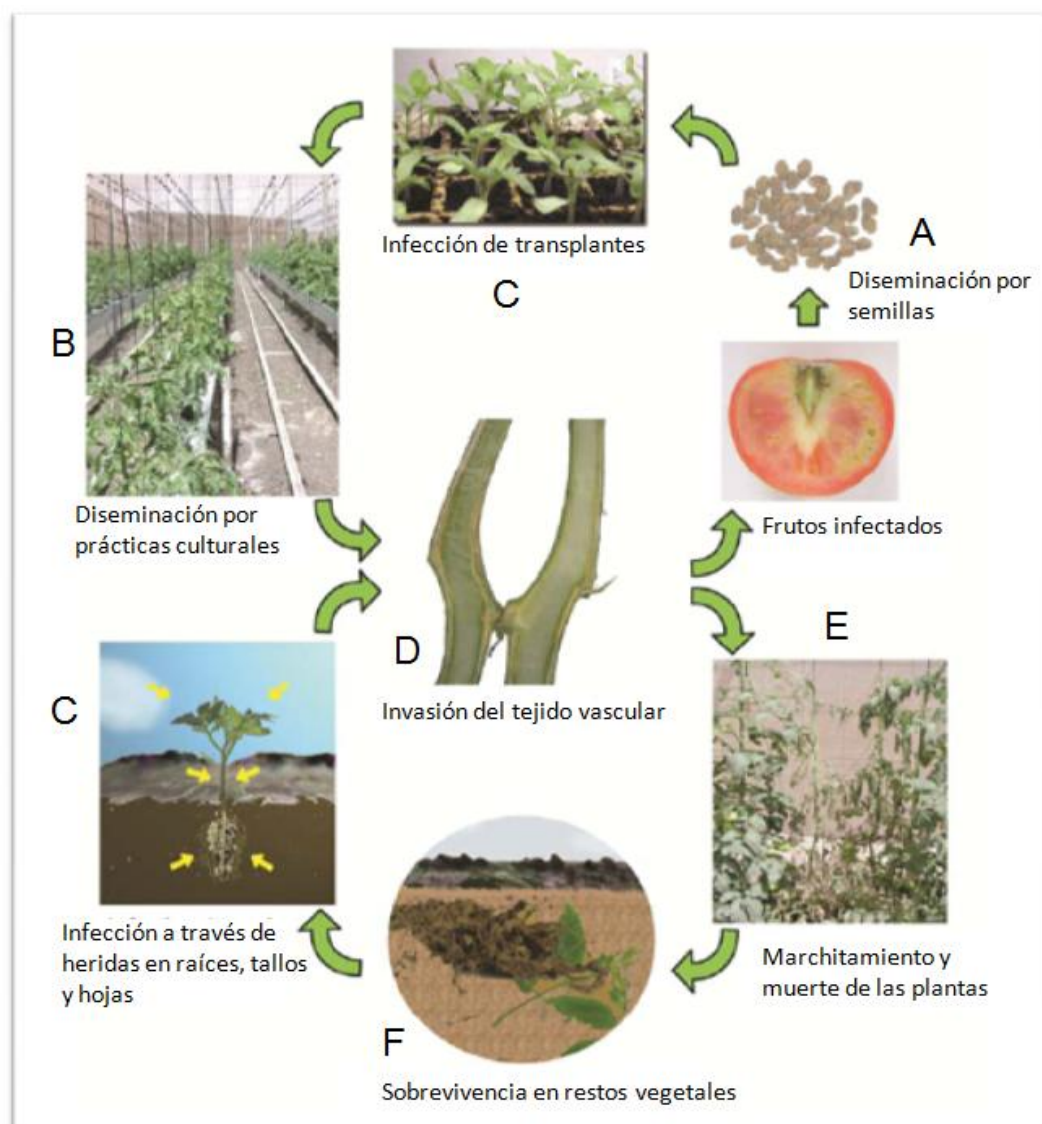


Figura 1-5. Ciclo de la enfermedad. A: Diseminación por semillas; B: Diseminación por prácticas culturales; C: Infección a través de heridas en raíces, tallos y hojas; D: invasión y colonización del tejido vascular; E: Aparición de síntomas (marchitamiento) y muerte de la planta; F: sobrevivencia del patógeno en restos vegetales. Figura adaptada de De León *et al.*, 2011.

1.2.5 Epidemiología

La cantidad de Cmm en semillas naturalmente infectadas es variable, pero se ha reportado que va desde 10^2 a 10^4 ufc/semilla (Fatmi y Schaad, 1988; Hadas *et al.*, 2005), y se sugiere que una población de 10^2 ufc/semilla es el nivel límite para la transmisión del patógeno. A su vez, se ha demostrado que una semilla infectada en 10.000 (0,01%) es capaz de iniciar una epidemia bajo condiciones favorables (De León *et al.*, 2011).

Hadas *et al.* (2005) encontraron una alta correlación entre el grado de contaminación de la semilla (ufc/g) y la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad no depende únicamente del inóculo inicial presente en las semillas, ya que Cmm es capaz de transmitirse mecánicamente por prácticas culturales

durante la producción de trasplantes. Este hecho tiene un gran efecto en la incidencia de la enfermedad en el campo (De León *et al.*, 2011). Una vez que las plántulas son trasplantadas, ya sea al invernáculo o en el campo, la presencia de unas pocas plantas infectadas, resultan en altas poblaciones de Cmm, lo cual sirve como fuente de inóculo para infecciones secundarias.

1.2.6 Estrategias de control

Hasta el momento, no existe ningún cultivar de tomate resistente a Cmm, ni un control químico efectivo disponible (Xu *et al.*, 2010). Por lo tanto, la mejor estrategia es realizar un control preventivo de la enfermedad, evitando que el patógeno entre en contacto con el cultivo.

El uso de semillas sanas es la principal medida para controlar la enfermedad (Sandoval, 2004; Agrios, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008). También se ha mostrado una substancial reducción de infecciones por tratamiento químico o térmico de las semillas. Estos tratamientos son efectivos en reducir la población de Cmm, pero no existe ningún método que asegure la completa erradicación del patógeno de la semilla de tomate sin afectar su germinación. Una vez que la enfermedad se ha establecido en el cultivo, se recomienda la adopción de prácticas culturales adecuadas tendientes a reducir el riesgo de diseminación de la enfermedad y la ocurrencia de nuevos brotes de infección (De León *et al.*, 2011). Deben tomarse medidas estrictas de higiene como la erradicación de plantas infectadas, la destrucción de residuos del cultivo y desinfección de estructuras y equipamiento (EPPO, 2011). La destrucción de plantas infectadas, disminuye la sobrevivencia del patógeno, ya que esta depende de su asociación con restos del material vegetal (Gartemann *et al.*, 2003). Otra práctica cultural recomendada es la rotación del cultivo a un campo donde no se haya plantado tomate por 2-3 años (Fatmi y Schaad, 2002).

En cuanto al control químico, se puede recurrir a aplicaciones preventivas de productos cúpricos como oxiclورو de cobre, óxido de cobre o hidróxido de cobre. Una vez que el problema está presente, estas ayudarán a reducir la velocidad de diseminación de la enfermedad. Los productos químicos utilizados para el manejo de esta bacteria solo actúan sobre las células que se encuentran en la superficie, reduciendo el riesgo de infección y diseminación. Los productos cúpricos, tienen buen efecto bactericida, pero son incapaces de penetrar a la planta para eliminar la bacteria y eliminar la infección, por lo que solo se recomiendan como preventivos o como selladores de heridas cuando se realizan podas o cae granizo (Sandoval, 2004).

El uso de antibióticos no ha mostrado buena eficiencia en el control de Cmm, y además en Uruguay están prohibidos en los programas de producción integrada (Banchero *et al.*, 2002). Se ha reportado el uso de tratamientos combinados que han mostrado cierta eficiencia en el control de la enfermedad. Por ejemplo, la aplicación de cobre y estreptomina, puede reducir poblaciones epifíticas y algunos síntomas. También se ha observado un efecto sinérgico cuando el cobre es combinado con el

fungicida Mancozeb y con compuestos quelantes de cobre (De León *et al.*, 2008). En Uruguay, el uso de productos que contienen Mancozeb solo está permitido en mezcla con cúpricos para el caso en que se detecte la presencia de la enfermedad (Banchero *et al.*, 2002).

Cuando la producción se realiza en cultivo protegido en invernaderos, se recomienda antes de iniciar el cultivo hacer una desinfección profunda de los postes, vigas y cualquier estructura que pueda ser reservorio del patógeno. Esto es particularmente importante si la enfermedad se ha presentado antes en el invernadero. También es fundamental como medida de control, la higiene dentro del cultivo, y la desinfección de herramientas, manos, y útiles de trabajo (Sandoval, 2004).

Otras medidas, como el control biológico con bacterias antagonistas, compost, activadores vegetales para la inducción de resistencia, extractos o aceites vegetales, así como la solarización; están siendo investigadas, pero actualmente están lejos de proporcionar un control exitoso de la enfermedad en el cultivo de tomate (De León *et al.*, 2011).

1.2.7 Medidas fitosanitarias

Dado que la prevención, mediante el uso de semillas sanas es la medida de control más eficiente, los países han adoptado medidas cuarentenarias para garantizar que los lotes de semilla comerciales están libres del patógeno, o que al menos tengan un nivel de contaminación menor a un límite aceptable (De León *et al.*, 2011).

La EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) ha calificado a Cmm como una plaga en cuarentena del tipo A2, lo cual quiere decir que se encuentra presente en algunas partes de la región y que está siendo oficialmente controlada. La introducción y movimiento de las semillas de tomate dentro de la Unión Europea, requiere una declaración oficial que asegure que las semillas estén sanas. Los lotes de semillas deben ser testeados con un método apropiado en una muestra representativa y deben encontrarse libre de la bacteria (EPPO, 2011).

En Uruguay, Cmm no figura como plaga cuarentenaria según las disposiciones establecidas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Por lo tanto actualmente no se realiza ningún control fitosanitario a las semillas de tomate que ingresan al país.

1.3. Generalidades del patógeno

1.3.1 Taxonomía

El género *Clavibacter* pertenece a la clase Actinobacteria del dominio Bacteria, orden Actinomycetes, familia Microbacteriaceae; y está representado por dos especies: *C. michiganensis* y *C. xyli*. La primera está subdividida en 5 subespecies, todas son patógenas (Tabla 1-2) y se diferencian en rasgos fenotípicos como pigmentación, crecimiento en medios diferenciales, perfiles proteicos, reacciones serológicas; así

como también en su rango de hospederos. Algunos trabajos empleando el gen de ARNr 16S han demostrado que las 5 subespecies están muy relacionadas filogenéticamente (Louws *et al.*, 1998).

Tabla 1-3. Enfermedades ocasionadas por las distintas subespecies de *C. michiganensis* en sus hospederos. Fuente: Gartemann *et al.*, 2003.

Especie patógena	Enfermedad ocasionada	Hospedero
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Necrosis bacteriana (<i>Ring rot</i>)	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Marchitamiento y Roya	Maíz (<i>Zea mays</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>tesselarius</i>	Pecas y puntos en hojas	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	Marchitamiento y retraso de crecimiento	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Cancro bacteriano	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)

1.3.2 Características generales

Cmm es un bacilo gram positivo, de crecimiento aeróbico, no móvil, productor de cápsula y que no produce esporas. Además presenta las pruebas de oxidasa y ureasa negativas (Agrios, 2005).

Esta bacteria puede ser aislada en un medio nutriente como Agar caldo-nutriente extracto de levadura (NBY) o extracto de levadura-dextrosa-CaCO₃ (YDC) (Schaad, 2001), donde forma colonias de color amarillo, mucoides, lisas, brillantes, y redondas con el borde entero. La temperatura óptima de crecimiento es de 26°C, sin embargo presenta un rango de temperaturas dentro del cual se puede desarrollar que va desde los 2°C a los 34°C. Esto refleja su capacidad de adaptación a una diversidad de condiciones (Sandoval, 2004).

1.3.3 Características generales del genoma de Cmm

En el año 2008, Gartemann *et al.* obtuvieron la secuencia completa del genoma de una cepa de Cmm (NCPPB382). La misma presenta un cromosoma circular de 3.298 Mb con un alto contenido en G+C (72,6%). Además, se identificaron dos plásmidos circulares: pCM1 (27,4 kb) y pCM2 (70,0 kb), los cuales presentan un bajo contenido en G+C (66,5 y 67,6 %, respectivamente) y contienen genes de patogenicidad esenciales para la virulencia de Cmm. El cromosoma de Cmm contiene un total de 2.984 secuencias codificadoras (CDS), de las cuales al 68% se le han asignado funciones biológicas.

También se identificaron aproximadamente 20 regiones con un bajo contenido en G+C distribuidas en el cromosoma de Cmm. Estas islas genómicas son específicas de Cmm y no están presentes en *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedinocus* (patógeno

de papa, muy relacionado filogenéticamente con Cmm). La mayor de estas regiones (129 kb) es la denominada región *chp/tomA*. Esta región se ubica cerca del sitio de inicio de la replicación del cromosoma y contiene genes que se ha demostrado que son necesarios para la virulencia. El resto de las regiones de bajo contenido en G+C son muy pequeñas (1 a 5 kb), y probablemente fueron adquiridas por transferencia horizontal de genes (Gartemann *et al.*, 2008).

Una característica destacada de Cmm es la presencia de numerosos genes codificadores de proteasas extracelulares. Se han identificado al menos 28 serín-proteasas pertenecientes a 3 familias diferentes. Una de ellas, llamada Pat-1 pertenece a la familia *Chp* y es necesaria para el desarrollo de los síntomas (marchitamiento), pero no lo es para la colonización de la planta de tomate. Las proteasas de serina tienen además un importante rol en la interacción Cmm-planta. Otra familia de serín-proteasas, las *ppa* están presentes en el cromosoma y una de ellas en el plásmido pCM1 (Gartemann *et al.*, 2008).

1.3.4 Genes de patogenicidad

Los plásmidos pCM1 y pCM2 contienen determinantes genéticos esenciales para la virulencia, en particular, para la inducción de síntomas durante las etapas tardías de una infección por Cmm (Gartemann *et al.*, 2003).

Uno de los genes de patogenicidad identificados es el gen *celA* que codifica para una β -1,4-endocelulasa y se encuentra en el plásmido pCM1. El producto génico, CelA, tiene 3 dominios: un dominio N-terminal catalítico glicosil-hidrolasa, un dominio de unión a celulosa, y un dominio C-terminal similar a las α -expansinas de plantas (proteínas involucradas en el proceso de extensión de la pared celular). Este último es esencial tanto para el desarrollo de los síntomas de marchitamiento como para la degradación de la celulosa. La celulasa participa en la provisión de nutrientes derivados de la pared celular vegetal y la degradación del tejido, en etapas avanzadas de infección (Gartemann *et al.*, 2008).

El otro factor de patogenicidad conocido es Pat-1, una serín-proteasa codificada por el gen *pat-1* que se encuentra en el plásmido pCM2. La introducción mediante ingeniería genética, de la región *pat-1* en cepas aisladas de Cmm libres de plásmidos, convierte a estas bacterias en patogénicas (Meletzus y Eichenlaub, 1991). Por otro lado, se determinó que Pat-1 es necesaria para el desarrollo de síntomas de marchitamiento en plantas de tomate, aunque no es requerida para las etapas de colonización. En el plásmido pCM2 se identificaron otros dos genes (*phpA* y *phpB*) que también codifican para serín-proteasas y que presentan una alta homología al gen *pat-1*. Sin embargo, a diferencia de *pat-1*, estos genes no son esenciales para la patogenicidad de Cmm (Dreier *et al.*, 1997).

Todas las funciones necesarias para la infección, colonización, y evasión de los mecanismos de defensa de la planta, se encuentran codificadas por genes del cromosoma. Esto fue demostrado, en estudios donde una cepa derivada de la cepa de

referencia NCPPB382, la cual no contiene los plásmidos, es capaz de colonizar plantas de tomate pero sin causar ningún síntoma de marchitamiento (Meletzus *et al.*, 1993).

La región *chp/tomA* es considerada una isla de patogenicidad (IPA) ya que se ha demostrado que una cepa carente de esta región es avirulenta e incapaz de colonizar efectivamente la planta de tomate. Esta región de 129 kb puede dividirse en 2 subregiones (Figura 1-6). La primera, denominada *chp*, tiene solo 44 genes que se les conoce su función (capacidad codificadora, 45%) mientras que la segunda, denominada *tomA*, tiene una densidad codificadora muy alta (96%). La subregión *chp*, contiene genes codificadores de varias serín-proteasas, y la subregión *tomA* contiene muchos genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, otros que codifican para glicosidasas, y el gen *tomA* (Kleitman *et al.*, 2008). Este último codifica a la tomatinasa, una enzima involucrada en la detoxificación de la α -tomatina, un alcaloide inhibidor del crecimiento producido por el tomate.

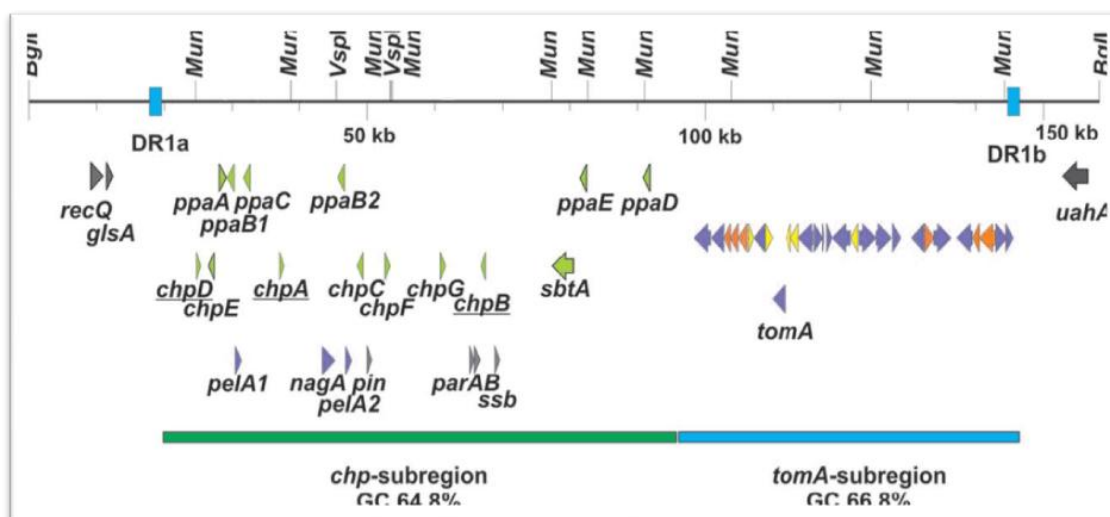


Figura 1-6. Esquema de las dos subregiones de la región *chp/tomA* rica en GC. (Gartemann *et al.*, 2008)

1.3.5 Interacción patógeno-planta. Mecanismo de infección

Una vez dentro de la planta, la bacteria invade el sistema vascular, se traslada y multiplica en los vasos del xilema donde se multiplica alcanzando altas densidades celulares (10^9 ufc/g de tejido vegetal). Durante esta etapa, la bacteria debe obtener los nutrientes necesarios del fluido del xilema, un ambiente muy ácido y pobre en nutrientes. En este ambiente, normalmente hay azúcares en baja concentración, mientras que están presentes altos títulos de ácidos carboxílicos (malato, citrato, fumarato, y succinato) (Gartemann *et al.*, 2003). En el genoma de Cmm se han identificado varios genes codificadores de transportadores específicos para carboxilatos que permiten que Cmm utilice estos compuestos (Gartemann *et al.*, 2008).

En etapas más avanzadas de infección, cuando la población bacteriana en los vasos de xilema es alta, las celulasa y otras enzimas hidrolizadoras de la pared celular

vegetal atacan las paredes celulares del xilema y las células parenquimáticas adyacentes, dando como resultado la degradación del tejido vegetal y el cancro (Figura 1-7). Esto provoca que haya una mayor proporción de azúcares, provenientes de la degradación de las paredes celulares del tejido vegetal, que quedan disponibles como nutrientes para la bacteria (Gartemann *et al.*, 2003).

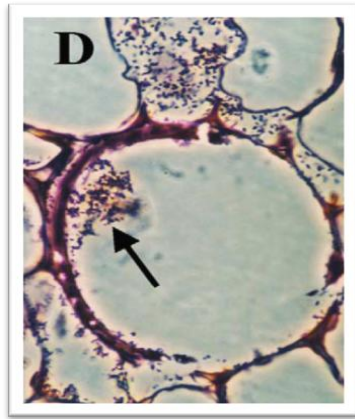


Figura 1-7. Imagen al microscopio de un corte a través de un vaso del xilema de una planta de tomate infectada con Cmm. La pared del vaso se encuentra parcialmente destruida por las enzimas bacterianas que permiten la diseminación de la bacteria a los tejidos adyacentes. La flecha indica un agregado de bacterias (Gartemann *et al.*, 2003).

En esta fase tardía de la infección también aparecen los típicos síntomas de marchitamiento de la planta. Los exopolisacáridos (EPS) y glicoproteínas producidos por bacterias, pueden interferir en la obstrucción del transporte de agua en los vasos del xilema (Dreier *et al.*, 1997). Los EPS tienen múltiples e importantes funciones biológicas: contribuyen a generar una matriz saturada de agua alrededor de la bacteria como protección contra la deshidratación, concentran minerales y nutrientes alrededor de la bacteria mediante la captación de compuestos tóxicos, previenen el reconocimiento de la bacteria por el sistema de defensa de la planta, entre otras. Los EPS podrían causar estrés hídrico, y por tanto ser responsables del desarrollo del marchitamiento en plantas de tomate (Gartemann *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que los EPS no son un factor de patogenicidad crucial en Cmm. Los EPS producidos por Cmm no están directamente involucrados en la virulencia, ya que ni la colonización del tejido vegetal, ni la aparición de síntomas, se ven afectados en una cepa con fenotipo mutante no productora de EPS (Berpohl *et al.*, 1996).

1.4. Diagnóstico y detección

Los problemas fitosanitarios se han acrecentado debido en parte, a la falta de un diagnóstico certero y oportuno que permita a los productores manejar apropiadamente el impacto de las enfermedades. Tradicionalmente, la observación de síntomas por el técnico de campo o el propio productor ha sido la estrategia para diagnosticar y tratar las enfermedades. Esta práctica no es la más apropiada ya que diferentes patógenos pueden provocar enfermedades con sintomatología similar, o bien ésta puede deberse a la conjunción de un patógeno con algún factor abiótico, como toxicidad de agroquímicos o deficiencia/exceso de ciertos minerales del suelo

(Sandoval, 2004). Debido a que el diagnóstico correcto del agente causal del problema es clave para el manejo integrado de las enfermedades, actualmente se recomienda complementar la observación de síntomas con la implementación de técnicas de diagnóstico bioquímicas, microbiológicas y moleculares (Borboa Flores *et al.*, 2009).

El diagnóstico precoz de Cmm juega un papel fundamental en varias de las medidas que involucra el control integrado de la enfermedad. Las semillas infectadas constituyen la fuente primaria de inóculo y son responsables de la ocurrencia de brotes severos de infección (Tsiantos, 1987). El análisis de semillas es una herramienta esencial para el control de este patógeno, y además debe realizarse para cumplir con las medidas fitosanitarias internacionales enmarcadas en los programas de certificación de semillas. En el caso de Cmm, es una tarea muy complicada ya que la existencia de unas pocas células del patógeno en lotes de semillas comerciales, son suficientes para iniciar una epidemia en condiciones ambientales favorables (De León *et al.*, 2008). Además, las semillas de tomate infectadas no se pueden distinguir visualmente de las sanas, por lo que es necesario contar con métodos rápidos, seguros y de alta sensibilidad para la detección del patógeno en semillas contaminadas, especialmente en el comercio internacional.

1.4.1 Métodos de detección tradicionales

Los métodos convencionales utilizados para la detección e identificación de Cmm incluyen: cultivo en medios semiselectivos, ensayos bioquímicos, ensayos serológicos, y ensayos de patogenicidad. Sin embargo, dichos métodos tienen algunas limitantes, como la baja sensibilidad, falta de especificidad, y largos tiempos de espera de resultados (Zhao *et al.*, 2007).

Crecimiento en medios semiselectivos

Se han desarrollado varios medios semi-selectivos para el aislamiento de Cmm; entre ellos SCM (Fatmi y Schaad, 1988), mSCM (Waters y Bolkan, 1992), CNS (Gross y Vidaver, 1978) y D2ANX (Chun, 1982). Estos medios contienen como fuente principal de carbono; glucosa, manosa o sacarosa (según el medio); sales como fosfato de potasio y sulfato de magnesio; y antibióticos como cicloheximida, ácido nalidíxico y ácido nicotínico, los cuales le aportan selectividad al medio.

Fatmi y Schaad (2002) utilizaron el medio SCM obteniendo una sensibilidad de detección de 1 semilla infectada en 10.000. Sin embargo, el aislamiento de Cmm a partir de muestras de semillas es difícil porque se requieren períodos de incubación de más de 10 días y el crecimiento de Cmm puede ser inhibido por otros microorganismos presentes en la muestra, a pesar de ser un medio semi-selectivo (De León *et al.*, 2011).

Técnicas serológicas

La disponibilidad comercial de un antisuero para Cmm (Agdia, Inc., Elkhart, IN) permitió el uso de la técnica conocida como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para la detección del patógeno. El límite de detección de esta técnica es de

aproximadamente 10^3 ufc/ml (De León *et al.*, 2007). Las ventajas de este método son que permite la detección de Cmm en plantas asintomáticas y que es específico para este patógeno. Como contrapartida, el método no aporta información sobre la viabilidad del patógeno (Gleason *et al.*, 1993). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales para Cmm presentan mayor especificidad que los anticuerpos policlonales, debido a la presencia de antígenos reactivos en una gran diversidad de cepas de Cmm.

Otra técnica serológica utilizada es la inmunofluorescencia, la cual tiene un límite de detección de 10^3 ufc/ml (De León *et al.*, 2007). Esta técnica ha sido ampliamente criticada ya que presenta una baja especificidad debido a la ocurrencia de reacciones cruzadas (De León *et al.*, 2011).

Inmuno-aislamiento (*IMS-plating*)

Es una técnica que combina la serología con el crecimiento en medio con agar, mejorando tanto la selectividad como la sensibilidad del ensayo. Consiste en cubrir unas cuentas o barras de plástico con anticuerpos específicos para atrapar las células bacterianas de una muestra. Posteriormente, las cuentas con las células adheridas son separadas magnéticamente y plaqueadas en un medio adecuado (Gleason *et al.*, 1993). Este método fue aplicado para la detección de Cmm en semillas de tomate obteniendo un límite de detección de 1 a 10 ufc/ml de extracto de semillas (De León *et al.*, 2007).

Pruebas de patogenicidad

Los ensayos de patogenicidad son indispensables para confirmar la identidad de la mayoría de las bacterias fitopatógenas (Gleason *et al.*, 1993). Consiste en realizar la inoculación sobre el tallo de una planta de tomate de aproximadamente 4 semanas, con una aguja previamente sumergida en una suspensión de 10^8 células/ml. Estas plantas se mantienen a 29°C y los síntomas se registran entre 7 y 21 días después (Hadas *et al.*, 2005; Kleitman *et al.*, 2008).

1.4.2 Métodos moleculares

Los métodos basados en PCR son comúnmente usados en la detección e identificación de patógenos por su rapidez, especificidad y sensibilidad (Ozdemir, 2005). La implementación de estos métodos en análisis de rutina ha sido lenta, especialmente en programas de análisis de semillas. Sin embargo, recientemente las técnicas basadas en PCR han sido exitosas y se recomienda su inclusión en protocolos para análisis rutinarios (De León *et al.*, 2011).

Se han reportado varios métodos de detección basados en PCR aplicables a la detección de Cmm en semilla y transplantes asintomáticos (Gitaitis *et al.*, 1991; Dreier *et al.*, 1995; Biggerstaff *et al.*, 2000). En general, los *primers* diseñados están dirigidos a genes involucrados en la patogenicidad, presentes en la isla de patogenicidad a nivel del cromosoma o en los plásmidos circulares pCM1 y pCM2 (Kleitman *et al.*, 2008). Sin

embargo, se ha comprobado, que estos *primers* no reaccionan con todas las cepas del patógeno (Louws *et al.*, 1998). Debido a esto se recomienda utilizar varios sistemas de *primers* simultáneamente a los efectos de evitar falsos negativos (Hadas *et al.*, 2005).

En la práctica, el límite de detección de Cmm por PCR es aproximadamente 10^3 ufc/ml. La pequeña cantidad de muestra utilizada en cada reacción de amplificación limita la sensibilidad de estos métodos. También se ha reportado la presencia de compuestos derivados de la planta que actúan como inhibidores de la PCR, afectando su sensibilidad y provocando la ocurrencia de falsos negativos (Dreier *et al.* 1995; Schaad *et al.* 1999). Para superar estas desventajas y aumentar la sensibilidad de los métodos basados en PCR las muestras deben ser tratadas para reducir o eliminar los inhibidores. Para ello, se han desarrollado diversas estrategias: dilución o calentamiento de los extractos, separación selectiva de células blanco por IMS, extracción de ADN, o enriquecimiento selectivo de la muestra previo a la amplificación por PCR. Mediante estos procedimientos se han obtenido muy buenos niveles de sensibilidad, logrando detectar hasta 1 semilla infectada en 10.000 (Dreier *et al.*, 1995).

Una variante de la PCR, la *multiplex* PCR permite la amplificación de dos o más secuencias blanco simultáneamente en una misma reacción. Esta técnica aumenta la eficiencia de la PCR, ya que reduce los tiempos, trabajo y costos. En el trabajo de Ozdemir (2005), se optimizó una *multiplex* PCR para la detección simultánea de Cmm y *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, otro importante patógeno de tomate. Sin embargo, dicho protocolo aún no fue ensayado con muestras de semillas. El método de multiplex PCR también fue optimizado por Zhang *et al.* (2009) para la amplificación simultánea de Cmm junto con el ADN de su hospedero *Solanum lycopersicum*. Mediante esta estrategia se implementa un control positivo de la amplificación que permite detectar la ocurrencia de falsos negativos debido a la presencia de inhibidores de la PCR.

1.4.3 Nuevos métodos: Real-time PCR

Recientemente, se ha desarrollado una nueva tecnología basada en la reacción en cadena de la polimerasa que presenta varias ventajas frente a la PCR convencional. La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (Q-PCR) ha demostrado gran aplicabilidad en la detección de variados microorganismos patógenos incluyendo bacterias, virus y hongos (Roberts *et al.*, 2000, Weller *et al.*, 2000, Avrova *et al.*, 2003). Esta tecnología conjuga las ventajas del uso de la *Taq* polimerasa con la detección mediante fluorescencia del producto específico, sin necesidad de realizar ninguna manipulación adicional posterior a la amplificación. Esta particularidad reduce notablemente los tiempos de análisis permitiendo estandarizar el ensayo para el análisis de un gran número de muestras. Otras ventajas frente a la PCR clásica son su mayor sensibilidad y la disminución del riesgo de ocurrencia de falsos positivos. Finalmente, un aspecto fundamental que aporta el uso de esta tecnología es la posibilidad de efectuar la

cuantificación del ADN diana, lo cual resulta muy difícil de lograr mediante una amplificación clásica (Schaad *et al.*, 1999). En los últimos años, se ha comenzado a aplicar esta tecnología para la detección de Cmm (Bach *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008).

La PCR en tiempo real se está convirtiendo en un estándar de oro en el diagnóstico de fitopatógenos. Se han desarrollado varios ensayos de Q-PCR para la detección de bacterias fitopatógenas incluyendo *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* en tubérculos de papa (Schaad *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2000). Sus ventajas sobre la PCR convencional garantizan su uso para el análisis de sanidad de semillas, ya que presenta mejor sensibilidad y especificidad.

Existen varias estrategias utilizadas para la generación de fluorescencia en reacciones de Q-PCR. Las más conocidas son el uso de agentes intercalantes (*SYBR green I*) y las sondas de hidrólisis (*Taqman*®). Cada método tiene sus características únicas, pero la estrategia general es simple: debe haber un vínculo entre la emisión de fluorescencia y la amplificación del ADN. Las sondas *Taqman*® para Q-PCR consisten en un oligonucleótido marcado de ADN que hibrida con una región específica del amplicón, generado con *primers* específicos (Figura 1-7). Las sondas se encuentran marcadas mediante 2 fluoróforos unidos covalentemente al oligonucleótido: uno en el extremo 3' llamado *Reporter* y otro en el extremo 5' llamado *Quencher*. Cuando ambos se encuentran próximos y unidos al oligonucleótido, el *Quencher* absorbe la señal de fluorescencia del *Reporter*, por lo que no se emite fluorescencia. Durante la amplificación la sonda es degradada por la acción de la ADN polimerasa con actividad 5'-3' exonucleasa, y el *Reporter* y el *Quencher* se separan, permitiendo la detección de la señal de fluorescencia emitida por el *Reporter*. Por lo tanto, la destrucción de la sonda, resulta en un aumento de la señal de fluorescencia emitida por el *Reporter* y corresponde a la amplificación específica del ADN (Valasek y Repa, 2005).

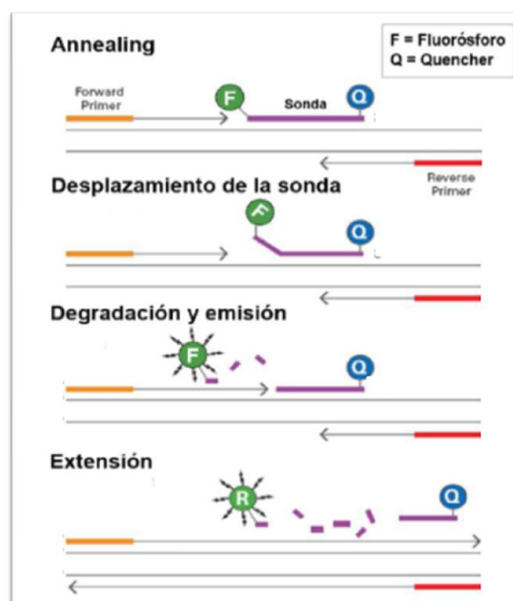


Figura 1-7. Esquema de la reacción de Q-PCR con sondas *Taqman*® (<http://www.e-oligos.com/eoweb/products/eo-taqman.asp>)

Hay que resaltar dos ventajas primordiales de las sondas de hidrólisis frente a los agentes intercalantes inespecíficos, como el *SYBR Green*. En el caso de las sondas *Taqman*® la especificidad de la reacción es mayor ya que para que se detecte la emisión de fluorescencia debe ocurrir la hibridación de la sonda al ADN molde (además de los *primers*). Esta tecnología permite el desarrollo de reacciones multiplex mediante el uso de varias sondas con diferentes fluorocromos en una misma reacción. La desventaja, es que hay que diseñar sondas específicas en cada estudio, mientras que los agentes intercalantes son inespecíficos lo que, por otro lado, provoca que aumente el número de falsos positivos (Valasek y Repa, 2005).

El límite de detección reportado para la detección por Q-PCR en cultivo puro de Cmm fue de 10^3 ufc/ml (Zhao *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008). Sin embargo, estos métodos aún no han sido optimizados para su aplicación a la detección del patógeno en semilla o en plántulas asintomáticas. Zhao *et al.* (2007) reportaron una detección de Cmm por Q-PCR en muestras preparadas de 10 semillas infectadas en 1.000 sanas, pero esta sensibilidad no es suficiente para la certificación de semillas. Además, Luo *et al.* (2008), usan un colorante llamado EMA (*DNA binding ethidium monoazide*) en combinación con Q-PCR para la cuantificación de células viables, las cuales pueden ser discriminadas de las células muertas porque EMA penetra selectivamente a las células muertas, y se une al ADN impidiendo su amplificación.

1.4.4 BIO-PCR

La BIO-PCR es una estrategia muy utilizada para evitar el efecto de las sustancias inhibidoras presentes en las muestras vegetales, aumentando así la sensibilidad de detección. Este procedimiento consiste en realizar el enriquecimiento de la muestra en un medio selectivo sólido previo a la amplificación por PCR (Schaad *et al.*, 1995).

La BIO-PCR presenta varias ventajas frente a la PCR clásica: permite utilizar un volumen mayor de la muestra original, se aumenta la cantidad de células blanco debido a la amplificación biológica durante la etapa de enriquecimiento, se eliminan los inhibidores de PCR los cuales quedan retenidos en el agar, y se evita la ocurrencia de falsos positivos que resultan de la amplificación de células muertas del patógeno. Una desventaja de este procedimiento, es que se requiere un tiempo extra durante el cual se incuban las placas (Schaad *et al.*, 1999).

En el artículo de Burokiene (2006) se optimizó un método de BIO-PCR para la detección temprana de Cmm en plántulas de tomate, donde el límite de detección de la técnica fue de 4×10^2 ufc/ml. Un protocolo de BIO-Q-PCR para la detección de *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, ya fue descrito por Schaad *et al.* (1999). La combinación de la BIO-PCR con el uso de una sonda *Taqman*, constituye una técnica altamente sensible y robusta para la detección de patógenos.

1.5 Situación en Uruguay

En Uruguay, el cancro bacteriano representa uno de los principales problemas sanitarios asociados al cultivo de tomate, significando un riesgo importante para el sistema productivo. Esta enfermedad ha adquirido en los últimos años gran importancia en nuestro país tanto para la producción de tomate a campo como en invernáculo, en particular en el norte del país donde las condiciones ambientales son en general más favorables para la diseminación y propagación del patógeno (Roberto Bernal, *com. pers.*).

Existen pocos antecedentes de investigación sobre esta problemática en nuestro país y hasta el momento no se ha realizado un relevamiento de las cepas de Cmm presentes. En el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) se han llevado a cabo estudios epidemiológicos sobre la sobrevivencia y transmisión de Cmm en condiciones de invernadero, así como la evaluación de métodos de desinfección de semillas de tomate destinados a disminuir la incidencia de la enfermedad (Maeso *et al.*, 2009; Maeso and Walasek, 2010).

Actualmente, se está trabajando en la implementación de un sistema de producción de semilla de tomate nacional certificada que cumpla con los requerimientos fitosanitarios básicos para el aseguramiento de la sanidad del cultivo (Matías González, *com. pers.*). En base a esa situación es que en este trabajo se propone optimizar la metodología para la caracterización de las cepas de Cmm que afectan al cultivo de tomate en Uruguay. Por otro lado, se desarrollará un método basado en un procedimiento de BIO-Q-PCR para el diagnóstico de Cmm en lotes de semilla de tomate. Esta herramienta contribuirá a la producción de semilla nacional de alta calidad, así como a evitar la diseminación del patógeno en nuestro país.

1.6 Hipótesis de trabajo

La técnica de BIO-Q-PCR presenta la sensibilidad adecuada para la detección de Cmm en muestras de semillas de tomate con bajos niveles de contaminación.

2- OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

2.1 Objetivo general

Contribuir al control del cancro bacteriano del tomate, mediante la introducción de nuevas herramientas moleculares para el diagnóstico y detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar cepas uruguayas de Cmm en base a la detección de genes de patogenicidad por PCR convencional y pruebas de patogenicidad.

Desarrollar un método basado en el uso de Q-PCR aplicable a la detección de Cmm en semillas de tomate.

2.3 Estrategia de trabajo

En el presente trabajo, se utilizaron cepas presuntamente identificadas como Cmm que afectaron al cultivo de tomate en Uruguay provenientes de diferentes zonas de producción. Por un lado, se procedió a confirmar la identidad de las cepas brindadas mediante técnicas moleculares básicas. Para dicho fin, las cepas fueron caracterizadas en base a la secuenciación de gen de ARNr 16S, y a la presencia o ausencia de genes relacionados con la virulencia. Además, las cepas fueron caracterizadas en función de su patogenicidad en tomate mediante inoculación artificial en plantas jóvenes.

Por otro lado, se desarrolló un método molecular basado en Q-PCR aplicable a la detección del patógeno en semillas de tomate. Se partió del método de Q-PCR desarrollado por Luo y colaboradores (2008) basado en el uso de una sonda *TaqMan*[®], lo cual asegura una mayor especificidad de detección que otras tecnologías disponibles. Para evaluar el método en una primera instancia, se determinó su sensibilidad sobre muestras de ADN genómico y suspensiones celulares de Cmm. Sin embargo, la matriz sobre la cual se realiza la detección afecta drásticamente la eficiencia de la reacción, debido a la presencia de sustancias provenientes de los tejidos vegetales que inhiben la amplificación. Para evitar esta interferencia se agregó una etapa de enriquecimiento selectivo de la muestra previo a la reacción de amplificación por Q-PCR. Por medio de este procedimiento, comúnmente denominado BIO-PCR, se logra generalmente disminuir la concentración de las sustancias inhibitoras al mismo tiempo que se aumenta el número de células diana. A pesar de que se prolonga el tiempo requerido para el análisis, ésta es una estrategia que generalmente se adopta para aumentar la sensibilidad del método, principalmente en los casos de detección sobre muestras donde el patógeno se encuentra presente en muy bajo número. En este trabajo, se optimizó un método de BIO-Q-PCR para la detección de Cmm en muestras de semilla de tomate y se comparó su sensibilidad respecto a la detección directa mediante Q-PCR. Por último, se aplicó el método desarrollado para la detección de Cmm en lotes de semillas de diversos orígenes y

cultivares, en el marco del programa de producción de semilla nacional que se está desarrollando en nuestro país.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas utilizadas

Las cepas utilizadas fueron aportadas por los Ing. Agr. Enrique Verdier (DGSA-MGAP), Diego Maeso (INIA Las Brujas) y Matías González (INIA Salto Grande). Las mismas fueron aisladas de plantas de tomate con síntomas de infección por Cmm. En la Tabla 3-1 se muestra la información correspondiente a cada cepa.

Tabla 3-1: Origen de las cepas de Cmm analizadas en este trabajo.

Cepa	Origen		Fuente
	Departamento	Fecha	
Cmm82	Canelones	Marzo 1999	DGSA-MGAP
Cmm148	Canelones	Febrero 2008	DGSA-MGAP
Cmm17	Canelones	Julio 2011	INIA Las Brujas
Cmm111	Salto	Noviembre 2011	INIA Salto Grande
Cmm112	Salto	Diciembre 2011	INIA Salto Grande

3.1.1 Condiciones de crecimiento y conservación de las cepas de Cmm

El cultivo de las cepas de Cmm se realizó en medio agar nutriente dextrosa (NAD) o agar caldo-nutriente extracto de levadura (NBY), incubando las placas a 28°C durante 48-72 hs. La composición y forma de preparación de estos medios se detalla en el *Apéndice*.

Para su conservación, las cepas puras se cultivaron en medio líquido NBY, se les agregó glicerol 60% estéril hasta llegar a una concentración final del 10%, se homogeneizaron y se guardaron en freezer a -70°C (Schaad, 2001).

3.2 Ensayos de patogenicidad

3.2.1 Siembra de las semillas de tomate

Se tomaron aproximadamente 200 semillas (cv. Repique) previamente desinfectadas (hipoclorito de sodio al 1%), que se germinaron en placas con gasa estéril en oscuridad a 28°C, durante 5 días. Posteriormente, se realizó la siembra de las semillas germinadas en almáciguera con sustrato para horticultura profesional (*Tref, Jiffy Products International, Holanda*). Las plántulas se mantuvieron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas con el siguiente programa de ciclos: con luz, a 29°C durante 10 horas y en oscuridad a 21°C durante 14 horas. La humedad se mantuvo en 80% en todo el ciclo.

3.2.2 Preparación del inóculo

Se preparó un cultivo bacteriano de 24 horas en caldo NBY, el cual se centrifugó por 15 minutos a 6000 rpm, resuspendiéndose el *pellet* en suero fisiológico estéril, para eliminar los restos de medio de cultivo. Dicho inóculo se ajustó

espectrofotométricamente a una concentración aproximada de 10^8 células/ml (densidad óptica a 600 nm entre 0,14-0,18). Para confirmar la concentración del inóculo se realizó el recuento en placa, para lo cual se sembraron 100 μ l de las diluciones -4, -5 y -6 (en suero fisiológico) en placas de NBY las cuales se dejaron incubando en estufa a 28°C por 72 horas. Para informar el recuento se eligió la placa conteniendo entre 25 y 250 colonias, y se calculó la cantidad de ufc/ml multiplicando el número de colonias por la inversa de la dilución y por la inversa del volumen sembrado. Este procedimiento fue realizado con las 5 cepas de Cmm.

3.2.3 Pruebas de patogenicidad

Se inocularon 12 plántulas de tomate de cinco semanas con cada una de las suspensiones bacterianas previamente preparadas. El procedimiento de inoculación consistió en realizar una herida con aguja estéril en el pecíolo correspondiente a la segunda hoja desde el ápice de cada planta y luego colocar 5 μ l del inóculo bacteriano. Se utilizaron 12 plántulas como controles negativos, en las cuales se colocó agua destilada estéril. Las plantas inoculadas y los controles se mantuvieron en cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se realizaron evaluaciones periódicas registrándose la aparición de los síntomas característicos del cancro hasta 25 días después de la inoculación (ddi). Una vez culminado el ensayo, todos los materiales utilizados fueron esterilizados y enviados para su incineración, para asegurar que no hubiese diseminación del patógeno al ambiente.

3.3 Caracterización molecular de las cepas de Cmm

3.3.1 Extracción de ADN

Se ensayaron dos métodos para la extracción de ADN de las cepas de Cmm: un procedimiento clásico y la extracción mediante el uso de un kit comercial.

En el primer caso, el procedimiento seguido se basa en el descrito por Sambrook y Rusell (2001). A partir de una colonia aislada de un cultivo de Cmm en medio NBY, se inocularon tubos con 5 ml de caldo NBY que se incubaron a 28°C por 48-72 horas en agitación a 150 rpm. Luego de este período, los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante. El *pellet* obtenido se colocó a -20°C por 15-60 minutos y se resuspendió en 0,5 ml de buffer TE25S pH 8,0. Luego, se agregaron 10 μ l de lisozima (100 mg/ml en TE25S) y se incubó a 37°C durante 30-60 minutos. Posteriormente, se agregaron 5 μ l de proteinasa K (100 mg/ml en TE25S) y 30 μ l de SDS 10%, se mezcló suavemente por inversión y se incubó a 55°C por 60 minutos. Luego de la incubación, se agregaron 100 μ l de NaCl 5M y 65 μ l de CTAB/NaCl 0,7M. La mezcla se homogenizó y se incubó 10 minutos a 55°C. Se enfrió a 37°C por unos minutos, se añadieron 500 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó durante 30 minutos por inversión, y se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 rpm. Posteriormente, se transfirió la fase superior a un tubo nuevo y se agregaron 2,5

µl de RNasa A libre de DNAasa (10,0 mg/ml) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol frío para precipitar el ADN, se mezcló y se dejó incubando a -20°C durante la noche. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. Luego, se lavó el pellet con aproximadamente 500 µl de etanol 70% frío y se centrifugó nuevamente. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el ADN en estufa a 37°C hasta comprobarse la desaparición de etanol. El ADN se resuspendió en 100 µl de buffer TE pH 8,0. El modo de preparación de todos los reactivos utilizados se detalla en el *Apéndice*.

Por otro lado, se realizó la extracción de ADN mediante el uso del kit comercial *ViVo Genomic DNA Purification Kit* (ViVo Science). Se siguieron las instrucciones del proveedor.

Se realizaron dos extracciones de ADN independientes de cada cepa de Cmm por cada uno de los métodos evaluados. Se observó la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1% y Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X como buffer de corrida. Se utilizó como tinción bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se reveló con luz UV.

3.3.2 Cuantificación de ADN

Se realizó la cuantificación del ADN obtenido con el protocolo de extracción clásico mediante fluorimetría. Se utilizó el kit comercial *Quant-it dsDNA* (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones suministradas por el proveedor.

3.3.3 Amplificación y secuenciación del gen de ARNr 16S

Se realizó la amplificación con *primers* universales para el Dominio *Bacteria* complementarios a secuencias conservadas ubicadas en los extremos 5' y 3' del gen del ARNr 16S (Eub27F, Eub1492R y Eub1525R) (Lane, 1991). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo: 2,5 µl de buffer de PCR 10X (suministrado con la *Taq*), 1,0 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl de dNTPs (5,0 mM), 1,0 µl de cada *primer* (10 µM), 0,2 µl de *Taq* polimerasa 5,0 U/µl (*Invitrogen*) y 50 - 100 ng de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de gradiente *Corbett CG1-96* y se utilizó el siguiente programa de temperaturas: un primer paso de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 60 s), hibridación (55°C por 60 s) y extensión (72°C por 60 s). Por último se realizó una etapa de extensión a 72°C por 5 minutos.

Se verificó el tamaño del producto de amplificación por electroforesis en gel de agarosa 1,0 % en buffer TBE 0.5X y tinción con bromuro de etidio, utilizando como referencia un marcador de peso molecular comercial (*Smart Ladder, Eurogentc*).

Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados por *Macrogen* (Corea). Las secuencias se corrigieron manualmente a través del programa BioEdit (*Ibis Biosciences*, Carlsbad, California) y se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* (NCBI) mediante el algoritmo *BLASTn*.

3.3.4 Amplificación de genes específicos

Se probaron varios sets de *primers* dirigidos a diferentes genes de patogenicidad identificados en Cmm, así como a secuencias específicas de la región intergénica del ARNr 16S-23S (ITS). En la Tabla 3-2 se detalla la información correspondiente a cada par de *primers* utilizado. Todos los *primers* fueron sintetizados por *Macrogen* (Corea).

Tabla 3-2: Primers específicos de Cmm utilizados en este trabajo. Referencia: Kleitman *et al.*, 2008

Nombre	Secuencia (5'-3')	Blanco de amplificación*	Tamaño del amplicón (pb)
CMM5	GCGAATAAGCCCATATCAA	<i>pat-1</i> (pCM2)	614
CMM6	CGTCAGGAGGTCGCTAATA		
PFC3	GGTACGAAGTTCGAGACGAC	Dominio CB <i>celA</i> (pCM1)	580
PFC5	TGTAGCGGTGAGTCGTGGTGA		
tomA-F	CGAACTCGACCAGGTTCTCG	<i>tom-A</i> (IPA)	528
tomA-R	GGTCTCACGATCGGATCC		
ppaA-F	CATGATATTGGTGGGGAAAG	<i>ppaA</i> (IPA)	587
ppaA-R	CCCCGTCTTGCAAGACC		
chpC-F	GCTCTTGGGCTAATGGCCG	<i>chpC</i> (IPA)	638
chpC-R	GTCAGTTGTGGAAGATGCTG		
PSA-4	TCATTGGTCAATTCTGTCTCCC	ITS	270
PSA-R	TACTGAGATGTTTCACTTCCC		

* Entre paréntesis se indica la ubicación del gen utilizado como blanco de amplificación.

Las reacciones se realizaron según las condiciones establecidas en bibliografía (Dreier *et al.*, 1995; Hadas *et al.*, 2005; Kleitman *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Algunas de las reacciones fueron optimizadas mediante cambios en la temperatura de hibridación de los *primers* (50 – 63°C) y la concentración de MgCl₂ (1,0 – 2,5 mM). Las condiciones de amplificación seleccionadas para cada uno de los genes se detallan en las Tablas 3-3 y 3-4.

Tabla 3-3. Condiciones para cada reacción de PCR con *primers* específicos para Cmm.

Reactivos	Volumen (μl)					
	CMM5/CMM6	PSA-4/PSA-R	tomA-F/tomA-R	PFC3/PFC5	ppaA-F/ppaA-R	chpC-F/chpC-R
Buffer 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ 50 mM	0,75	0,75	1	1	0,5	1
dNTPs 5mM	1	1	1	1	1	1
primerF 10μM	1,25	1	1	1	1	1
primerR 10μM	1,25	1	1	1	1	1
Taq 5U	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
H2O miliQ	16,05	16,5	16,3	16,3	16,8	16,3
ADNm	2	2	2	2	2	2

Tabla 3-4. Condiciones de temperatura y tiempo para cada reacción de PCR con *primers* específicos para Cmm.

Etapa	temperatura (°C); tiempo (min)					
	CMM5/CMM6	PSA-4/PSA-R	tomA-F/tomA-R	PFC3/PFC5	ppaA-F/ppaA-R	chpC-F/chpC-R
Inicial	94 ; 3	95 ; 3	95 ; 3	95 ; 3	95 ; 3	95 ; 3
Desnaturalización	94 ; 1	95 ; 1	95 ; 1	95 ; 1	95 ; 1	95 ; 1
Hibridación	55 ; 1	63 ; 1	57 ; 1	55 ; 1	56 ; 1	57 ; 1
Extensión	72 ; 1	72 ; 1	72 ; 1	72 ; 1	72 ; 1	72 ; 1
Final	72 ; 5	72 ; 5	72 ; 5	72 ; 5	72 ; 5	72 ; 5
Nro. de ciclos	40	40	35	35	35	35

Se verificó el tamaño de los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa 1,0 % en buffer TBE 0.5X y tinción con bromuro de etidio, utilizando como referencia el marcador de peso molecular comercial anteriormente mencionado.

3.4 Detección de Cmm mediante Q-PCR

3.4.1 Materiales y condiciones de amplificación

Los *primers* y la sonda *Taqman*® utilizados para la detección de Cmm mediante Q-PCR se obtuvieron a partir de bibliografía (Luo *et al.*, 2008). Los *primers* utilizados (Spm4F y Spm2R) y la sonda (CMM) están dirigidos a la región intergénica ITS (operón ARNr) de Cmm y fueron sintetizados por *Macrogen* (Corea) (Tabla 3-5). El tamaño esperado del producto de amplificación es de 223 pb.

Tabla 3-5. *Primers* y sonda *Taqman*® utilizados para la detección de Cmm mediante Q-PCR. Fuente: Luo *et al.*, 2008

	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
Primer F	Spm4F	TCAGGCGTCTGTTCTGGC	58,4
Primer R	Spm2R	CCCACCACCATCCACAAC	58,4
Sonda	CMM	CCTTCTGGGTGTGTCTGGTTTC*	64,0

*Reporter: FAM Quencher: TAMRA

La optimización de la reacción abarcó la evaluación de tres mezclas comerciales de reactivos para Q-PCR: *Probe fast* (KAPA Biosystems), *Rotor Gene* (Qiagen) y *Quanti-Tec* (Qiagen). Dado que la técnica de Q-PCR es cuantitativa, es necesario contar con estándares de concentraciones conocidas para realizar las curvas de calibración correspondientes. Para la evaluación de la eficiencia de los kits de Q-PCR se eligió la cepa Cmm82 cuya concentración de ADN fue de 37,2 µg/ml. A partir de la misma se preparó una solución estándar de 10 ng/µl de ADN y posteriormente se realizaron 5 diluciones seriadas al décimo a partir de esta última. Cada estándar de concentración conocida de ADN fue alicuotado en tubos de a 10 µl (para mantener estabilidad del ADN) y conservado a -20°C. A su vez, estos estándares fueron utilizados como controles positivos en posteriores corridas.

Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo *Rotor-Gene 6000* (Corbett Research) y las condiciones fueron establecidas según las utilizadas por Luo *et al.* (2008) y las indicadas por cada proveedor. En las Tabla 3-6 y 3-7 se detallan las condiciones de reacción y los programas de temperaturas utilizados en cada caso.

Tabla 3-6. Concentraciones de reactivos para la detección de Cmm por Q-PCR utilizando 3 kits comerciales.

Reactivo	Volumen (μl)
Mastermix 2X	5
Spm4F (10 μM)	0,4
Spm2R (10 μM)	0,4
Sonda CMM (10 μM)	0,2
Agua miliQ	2
ADN o lisado celular	2

Tabla 3-7. Ciclos de amplificación utilizados para la detección de Cmm por Q-PCR con 3 kits comerciales.

Kit	<i>Probe fast (Kapa) y Rotor-Gene (Qiagen)</i>		
Etapa	Desnaturalización	45 ciclos	
		Desnaturalización	Hibridación-Extensión
Temperatura	95 °C	95°C	60°C
Tiempo	3 minutos	3 segundos	30 segundos
Kit	<i>Quanti-Tec (Qiagen)</i>		
Etapa	Desnaturalización	40 ciclos	
		Desnaturalización	Hibridación-Extensión
Temperatura	95°C	94°C	60°C
Tiempo	15 minutos	15 segundos	60 segundos

3.4.2 Evaluación de la sensibilidad del método a partir de estándares de ADN

Para evaluar la sensibilidad de detección en ADN, se procedió a realizar una curva de calibración mediante la preparación de diluciones seriadas al décimo de ADN de la cepa Cmm82. Se analizaron 6 diluciones de concentración conocida de ADN (estándares), las cuales fueron: 10 ng/μL, 1,0 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1,0 pg/μL y 0,1 pg/μL. Cada uno de los estándares se evaluó por triplicado utilizando las condiciones descritas en el ítem 3.4.1. El análisis de los datos se realizó mediante el *Software Rotor-Gene 6000 Series* versión 1.7.75. Los resultados se registraron en base a los valores umbral de ciclo (Cq), que se define como el número de ciclo de la PCR en el cual la producción de fluorescencia de la muestra cruza el umbral establecido. Dicho parámetro, extrae la señal correspondiente al ruido de fondo, determina el ciclo inicial de amplificación, y es inversamente proporcional al número de copias inicial del molde. Previamente, un umbral adecuado debe ser fijado por el operador en un punto significativamente por encima de la línea base (punto de inflexión de la curva). En la

actualidad todos los termocicladores incluyen en su *software* un sistema automático de cálculo del valor umbral, aunque también es posible ajustarlo manualmente dentro de los parámetros recomendados.

Para el análisis de las curvas de intensidad de fluorescencia vs. ciclos y las curvas de calibración, se tuvieron en cuenta los parámetros de eficiencia, rango de valores de C_q, así como también el rango de concentraciones detectadas.

3.4.3 Evaluación de la sensibilidad del método en suspensiones celulares de Cmm

Se preparó una suspensión de células de Cmm en suero fisiológico estéril (SF) a partir de un cultivo de la cepa Cmm82 crecido en placa de NBY durante 3 días de incubación. La suspensión se ajustó espectrofotométricamente a una concentración aproximada de 10⁸ células/ml (densidad óptica a 600 nm entre 0,14-0,18). A partir de dicha suspensión, se realizaron diluciones seriadas al décimo en SF en un rango de concentraciones de 10⁸ a 1 ufc/ml. Estas suspensiones fueron lisadas (99°C durante 20 min) y centrifugadas para eliminar los restos celulares y así utilizar el ADN contenido en el sobrenadante como molde para la reacción de Q-PCR. La misma se llevó a cabo utilizando el kit *Quanti-Tec (Qiagen)* en las condiciones anteriormente indicadas. En cada corrida se incluyeron 2 estándares de ADN de Cmm como controles positivos, así como un control negativo sin ADN. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. El análisis de los datos se realizó mediante el *Software Rotor-Gene 6000 Series* versión 1.7.75 siguiendo los mismos criterios indicados en el punto 3.4.2. La sensibilidad del método quedó determinada por la mayor dilución capaz de ser detectada por el equipo en los triplicados.

Para determinar la concentración exacta del inóculo inicial se realizó el recuento en NBY. Para ello se sembraron 100 µl de las diluciones en SF -4, -5 y -6 en placas de NBY las cuales se dejaron incubando en estufa a 28°C por 72 horas. Para informar el recuento se eligió la placa conteniendo entre 25 y 250 colonias, y se calculó la cantidad de ufc/ml multiplicando el número de colonias por la inversa de la dilución y por la inversa del volumen sembrado.

3.4.4 Evaluación de la sensibilidad de detección en extracto de semillas de tomate por Q-PCR directa

Como primer paso, se preparó un extracto de semillas de tomate, de acuerdo al protocolo de A.W. Saettler *et al.* (1989). Se colocaron 2.000 semillas (6,0 g) en una bolsa de plástico estéril y se agregaron 60 ml de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. Se utilizó un martillo para romper mediante acción mecánica las semillas contenidas en la bolsa hasta que se observó turbidez en el líquido. Luego, el extracto se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Dicho extracto, fue usado como matriz para evaluar la sensibilidad de detección del método en extracto de semillas.

Posteriormente, se preparó una suspensión de células tal como se describió en el ítem 3.4.3. A partir de dicha suspensión, se realizaron diluciones seriadas al décimo en SF y paralelamente en extracto de semilla (ES), en un rango de concentraciones de 10^8 a 1 ufc/ml. Se determinó la concentración exacta de Cmm en estas suspensiones mediante recuento en placas de NBY, sembrando 100 µl de las diluciones en SF -4, -5 y -6. Las placas se incubaron a 28°C por 72 horas.

Las diluciones preparadas en ES y en SF se lisaron y centrifugaron previo al análisis por Q-PCR directa. Para ello, se utilizó el kit *Quanti-Tec (Qiagen)* según las condiciones de reacción establecidas en el ítem 3.4.1. Cada muestra se analizó por duplicado y en cada reacción se incluyó como blanco un control sin ADN y dos estándares de ADN de Cmm como controles positivos. También se analizó como control negativo la MS sin inocular. El análisis de los datos se realizó mediante el *Software Rotor-Gene 6000 Series* versión 1.7.75 siguiendo los mismos criterios indicados en el ítem 3.4.2. La sensibilidad del método quedó determinada por la mayor dilución capaz de ser detectada por el equipo en ambos duplicados.

3.4.5 Evaluación de la sensibilidad de detección extracto de semillas de tomate por BIO-Q-PCR

El método de Q-PCR para la detección de Cmm se adaptó a un protocolo de BIO-Q-PCR, incorporando una etapa de enriquecimiento selectivo de la muestra previo a la amplificación. El procedimiento general abarcó dos etapas: la optimización de la etapa de enriquecimiento selectivo, y la posterior detección por Q-PCR.

Optimización de la etapa de enriquecimiento selectivo de Cmm

En una primera instancia se evaluaron los medios CNS, D2ANX, SCM y mSCM, cuya composición de detalla en el *Apéndice*. Para ello, se sembraron en placa 100 µl de extracto de semillas de tomate, en cada uno de los medios selectivos, y simultáneamente se realizó un aislamiento por estría de una cepa de Cmm en cada medio. De esta manera, los medios se evaluaron según la velocidad de desarrollo de las colonias de Cmm así como al grado de inhibición de la flora microbiana presente en semilla de tomate.

En una etapa posterior, se evaluaron los medios mSCM y SCM como medios selectivos de enriquecimiento para la detección de Cmm en semillas de tomate por BIO-Q-PCR. También se evaluaron dos tiempos de incubación a 28°C (3 y 4 días).

Detección por BIO-Q-PCR

Para la BIO-Q-PCR se siguió el protocolo descrito por Saettler *et al.* (1989). A partir de las diluciones -3 a -8 preparadas en ES (ver ítem 3.4.4) se sembraron 100 µl en tres placas de medio selectivo y se incubaron en estufa a 28°C. Luego del período de incubación, se lavaron dos de las tres placas de cada dilución con 2 ml de agua estéril cada una. Se rastrilló con ansa la superficie del agar para desprender las “colonias” en crecimiento y el lavado de ambas placas se juntó en un mismo tubo. Las suspensiones

obtenidas se centrifugaron a temperatura ambiente por 10 min a 8000 rpm, se descartó cuidadosamente el sobrenadante y el pellet conteniendo las células se resuspendió en 100 µl de agua estéril. Luego se provocó la lisis de las células por calentamiento durante 20 min a 99°C, y se centrifugó para eliminar los restos celulares. Finalmente se realizó la amplificación por Q-PCR a partir de 4 µl del lisado siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la Q-PCR directa. Como control negativo se analizó el lavado realizado a partir de una placa que fue sembrada únicamente con la matriz semilla sin inocular con Cmm.

La tercera placa de enriquecimiento selectivo de cada dilución se dejó incubando a 28°C hasta observar el desarrollo de colonias típicas de Cmm (entre 7 y 10 días).

3.4.6 Análisis de lotes de semilla nacional

A partir de 5 muestras de semillas de tomate provistas por el Ing. Agr. Matías Gonzalez (INIA Salto Grande) se prepararon los extractos correspondientes a partir de 2000 semillas tal como se indicó en el *ítem* 3.4.4. En la tabla 3-8 se indica la procedencia de las muestras, las cuales corresponden a distintos cultivares y productores. También se prepararon extractos a partir de 5.000 semillas (17 g) con tres de estas muestras (Rep-A, Mil-A y Mil-DP).

Tabla 3-8. Origen y nombre del cultivar de las muestras de semilla de tomate.

Nombre del cultivar	Productor	Abreviatura
Repique	Arvelo	Rep-A
Repique	Básica INIA	Rep-BI
Milongón	Arvelo	Mil-A
Milongón	Básica INIA	Mil-BI
Milongón	Daniel Ponce	Mil-DP

Se realizó el análisis de las muestras mediante Q-PCR directa y BIO-Q-PCR, para evaluar si las mismas presentaban contaminación con Cmm.

4- RESULTADOS

4.1 Ensayos de patogenicidad

Las concentraciones de los inóculos bacterianos utilizados para el ensayo de patogenicidad con cada una de las cepas se muestran en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Concentración del inóculo bacteriano para cada cepa de Cmm.

Cepa	Absorbancia (ajuste)	Concentración (ufc/ml)
Cmm17	0,153	$0,4 \times 10^8$
Cmm111	0,163	$1,0 \times 10^8$
Cmm112	0,164	$0,6 \times 10^8$
Cmm82	0,148	$0,2 \times 10^8$
Cmm148	0,163	$1,0 \times 10^8$

Una vez realizadas las inoculaciones, los síntomas de cancro comenzaron a registrarse a los 14 días después de la inoculación (ddi), observándose marchitamiento en las hojas adyacentes al sitio de inoculación. A medida que pasaban los días el marchitamiento se volvía cada vez más generalizado hasta volverse completo a los 22 ddi.

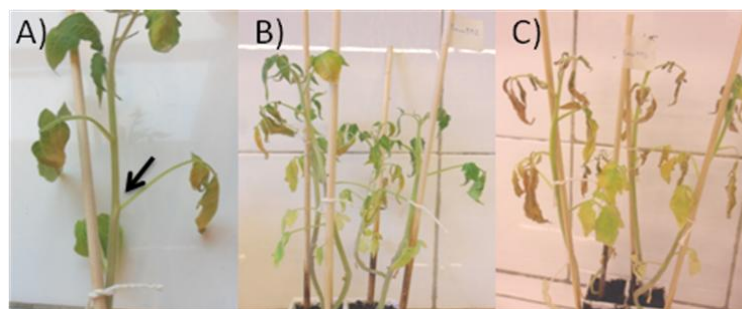


Figura 4-1. Evolución de los síntomas de cancro registrados en plantas de tomate inoculadas con la cepa Cmm112. A: 14 ddi; B: 16 ddi; C: 22 ddi. La flecha indica el sitio donde se realizó la inoculación.

Todas las plantas inoculadas con las cepas Cmm82, Cmm148, Cmm111 y Cmm112 presentaron síntomas de cancro (marchitamiento) y finalmente murieron. No se observaron diferencias respecto a la aparición y evolución de los síntomas en las plantas inoculadas con estas cepas. Por otro lado, las plantas inoculadas con Cmm17 y los controles negativos no presentaron síntomas (Figura 4-2). Estos resultados estarían indicando que la cepa Cmm17 no es patógena en tomate, o que se trataría de otra especie bacteriana.

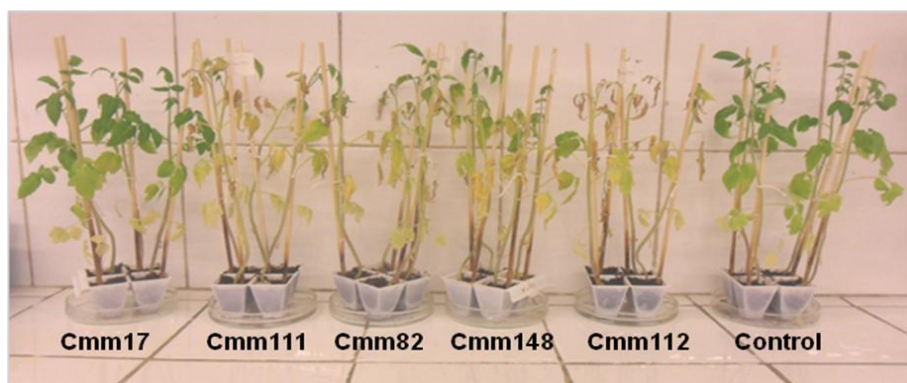


Figura 4-2. Síntomas de cancro registrados a los 22 ddi en plantas de tomate inoculadas con cada una de las cepas de Cmm que como se indican en la Figura.

4.2 Caracterización molecular de las cepas de Cmm

4.2.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de todas las cepas por duplicado y se corrieron en gel para evaluar su integridad y pureza. A modo de ejemplo se muestran algunas de las extracciones utilizando el protocolo de extracción clásica (Figura 4-3A) y el kit comercial (Figura 4-3B).

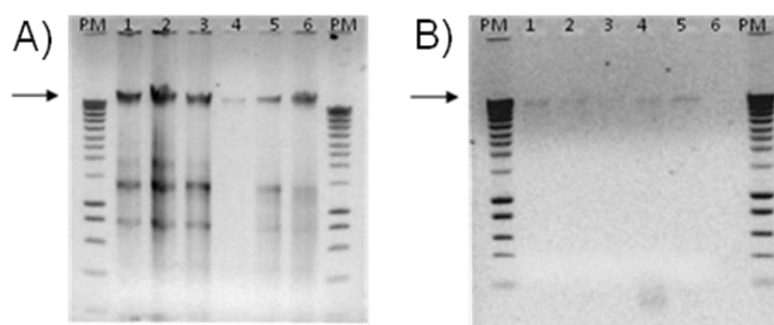


Figura 4-3. Extracción de ADN genómico a partir de cultivos puros de Cmm por extracción clásica (A) y con el kit *ViVo Science*. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1 y 2: Cmm17, 3 y 4: Cmm82, 5 y 6: Cmm148. PM: marcador de peso molecular (Smart Ladder, *Eurogentec*). La flecha indica la banda correspondiente al ADN genómico.

Comparando los dos métodos de extracción de ADN ensayados, se puede concluir que la extracción de ADN clásica fue más eficiente que la extracción utilizando el kit comercial *Vivo Genomic DNA Purification Kits (ViVo Science)*. A partir de la extracción clásica se obtiene mayor cantidad de ADN genómico (mayor rendimiento) y también se observan dos bandas de menor tamaño correspondientes a los plásmidos de Cmm. En la extracción mediante el Kit comercial la cantidad de ADN obtenido es menor y no se extrajeron los plásmidos. En las extracciones correspondientes a Cmm17 se observa una tercer banda que puede corresponder a otro plásmido presente en esta cepa (Figura 4-3).

4.2.2 Cuantificación de ADN

Se midió la cantidad de ADN obtenida en cada extracción realizada a cada cepa mediante el protocolo clásico por fluorimetría. Los resultados se muestran en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2. Concentración de ADN obtenida por fluorimetría.

Cepa	Concentración de ADN
Cmm111	49,3 µg/ml
Cmm112	28,2 µg/ml
Cmm148	53,0 µg/ml
Cmm82	37,2 µg/ml

4.2.3 Amplificación del gen del ARNr 16S y secuenciación

Con el ADN extraído de todas las cepas, se procedió a realizar la PCR con *primers* universales para el dominio Bacteria dirigidos al gen del ARNr 16S: Eub27F y Eub1492R; Eub27F y Eub1525R (Figura 4-4). También se realizó la amplificación a partir de lisado celular de la cepa Cmm112 (Figura 4-5).

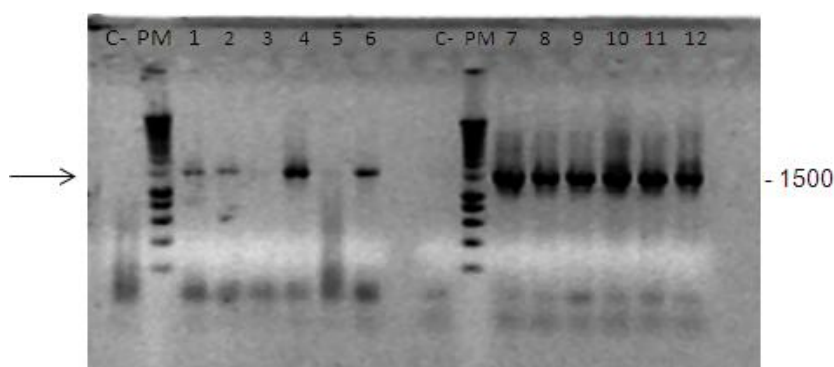


Figura 4-4. Amplificación del gen del ARNr 16S utilizando los *primers* universales Eub27F y Eub1525R (carriles 1 a 6) o Eub27F y Eub1492R (carriles 7 a 12). Carriles 1, 2, 7 y 8: Cmm17; 3, 4, 9 y 10: Cmm82; 5, 6, 11 y 12: Cmm148; PM: marcador de peso molecular (Smart Ladder, Eurogentec); C-: control negativo

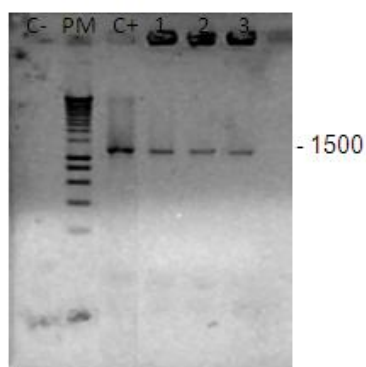


Figura 4-5. Amplificación del gen del ARNr 16S con *primers* Eub27F y Eub1525R a partir de lisado celular de la cepa Cmm112 (carriles 1 a 3). PM: marcador de peso molecular (Smart Ladder, Eurogentec); C-: control negativo; C+: amplificación a partir de ADN extraído de Cmm112.

Para todos los ADNs ensayados se obtuvo el producto de amplificación por PCR del tamaño esperado según los *primers* dirigidos al ARNr 16S utilizados (aproximadamente 1500 pb). Esto confirmó que todas las cepas pertenecían al dominio Bacteria. Por otra parte, estas amplificaciones permitieron confirmar que los ADNs extraídos eran amplificables por PCR, o sea, que no poseían trazas de algún producto de la extracción (etanol, cloroformo, etc.) que impidiera la reacción de PCR.

Se pudo observar que la amplificación a partir de los *primers* 27F y 1492R fue más eficiente que la realizada a partir de los *primers* 27F y 1525R, ya que en el primer caso se observan bandas intensas en todos los carriles (Figura 4-4). Por otro lado, también se verificó la posibilidad de la amplificación a partir de lisado celular. Sin embargo, las bandas obtenidas de esta manera son menos intensas que las obtenidas a partir de ADN purificado, probablemente debido a una menor concentración de ADN molde en el lisado celular (Figura 4-5).

Todos los productos de amplificación fueron enviados a secuenciar. Mediante el programa *BioEdit* se armaron las secuencias consenso del gen del ARNr de cada cepa, y se compararon con las secuencias de la base de datos *Genbank*, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 4-3. Los resultados mostraron que las cepas Cmm82, Cmm148, Cmm111, y Cmm112 presentan una alta homología con cepas de Cmm, mientras que Cmm17 corresponde a *Arthrobacter nicotinovorans*.

Tabla 4-3. Identificación de cepas de Cmm por secuenciación del gen del ARNr 16S y comparación con secuencias depositadas en la base de datos *Genbank* mediante el algoritmo *Blastn*.

Cepa	Similar a	Nº Acceso	Homología
Cmm17	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> cepa DSM420	NR_026194.1	97%
Cmm111	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp.	HQ144242.1	99%
Cmm112	<i>michiganensis</i> strain Cmm VT3		98%
Cmm82	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp.	NR_036892.1	98%
Cmm148	<i>michiganensis</i> cepa DSM 46364		99%

4.2.4 Amplificación de genes específicos

Todas las cepas fueron caracterizadas en base a la presencia o ausencia de genes específicos de Cmm, incluyendo varios genes de patogenicidad así como secuencias específicas de la región ITS. A modo de ejemplo, se muestran algunos de los geles con los productos de cada amplificación (Figuras 4-6 y 4-7).

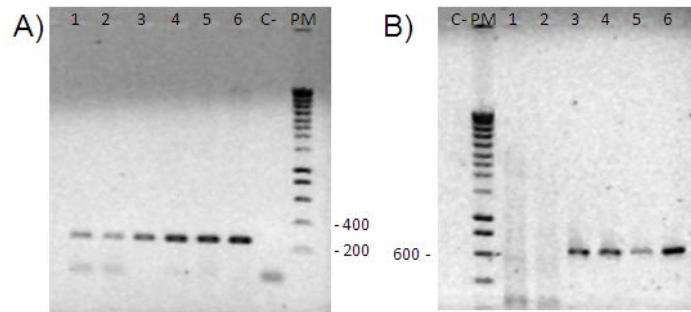


Figura 4-6. Amplificación de la región ITS con los *primers* PSA-4/PSA-R (A) y del gen *chpC* con los *primers* chpC-F/chpC-R (B). 1 y 2: Cmm17; 3 y 4: Cmm82; 5 y 6: Cmm148; PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder, Eurogentec*); C-: control negativo. Al costado de la foto se indica el tamaño de las bandas de marcador de peso molecular.

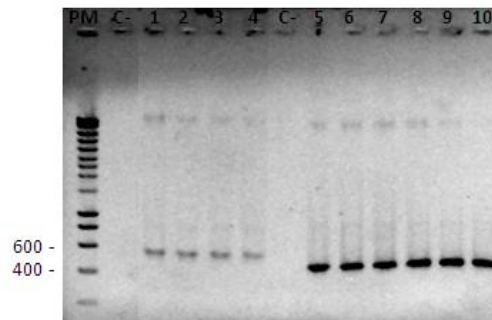


Figura 4-7. Amplificación de los genes *pat-1* (izquierda del gel) y *tomA* (derecha del gel) con los *primers* CMM5/CMM6 y tomA-F/tomA-R, respectivamente. 1, 2, 5, 6 y 7: Cmm111; 3, 4, 8, 9 y 10: Cmm112; PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder, Eurogentec*); C-: controles negativos para cada reacción.

Todas las reacciones de amplificación fueron optimizadas mediante cambios en la concentración de $MgCl_2$ y en la temperatura de hibridación de los *primers*. En la Figura 4-8 se muestra como ejemplo la optimización de la reacción de amplificación del gen *ppaA*.

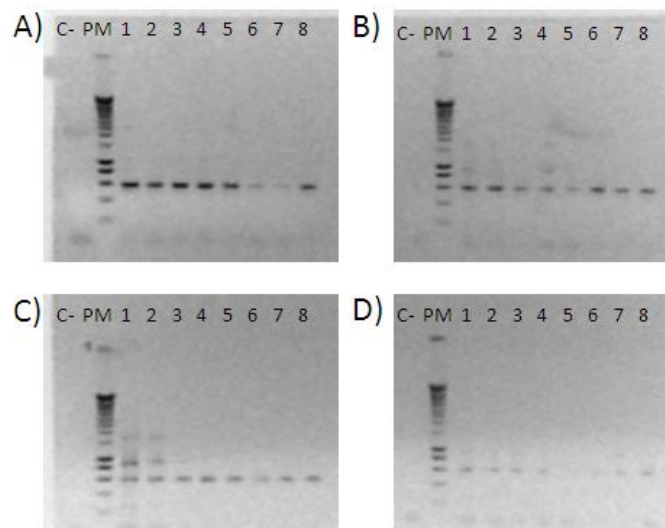


Figura 4-8. Optimización de la PCR del gen *ppaA* utilizando diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (A: 1,0 mM; B: 1,5 mM; C: 2,0 mM; D: 2,5 mM) y diferentes temperaturas de hibridación (1 y 5: 50°C; 2 y 6: 52°C; 3 y 7: 54°C; 4 y 8: 56°C). Carriles 1 a 4: Cmm82; 5 a 8: Cmm148; PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder, Eurogentec*); C-: control negativo

En este caso, se vio que la concentración de $MgCl_2$ es fundamental en la reacción de amplificación, y que la temperatura de hibridación no provoca cambios importantes. Las condiciones óptimas para esta reacción en particular fueron una concentración de $MgCl_2$ de 1,0 mM y una temperatura de hibridación de entre 50 y 56°C. De esta manera, se obtuvieron las condiciones óptimas para cada reacción de PCR, las cuales se detallan en *Materiales y métodos* (Tablas 3-3 y 3-4).

Para las cepas Cmm82, Cmm148, Cmm111 y Cmm112 se obtuvieron los productos de amplificación del tamaño esperado para cada reacción de PCR ensayada. Sin embargo, con la cepa Cmm17 sólo se obtuvo el producto esperado en la reacción correspondiente a la amplificación de la región ITS.

4.3 Detección de Cmm mediante Q-PCR

4.3.1 Evaluación de la eficiencia de los kits de Q-PCR

Para este análisis se evaluaron estándares de ADN en un rango de concentraciones de 10 ng/μl a 1 pg/μl para poder comparar la eficiencia de los kits. En la Figura 4-9 se presentan los gráficos de intensidad de fluorescencia vs. ciclos y sus curvas de calibración correspondientes, para cada kit de Q-PCR evaluado.

Todos los kits lograron amplificar los cinco estándares de ADN evaluados. A partir de las curvas de calibración, se puede decir que la correspondiente al kit *Quanti-Tec* fue la que mostró mejor eficiencia (102%). A su vez, con este kit se obtuvieron los menores valores de Cq (Tabla 7-3 en el *Apéndice*). Por lo tanto, este fue el kit elegido para posteriores corridas.

Resultados

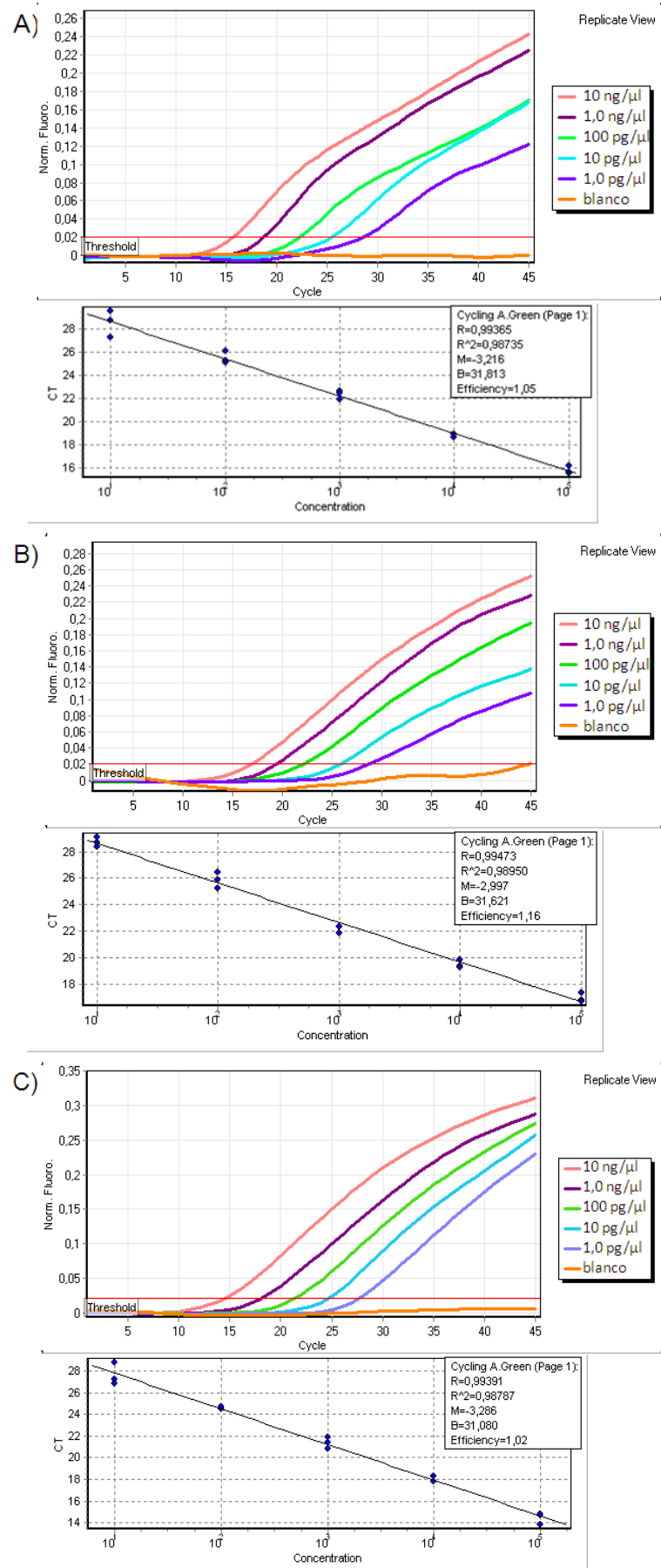


Figura 4-9 (Página anterior). Gráficos de Intensidad de fluorescencia vs ciclos (en escala lineal) y sus correspondientes curvas de calibración, para cada kit evaluado. A: *Probe fast (KAPA)*; B: *Rotor-Gene*; C: *Quanti-Tec*. Cada curva corresponde al promedio de los triplicados y representan la cantidad de ADN expresada en la leyenda. Los valores de Cq promedios de estas curvas se indican en el *Apéndice* (Tabla 7-7). Se estableció un valor umbral (*threshold*) de 0,02 en los 3 casos.

4.3.2 Evaluación de la sensibilidad del método a partir de estándares de ADN

Se determinó la sensibilidad del método en ADN a partir de estándares de concentración conocida. La sensibilidad quedó definida por la mayor dilución capaz de ser detectada, que en este caso se corresponde con 0,1 pg/μl de ADN. En la figura 4-10 se muestran los gráficos de intensidad de fluorescencia vs. ciclos en dos escalas diferentes (lineal y logarítmica) obtenidas mediante el análisis que realiza el software del equipo.

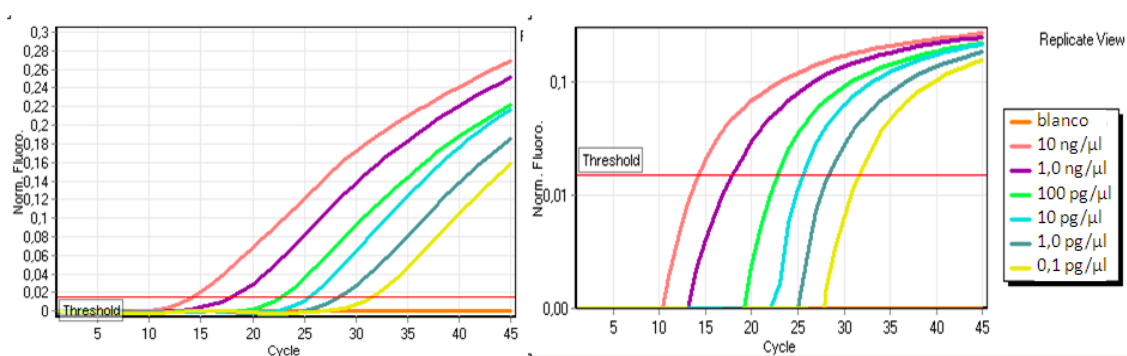


Figura 4-10. Gráficos de Intensidad de fluorescencia vs. ciclos en escala lineal (izquierda) y en escala logarítmica (derecha) para estándares de ADN en un rango de concentraciones de 10 ng/μl a 0,1 pg/μl de ADN. Cada curva corresponde al promedio de los triplicados y representa la concentración expresada en la leyenda. El valor umbral (*threshold*) fue fijado en 0,015.

A su vez se realizó la curva de calibración con los valores de Cq del gráfico anterior, obteniéndose una eficiencia del 95% (Figura 4-11).

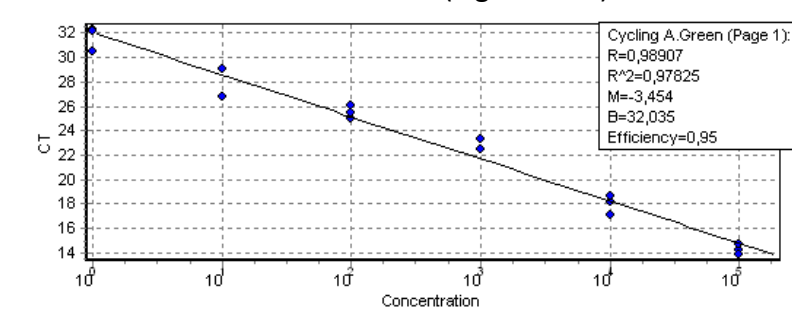


Figura 4-11. Curva de calibración para estándares de ADN de Cmm en un rango de concentraciones de 10 ng/μl a 0,1 pg/μl. Los puntos corresponden a cada valor de Cq de los triplicados para cada estándar y los valores se indican en el *Apéndice* (Tabla 7-8).

4.3.3 Evaluación de la sensibilidad del método en suspensiones celulares de Cmm

Se evaluó la sensibilidad de detección del método sobre diluciones seriadas de un cultivo puro de Cmm en un rango de concentraciones de 10^8 a 1 ufc/ml. En la Figura 4-12 se muestra el gráfico de intensidad de fluorescencia vs. ciclos para las 8 diluciones de Cmm, los controles positivos de ADN y un control negativo sin ADN. Se muestran las curvas correspondientes al promedio de los triplicados (*Replicate View*). Los controles positivos dieron de acuerdo a lo esperado, y el control negativo dio por debajo del umbral.

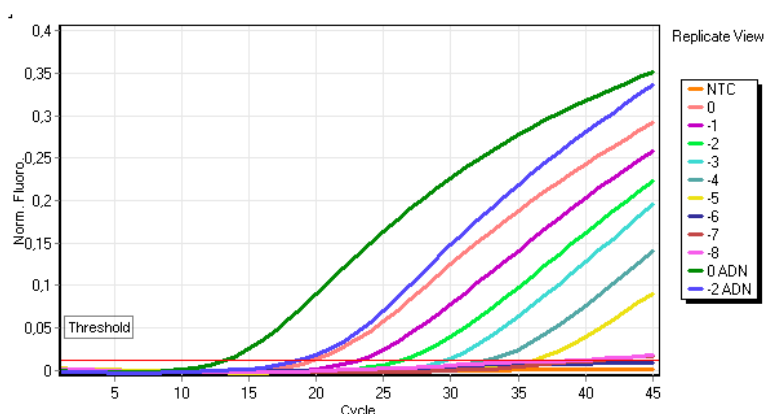


Figura 4-12. Gráfico de intensidad de fluorescencia vs. ciclos de las diluciones de Cmm en SF (escala lineal). Los números 0 a -8 representan las diluciones correspondientes a las concentraciones de Cmm que van desde $1,1 \times 10^8$ ufc/ml (dilución 0) a 1,1 ufc/ml (dilución -8). 0 ADN y -2 ADN corresponden a los controles positivos de ADN (estándares de concentración 10 ng/ μ l y 100 pg/ μ l) y NTC (*No Template Control*) al control negativo sin ADN. El valor umbral en este caso fue fijado en 0,012.

En la gráfica puede verse que el límite de detección confiable está en la dilución -5, ya que corresponde a la mayor dilución en la cual se detecta amplificación (luego de la dilución -6 no hay aumento de fluorescencia). Según el recuento realizado en placas de NBY esta dilución corresponde a una concentración de Cmm de $1,1 \times 10^3$ ufc/ml.

A partir de este gráfico, se realizó la curva de calibración correspondiente incluyendo hasta la dilución -5, obteniéndose una eficiencia del 99% (Figura 4-13).

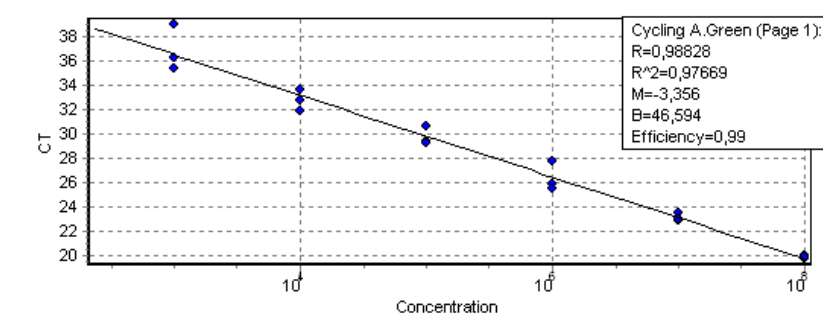


Figura 4-13. Curva de calibración para la cuantificación de Cmm en cultivo puro. Se utilizaron diluciones seriadas de Cmm en un rango de concentraciones de $1,1 \times 10^8$ a $1,1 \times 10^3$ ufc/ml. Los valores de Cq de los triplicados se indican en el Apéndice (Tabla 7-9).

4.3.4 Detección de Cmm en extracto de semillas por Q-PCR directa

En la Figura 4-14, se muestran los resultados de la detección directa de Cmm en diluciones seriadas al décimo en extracto de semilla (ES) y en suero fisiológico (SF). Se muestran las curvas correspondientes al promedio de los duplicados (*Replicate View*).

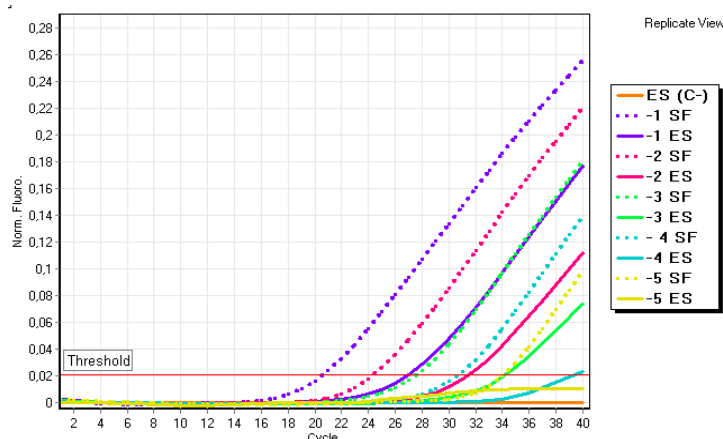


Figura 4-14. Gráfico de intensidad de fluorescencia vs ciclos de las diluciones de Cmm en SF y ES (en escala lineal). Los números 0 a -5 representan las diluciones correspondientes a las concentraciones de Cmm que van desde $6,5 \times 10^6$ (dilución -1) a $6,5 \times 10^2$ ufc/ml (dilución -5). ES corresponde al extracto de semilla sin inocular (control negativo). Los controles positivos (ADN) y el blanco (NTC) no se muestran. El valor umbral en este caso fue fijado en 0,02. Los valores de Cq correspondientes a cada curva y a los controles se indican en el Apéndice (Tabla 7-10).

A partir de este gráfico, se puede establecer que el límite de detección de Cmm en el extracto de semillas es la dilución -3, que según el recuento realizado se corresponde con una concentración de Cmm de $6,5 \times 10^4$ ufc/ml de extracto ($6,5 \times 10^5$ ufc/g de semilla). Sin embargo, la detección en SF es posible hasta la dilución -5 ($6,5 \times 10^2$ ufc/ml), un valor similar al observado en el ítem 4.3.3 donde la sensibilidad de detección en cultivo puro fue de $1,1 \times 10^3$ ufc/ml. Por lo tanto se puede concluir que la matriz donde se realiza la detección inhibe la amplificación en 2 órdenes de magnitud con respecto a la detección en cultivo puro.

La curva de calibración para la cuantificación de Cmm en ES mediante detección directa del patógeno presentó una eficiencia de 87% y se muestra en la Figura 4-15.

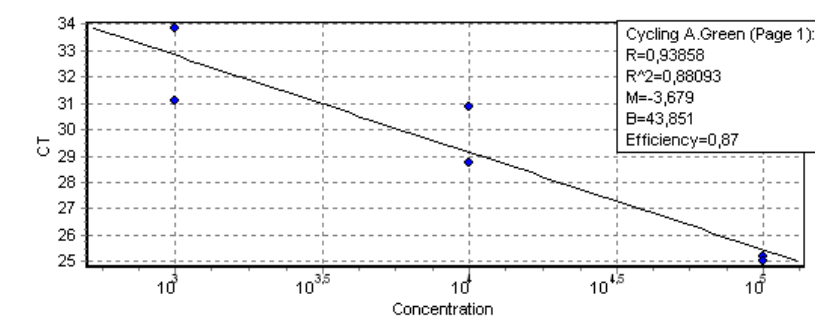


Figura 4-15. Curva de calibración para la cuantificación de Cmm en extracto de semilla. Se utilizaron las diluciones -1 a -3 correspondientes a un rango de concentraciones de $6,5 \times 10^6$ a $6,5 \times 10^4$ ufc/ml. El valor umbral en este caso fue fijado en 0,02. Los valores de Cq correspondientes a los duplicados se indican en el Apéndice (Tabla 7-11).

La curva de calibración construida a partir de las diluciones 0 a -5 en suero fisiológico tuvo una eficiencia del 99%; igual a la observada en la curva de la Figura 4-13, donde se analizó la sensibilidad de detección en cultivo puro. La curva obtenida a partir de las diluciones en extracto de semilla, no tiene una eficiencia tan buena como la que se obtiene en cultivo puro (87% en ES contra 99% en SF), y además se utilizan menos puntos de la gráfica, dado que en ES las suspensiones más diluidas no son detectadas (el Cq está por debajo del umbral).

4.3.5 Detección de Cmm en extracto de semillas por BIO-Q-PCR

Para mejorar la sensibilidad de detección de Cmm en semilla de tomate se evaluó la estrategia de BIO-Q-PCR. Para ello, se optimizaron las condiciones para la etapa de enriquecimiento selectivo previa a la amplificación por Q-PCR. En una primera etapa, cuatro medios de cultivo selectivos fueron evaluados según la capacidad de inhibición de la flora asociada a la semilla (Figura 4-16), y a la capacidad de crecimiento del patógeno de interés (Figura 4-17).

En la Figura 4-16, donde se sembró el extracto de semilla sin inocular (control sin Cmm), se observa que en todos los medios se desarrollan diversos microorganismos asociados a las semillas de tomate. Sin embargo, la inhibición del crecimiento de la flora asociada, es mayor en los medios SCM y mSCM.

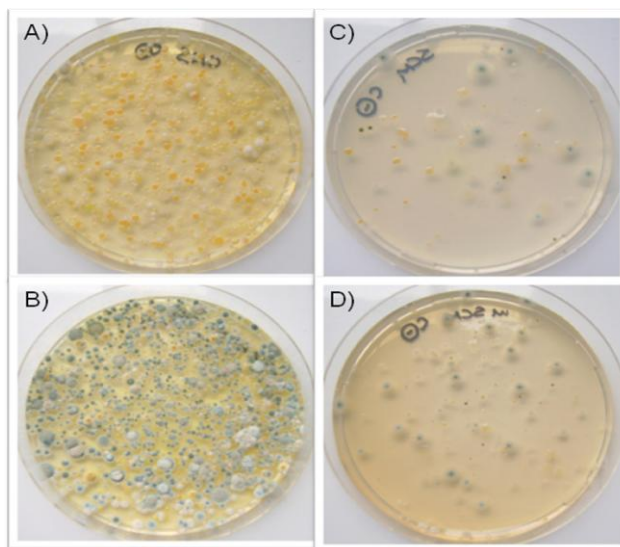


Figura 4-16. Placas sembradas con extracto de semilla de tomate en distintos medios. A: CNS, B: D2ANX, C: SCM, y D: mSCM. Las placas fueron incubadas durante 6 días, a 28°C.

Además, se observó que Cmm se desarrolla rápidamente en D2ANX, ya que a los 3 días de incubación ya se observa un buen crecimiento; y un poco más lentamente en CNS (4 días). En estos dos medios, las colonias de Cmm son medianas y amarillas. Por otro lado, en SCM y mSCM, Cmm se desarrolla un poco más lento (5 días) y las colonias son más chicas y de color crema (Figura 4-17).

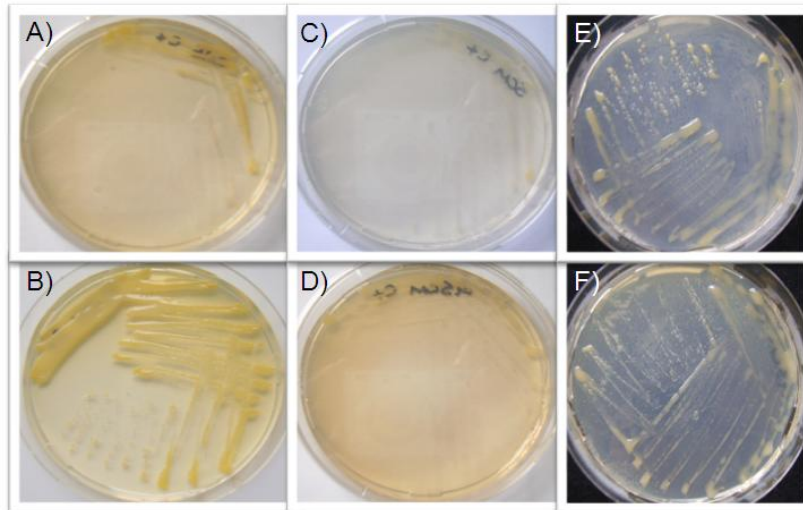


Figura 4-17. Desarrollo de Cmm en distintos medios y tiempos de incubación (a 28°C). A: CNS (6 días), B: D2ANX (6 días), C: SCM (6 días), D: mSCM (6 días), E: SCM (15 días) y F: mSCM (15 días).

En base a los resultados obtenidos se seleccionaron los medios SCM y mSCM para ser evaluados en el procedimiento de BIO-Q-PCR. También se evaluaron distintos tiempos de incubación para la etapa de enriquecimiento (3 y 4 días). En la Figura 4-18 se muestran los resultados de la BIO-Q-PCR cuya etapa de enriquecimiento se realizó en medio SCM durante 3 y 4 días.

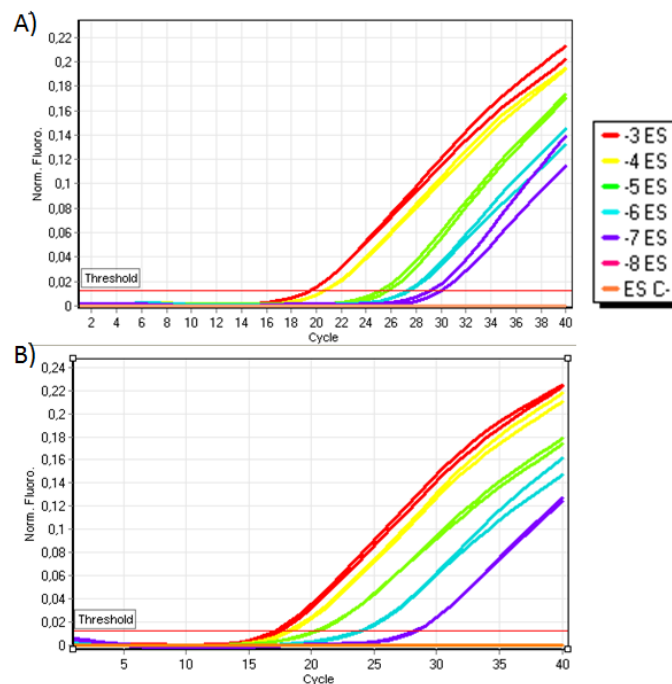


Figura 4-18. Gráfico de intensidad de fluorescencia vs ciclos (escala lineal) de las diluciones de Cmm en ES con el agregado de la etapa de enriquecimiento (BIO-Q-PCR). La incubación de las suspensiones se realizó en medio SCM durante 3 días (A) y 4 días (B). Los números de la leyenda representan las diluciones correspondientes a las concentraciones de Cmm que van desde $5,5 \times 10^4$ (dilución -3) a 0,55 ufc/ml (dilución -8). ES corresponde a la matriz semilla sola, sin inocular (control negativo). El valor umbral en este caso fue fijado en 0,012. Los valores de Cq de los duplicados se indican en el Apéndice (Tabla 7-12).

El límite de detección logrado mediante la estrategia de BIO-Q-PCR para los dos tiempos de incubación evaluados fue la dilución -7, correspondiente a 5,5 ufc/ml de extracto (55 ufc/g de semilla). La siguiente dilución (-8) no fue detectada (en la figura no se ve porque coincide con el control negativo). Esto coincide con el resultado observado en las placas de enriquecimiento, donde luego de 10 días de incubación se observaron colonias de Cmm hasta la dilución -7. Se verificó la identidad de estas colonias mediante amplificación por PCR convencional del gen *tomA*. En el medio SCM a los 10 días de incubación las colonias de Cmm son grandes, de color crema y mucosas (Figura 4-19).

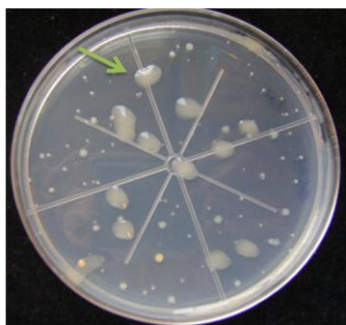


Figura 4-19. Aspecto morfológico de las colonias de Cmm en medio SCM luego de 10 días de incubación a 28°C (indicada por la flecha). La placa corresponde a la dilución -6 de Cmm en extracto de semilla.

Los resultados de estos gráficos, permiten concluir que 3 días de incubación son suficientes para detectar el patógeno mediante BIO-Q-PCR, ya que con una incubación de 4 días se obtiene el mismo nivel de sensibilidad y se alarga el tiempo de análisis. La incubación en medio mSCM presentó resultados similares (no se muestra).

4.3.6 Análisis de lotes de semilla nacional

En primera instancia se evaluaron los 5 lotes de semillas en extractos realizados a partir de muestras de 2.000 semillas (6g). En este ensayo, se evaluó simultáneamente una curva con estándares de cantidades conocidas de Cmm, de manera de contar con controles positivos. También se evaluó el extracto de semilla sin inocular como control negativo. En la Figura 4-20 se observa que todas las muestras dieron negativas tanto en la detección directa, como en la BIO-Q-PCR.

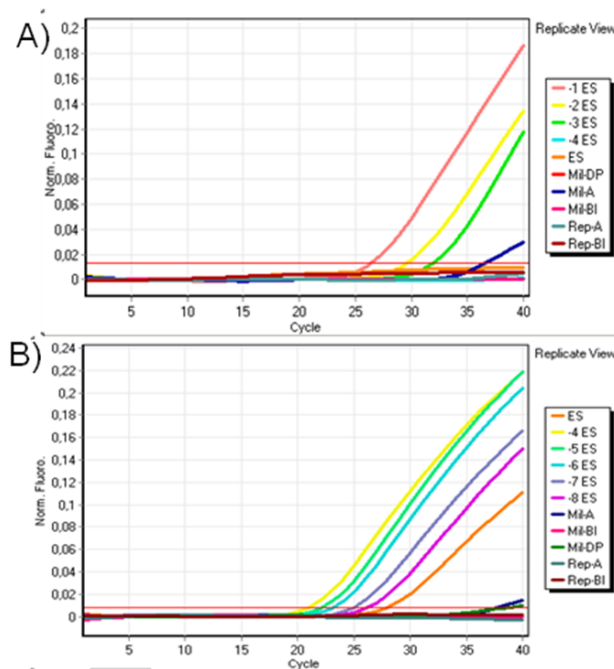


Figura 4-20. Gráficos de intensidad de fluorescencia vs ciclos para el análisis de los lotes de semillas nacionales a partir de muestras de 2.000 semillas. A: detección por Q-PCR directa, B: detección por BIO-Q-PCR. En la leyenda se indican los colores utilizados para cada muestra y los estándares de cantidades conocidas de Cmm utilizados como controles positivos. ES: Extracto de semillas de tomate sin inocular (control negativo).

En el caso de la BIO-Q-PCR se detectó contaminación con Cmm en el extracto de semillas sin inocular (control negativo) y como consecuencia en los estándares realizados a partir del mismo extracto. A pesar de esto ninguna de las muestras presentó valores de C_q por encima del umbral, por lo que se consideraron muestras no contaminadas con el patógeno.

Posteriormente, los lotes de semilla fueron evaluados tomando una muestra de tamaño mayor (5.000 semillas o 17 g) con tres de estas muestras (Rep-A, Mil-A y Mil-DP). Las dos muestras restantes se evaluaron nuevamente con 2.000 semillas ya que la cantidad de muestra era insuficiente para hacer una toma de 5000. En esta oportunidad, se evaluaron 2 controles de ADN como controles positivos y un extracto de semillas sanas sin inocular como control negativo (Figura 4-21).

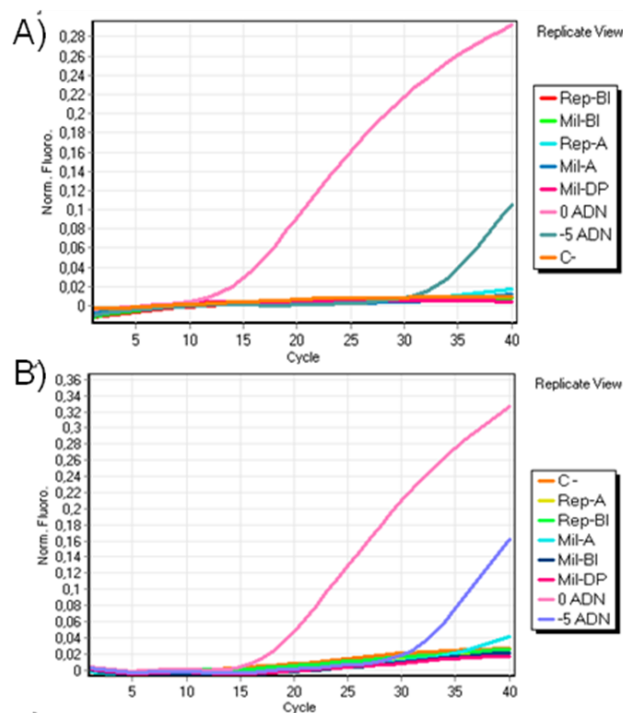


Figura 4-21. Gráficos de intensidad de fluorescencia vs ciclos para el análisis de los lotes de semillas nacionales a partir de muestras de 5.000 semillas. A: detección por Q-PCR directa, B: detección por BIO-Q-PCR. En la leyenda se indican los colores utilizados para cada muestra y los controles positivos y negativos utilizados. ES: Extracto de semillas de tomate sin inocular (control negativo).

Los resultados de este ensayo también dieron que todas las muestras eran negativas, por lo que no estaban contaminadas con Cmm.

5 - DISCUSIÓN

5.1 Pruebas de patogenicidad

Se comprobó la patogenicidad en tomate de 4 cepas uruguayas de Cmm (Cmm82, Cmm148, Cmm111 y Cmm112). En cuanto a la concentración del inóculo utilizada para las pruebas, se puede decir que la misma fue suficiente para el desarrollo de la enfermedad, y que se requieren al menos 14 días para registrar los primeros síntomas. Los síntomas observados y la progresión de la enfermedad en plantas de tomate coincide con los reportados para otras cepas de Cmm (Borboa Flores *et al.*, 2009).

5.2 Identificación de las cepas por métodos moleculares

Mediante la amplificación y secuenciación del gen de ARNr 16S se confirmó la identidad de todas las cepas, a excepción de la cepa Cmm17 la cual pertenece a la especie *Arthrobacter nicotinovorans*. Este resultado coincide con lo observado en las pruebas de patogenicidad, ya que no se observaron síntomas en las plantas inoculadas con la misma. Dicha especie, forma parte de la flora asociada al tejido vegetal del cual normalmente se aísla el patógeno.

La amplificación con *primers* dirigidos a la región ITS y a varios genes de patogenicidad de Cmm permitió confirmar estos resultados. Para las cepas Cmm82, Cmm148, Cmm111 y Cmm112, se obtuvieron los productos de amplificación del tamaño esperado según el par de *primers* utilizado, confirmando así la identidad de estas cepas así como su patogenicidad. Por otro lado, para la cepa Cmm17 no se obtuvo amplificación de ningún gen de patogenicidad de Cmm, lo cual era de esperar dados los resultados obtenidos previamente para esta cepa. Sin embargo, en la amplificación con *primers* dirigidos a la región ITS se obtuvo una banda del tamaño esperado para cepas de Cmm. Este resultado indicaría una baja especificidad de los *primers* utilizados. A su vez, algunas de estas reacciones fueron optimizadas, obteniéndose las condiciones ideales de amplificación con cada par de *primers*. Estas reacciones podrán ser utilizadas para la caracterización de nuevas cepas de Cmm aisladas en Uruguay.

Las reacciones cuyos *primers* están dirigidos a genes presentes en la isla de patogenicidad del cromosoma (*tomA*, *ppaA*, *chpC*) o al ITS generalmente mostraron bandas más intensas que aquellos dirigidos a genes presentes en los plásmidos. Esto probablemente se debe a la mayor cantidad de ADN genómico que de ADN plasmídico obtenida a partir del protocolo clásico de extracción de ADN, así como también a partir del kit comercial.

5.3 Detección de Cmm mediante Q-PCR

La PCR en tiempo real se ha convertido en un estándar de oro en el diagnóstico de fitopatógenos. Se han desarrollado varios ensayos de Q-PCR para la detección de

bacterias fitopatógenas incluyendo *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* en tubérculos de papa (Schaad *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2000). Sus ventajas sobre la PCR convencional garantizan su uso para el análisis de sanidad de semillas, ya que presenta mejor sensibilidad y especificidad. Todas las reacciones de Q-PCR dieron buenos resultados lo que confirma la especificidad de los *primers* y sonda utilizados; y que las condiciones optimizadas por Luo *et al.* (2008) y ajustadas a los kits comerciales son adecuadas.

Los tres kits de Q-PCR evaluados dieron buenos resultados con los *primers* y sonda utilizados. Está establecido que, si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se analiza una muestra 10 veces más diluida, el valor de C_q aumenta aproximadamente 3,3 ciclos (Microbial, 2009). En este caso, la gráfica de intensidad de fluorescencia vs. ciclos del kit *Quanti-Tec* mostró las curvas con la forma más adecuada y cuyos valores de C_q resultaron óptimos.

La evaluación de la sensibilidad del método desarrollado se realizó en una primera instancia sobre ADN de Cmm, luego en cultivo puro, y finalmente en la matriz donde se realiza la detección (extracto de semillas de tomate).

Ambos tipos de presentaciones de las gráficas de intensidad de fluorescencia vs. ciclos (escala lineal y escala logarítmica) son válidas para interpretar los resultados. El gráfico en escala logarítmica resulta útil para ajustar manualmente el valor umbral (*threshold*) dentro de la zona exponencial de la curva ya que aparece como una recta. Sin embargo, el gráfico en escala lineal es más utilizado y se asemeja más a una curva de amplificación por PCR (Microbial, 2009).

Para la detección de Cmm mediante Q-PCR a partir de estándares de concentración conocida de ADN se obtuvo una sensibilidad de 0,1 pg/μl de ADN. A pesar de ser esta una buena sensibilidad de detección se podría haber realizado alguna dilución más para evaluar si era posible detectarla. En base al C_q obtenido para esta concentración de ADN (31,64), es probable que el método sea capaz de detectar hasta una dilución más (10 fg/μl). La eficiencia obtenida en la curva de calibración con estándares de ADN resultó buena (95%). Este tipo de curvas son útiles a la hora de cuantificar muestras desconocidas, siempre que el valor a ser cuantificado se encuentre dentro del rango lineal (óptimo) de la curva.

Sin embargo, puede ser más útil analizar la sensibilidad del método en cultivo puro, realizando la lisis celular previo a la amplificación por Q-PCR. De este forma, se evitan los pasos de extracción y purificación del ADN, lo cuales implican mayores costos y tiempos de análisis. El límite de detección logrado en cultivo puro fue del orden de 10³ ufc/ml, lo cual coincide con los límites de detección ya reportados (Zhao *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008).

La detección de microorganismos fitopatógenos a partir de extractos vegetales y reservorios naturales como el suelo y las fuentes de agua, es de vital importancia para garantizar las condiciones fitosanitarias de los sistemas agrícolas. En los últimos años, las técnicas de diagnóstico han evolucionado de manera tal que se han alcanzado

niveles de detección rápidos y confiables permitiendo incluso la detección asintomática en plantas y de inóculo en sitios de siembra; puntos críticos para cualquier programa de manejo integrado de enfermedades (Kageyama et al., 2003). Dado que las semillas infectadas con Cmm son la principal fuente de diseminación de la enfermedad causando epidemias importantes, el desarrollo de métodos de diagnóstico lo suficientemente sensibles tiene una gran importancia para el control de este patógeno.

En este trabajo se evaluó el potencial que presenta la detección molecular de Cmm en extractos de semillas de tomate. Para ello, se incorporó una etapa de enriquecimiento selectivo de la muestra previo a la amplificación por Q-PCR con el objetivo de aumentar la sensibilidad de detección. Por medio de este procedimiento, comúnmente denominado BIO-PCR, se logra generalmente disminuir la concentración de las sustancias inhibitoras al mismo tiempo que se aumenta el número de células diana. A pesar de que se prolonga el tiempo requerido para el análisis, ésta es una estrategia que generalmente se adopta para aumentar la sensibilidad del método, principalmente en los casos de detección sobre muestras donde el patógeno se encuentra presente en muy bajo número (Schaad *et al.*, 1999).

Dado que la matriz semilla donde se realiza la detección, naturalmente lleva consigo una flora asociada, es necesario contar con un medio selectivo que permita que nuestro patógeno de interés tenga un buen desarrollo y a su vez, que la flora saprofítica de la semilla no crezca o que al menos, no interfiera con el crecimiento de Cmm. Por lo tanto, al momento de elegir el medio más adecuado para usar en la etapa de enriquecimiento selectivo de la muestra, los elementos a tener en cuenta fueron, la rapidez y eficacia con la que se desarrolla el microorganismo de interés y el grado de inhibición de la flora asociada (Schaad *et al.*, 1999). En este trabajo, se evaluaron 4 medios selectivos para Cmm, dos de los cuales fueron elegidos según los criterios ya mencionados para realizar las reacciones de BIO-Q-PCR.

Para evaluar si la estrategia de BIO-Q-PCR es útil en la detección de Cmm en extracto de semillas, se realizó la comparación de la misma con la detección directa mediante Q-PCR en extracto de semillas. A su vez, en el caso de la detección directa, se comparó la detección en suero fisiológico con la detección en extracto de semillas para evaluar si este último presentaba un efecto inhibitor de la amplificación por PCR.

El límite de detección en extracto de semilla mediante Q-PCR directa fue de $6,5 \times 10^4$ ufc/ml. Tal como se observa en la Figura 4-14, el límite de detección en suero fisiológico fue de $6,5 \times 10^2$ ufc/ml. Por lo tanto se puede concluir que la matriz donde se realiza la detección inhibe la amplificación en 2 órdenes de magnitud con respecto a la detección en cultivo puro. La curva de calibración construida a partir de los estándares realizados en extracto de semillas no tiene una eficiencia tan buena (87%) como la que se obtiene al hacerla en cultivo puro (99%), lo cual es esperable debido a la complejidad de la matriz donde se realiza la detección. Esta última, presenta una gran variedad de compuestos que interfieren en la reacción de amplificación, por lo

que los valores de Cq obtenidos están más sujetos a error que aquellos valores obtenidos cuando la detección se realiza en suspensiones de un cultivo puro en suero fisiológico.

Como contrapartida, utilizando la estrategia de BIO-Q-PCR se logró mejorar notoriamente la sensibilidad de detección del método, ya que este aumentó 4 órdenes de magnitud (5,5 ufc/ml). Esto quiere decir, que mediante esta estrategia se logra eliminar a los inhibidores presentes en el extracto, además de aumentar el número de células diana. Tanto el medio SCM como el mSCM son adecuados para realizar la etapa de enriquecimiento. Estos medios se diferencian únicamente en la fuente de carbono principal (sacarosa en SCM y manosa en mSCM), lo cual no interfiere notoriamente en el crecimiento del patógeno. A su vez, se determinó que la sensibilidad del método no se ve afectada al disminuir el tiempo de incubación del enriquecimiento a 3 días, lo cual permite reducir los tiempos de análisis. Quedaría como perspectiva evaluar si se puede disminuir este tiempo de incubación a 2 días para disminuir aún más los tiempos de análisis.

En el caso de la BIO-Q-PCR no se construye la curva de calibración ya que la misma no estaría reflejando resultados reales en cuanto a la cantidad de Cmm presente en la muestra, debido a que la amplificación se realiza luego de que la bacteria se multiplica durante la etapa de enriquecimiento.

Los límites de detección logrados en la matriz semilla, pueden ser expresados de otras formas, por ejemplo: cantidad de semillas infectadas sobre una cantidad de semillas sanas, o cantidad de ufc por g de semilla (en lugar de por ml de extracto). Conociendo que para preparar el extracto se utilizaron 6 g de semillas los cuales se homogeneizaron en 60 ml de *buffer*, el límite de detección mediante Q-PCR directa es de $6,5 \times 10^5$ ufc/g de semilla y en el caso de la BIO-Q-PCR de 55 ufc/g de semilla.

Si conocemos una aproximación que establezca cuál es el nivel de contaminación en una semilla infectada, podemos conocer a cuántas semillas infectadas equivalen los límites de detección obtenidos. Esto es posible ya que se ha reportado que dicho nivel va desde 10^2 a 10^4 ufc/semilla (Fatmi y Schaad, 1988). En el caso de la BIO-Q-PCR suponiendo un nivel de contaminación de 10^3 ufc por semilla la detección es posible aún teniendo 1 sola semilla infectada en la muestra de 2.000. En este caso, la concentración en el extracto sería de 17 ufc/ml, la cual es mayor al límite de detección obtenido. A su vez, con la sensibilidad obtenida se puede suponer que aún analizando un lote de 10.000 semillas donde una de ellas estuviese contaminada, sería posible detectarla. Esto es importante ya que este nivel de contaminación (0,01%) es suficiente para iniciar una epidemia importante bajo condiciones favorables (De León *et al.*, 2011). Sin embargo, para afirmar esto habría que realizar el ensayo correspondiente ya que la extrapolación no es suficientemente precisa.

Actualmente, hay disponibles protocolos estándar para el análisis de semillas de tomate para evaluar la presencia de Cmm, en la EPPO y la *International Seed Federation* (ISF). Estos protocolos, adoptan un tamaño de muestra estándar,

recomendado por la *International Seed Testing Association* (ISTA), de 10.000 semillas, ya que estadísticamente representa el 95% de probabilidad de detectar un nivel de 0,03% de contaminación en el lote de semillas. Las semillas se pueden analizar en submuestras de 2.000. Sin embargo, las semillas de tomate importadas son muy costosas y no es viable utilizar tal cantidad de semillas para realizar la detección (De León *et al.*, 2011).

Las metodologías desarrolladas en este trabajo pueden ser utilizadas para el análisis de Cmm en muestras de semillas de tomate. Si tuviéramos muestras cuyo nivel de contaminación se encuentre por encima del límite de detección logrado mediante la detección por Q-PCR directa (10^5 ufc/g de semilla) los resultados se obtendrían rápidamente (1 día). Además, sería posible la cuantificación, o sea que podríamos establecer el nivel de contaminación presente en la muestra analizada mediante interpolación en la curva de calibración correspondiente. Sin embargo, si la muestra presenta niveles más bajos de contaminación (entre 55 y 10^5 ufc/g de semilla) sería necesario realizar la detección mediante BIO-Q-PCR lo que requiere un mayor tiempo de análisis (3 días) que se necesita para la etapa de enriquecimiento selectivo. Otra desventaja es que esta metodología no permite realizar la cuantificación ya que no existe una curva de calibración que nos permita interpolar el resultado. Sin embargo, la gran sensibilidad obtenida para este método, hace que sea especialmente adecuado para detectar muestras con bajo nivel de contaminación pero que aún representan un riesgo de diseminación del patógeno.

Finalmente, como aplicación a los métodos desarrollados, se realizó la detección de Cmm en 5 lotes de semilla nacional provenientes de distintas fuentes. Todas las muestras dieron por debajo del umbral de detección, tanto en la detección directa como en la detección por BIO-Q-PCR. Por lo tanto podemos afirmar que las muestras no se encuentran contaminadas (o su nivel de contaminación es menor a 55 ufc/g) y que pueden ser utilizadas en la producción de tomate.

6 – CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones

En primer lugar, se confirmó por métodos moleculares básicos la identidad de cepas de Cmm que afectaron al cultivo de tomate en Uruguay. Posteriormente, se desarrolló un método para la detección de Cmm en muestras de semilla de tomate por Q-PCR. Se evaluó la sensibilidad del método en extractos de semilla inoculados con diferentes concentraciones del patógeno, logrando un nivel de detección de hasta 55 ufc/g de semilla, implementando la estrategia de BIO-Q-PCR. Teniendo en cuenta el nivel de contaminación natural presente en las semillas infectadas por Cmm ($10^2 - 10^4$ ufc/semilla), se puede concluir que el método desarrollado es capaz de detectar la presencia de Cmm en muestras de 2.000 semillas que contengan 1 semilla infectada. Los resultados indican que la detección en semilla por Q-PCR directa solo es posible cuando las concentraciones del patógeno son altas (mayores a 10^5 ufc/g de semilla) y que la matriz semilla inhibe la amplificación en dos órdenes de magnitud ya que en cultivo puro el límite de detección fue de 10^3 ufc/ml. Por otro lado, se comprobó que la BIO-Q-PCR mejora notablemente la sensibilidad de detección de Cmm en muestras de semilla, logrando detectar hasta 55 ufc/g de semilla.

6.2 Perspectivas

Este método de diagnóstico podrá ser aplicado al control fitosanitario de lotes de semilla, así como también a la identificación de muestras que pueden actuar como reservorio del patógeno; contribuyendo así a evitar la diseminación de este patógeno a los cultivos de tomate en nuestro país.

Además se pretende desarrollar el método para la detección de Cmm en otro tipo de muestras que puedan actuar como reservorio del patógeno, como por ejemplo plantas jóvenes. Ya se han realizado algunos avances para evaluar la sensibilidad de detección en extracto de planta, obteniéndose resultados similares a los observados en extracto de semillas.

Por otro lado, también se realizará el primer relevamiento de las cepas de Cmm que afectan al cultivo de tomate en Uruguay, a partir del cual se podrá contar con una colección de cepas locales de Cmm caracterizadas en función de su patogenicidad en tomate y en base a la presencia o ausencia de genes relacionados con la virulencia. Esta colección podrá ser utilizada en futuros estudios que profundicen en la diversidad genética, mecanismos de virulencia, y epidemiología de este patógeno.

7 – APÉNDICE

7.1 Medios de cultivo

7.1.1 Medios de cultivo generales

Tabla 7-1. Composición del medio Agar caldo-nutriente extracto de levadura (NBY)

Caldo nutritivo	8,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Bacto Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Tabla 7-2. Composición del medio Agar nutriente dextrosa (NAD)

Agar nutritivo	23 g
Dextrosa	5 g
Agua destilada	1000 ml

Se realiza la toma en peso de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH del medio a 7,2. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C y se reparte en placas de Petri de 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

7.1.2 Medios de cultivo semi-selectivos

Tabla 7-3a. Composición del medio CNS (Gross and Vidaver, 1978)

Caldo nutritivo	8,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
LiCl	10,0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se realiza la toma en peso de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH del medio a 6,9. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C, se deja enfriar a 45-50°C y se agregan las soluciones que se indican a continuación las cuales fueron previamente esterilizadas por filtración.

Tabla 7-3b. Antibióticos del medio CNS.

Antibiótico	Concentración	Volumen agregado
Cicloheximida	10,0 mg/ml	4,0 ml
Ácido Nalidixico	10,0 mg/ml	2,5 ml
Polimixina β sulfato	10,0 mg/ml	3,2 ml
Glucosa	20 %	25 ml
MgSO ₄ , anhidro	124,0 mg/ml	1 ml

Se mezcla bien en matraz y se derrama en placas de Petri de a 15-20 ml. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

Tabla 7-4a. Composición del medio *Selective Clavibacter michiganensis* (SCM) (Fatmi y Schaad, 1988)

Sacarosa	10,0 g
Extracto de levadura	0,1 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
Acido Bórico	1,5 g
Agar, Bacto	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se realiza la toma en peso de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH del medio a 7,2. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C, se deja enfriar a 45-50°C y se agregan las soluciones que se indican a continuación las cuales fueron previamente esterilizadas por filtración.

Tabla 7-4b. Antibióticos del medio SCM.

Antibiótico	Concentración	Volumen agregado
Cicloheximida	100,0 mg/ml	2,0 ml
Ácido Nalidixico	10,0 mg/ml	1,0 ml
Ácido nicotínico	10 mg/ml	10,0 ml
Telurito de potasio	1 %	1,0 ml

Se mezcla bien en matraz y se derrama en placas de Petri de a 15-20 ml. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

El medio mSCM (Waters y Bolkan; 1992) es una modificación del medio SCM, pero se usa manosa en lugar de sacarosa y se elimina el telurito de potasio.

Tabla 7-5a. Composición del medio D2 ANX (Chun, 1982)

Glucosa (Dextrosa)	10 g
Hidrolizado de caseína	4 g
Extracto de levadura	2 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3 g
Trizma base	1-2 g
Agar (Difco)	15 g

Se realiza la toma en peso de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH del medio a 7,4. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C, se deja enfriar a 45-50°C y se agregan las soluciones que se indican a continuación las cuales fueron previamente esterilizadas por filtración.

Tabla 7-5b. Antibióticos del medio D2 ANX.

Antibiótico	Concentración	Volumen agregado
Ácido nalidíxico	10 mg/ml	0,3 ml
Cicloheximida	100 mg/ml	1 ml
Polimixina β sulfato	10 mg/ml	1,3 ml

Se mezcla bien en matraz y se derrama en placas de Petri de a 15-20 ml. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

7.2 Reactivos

(Sambrook and Russell, 2001)

Tabla 7-6. Composición del *Buffer* fosfato salino (PBS) pH 7,4

NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	2mM

Se disuelven 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ y 0,24 g de KH₂PO₄ en 800 ml de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH del medio a 7,4 mediante el agregado de HCl, y se afora a 1000 ml. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C, y luego se conserva a 4°C.

Tris-HCl 1M pH 8.0

12.1g de Tris-Cl, 95.8 de agua destilada y en campana se agrega 4.2ml de HCl. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

Tampón TE pH 8.0

0.2ml de EDTA 0.5M pH 8.0, 1ml de la solución de Tris-Cl 1M pH 8.0, se lleva a 100ml con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

Tampón TE25S pH 8,0

10.3g de sacarosa, 5ml de solución de EDTA 0.5M pH 8.0, 2.5ml de solución de Tris-Cl 1M pH 8.0, se ajusta el pH a 8.0 y se lleva a 100ml con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

NaCl 5M

14.6g de NaCl en 50ml de agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (15 minutos a 121°C).

Solución CTAB/NaCl (0.7M NaCl y 10% CTAB)

4.1g de NaCl en 100ml de agua destilada, agregar y disolver en baño a 55°C 10g de CTAB.

7.3 Tablas de valores de Cq de las reacciones de Q-PCR

Tabla 7-7. Evaluación de la eficiencia de los kits de Q-PCR (sólo promedios) (Figura 4-9)

Concentración de ADN	Valores de Cq promedios		
	<i>Quanti-Tec</i>	<i>KAPA</i>	<i>Rotor-Gene</i>
10 ng/μl	14,46	15,75	16,93
1,0 ng/μl	18,09	18,8	19,48
100 pg/μl	21,37	22,32	22,16
10 pg/μl	24,64	25,47	25,87
1,0 pg/μl	27,59	28,49	28,72

Tabla 7-8. Evaluación de la sensibilidad del método a partir de estándares de ADN (Figura 4-11)

Nombre	Cq	Cq promedio
blanco	NEG (NTC)	
blanco	NEG (NTC)	
blanco	NEG (NTC)	
10 ng/μl	14,26	14,25
10 ng/μl	13,85	
10 ng/μl	14,63	
1,0 ng/μl	18,11	17,94
1,0 ng/μl	18,66	
1,0 ng/μl	17,04	
100 pg/μl	23,25	22,76
100 pg/μl	22,51	
100 pg/μl	22,5	
10 pg/μl	26,04	25,5
10 pg/μl	25	
10 pg/μl	25,45	
1,0 pg/μl	29,07	28,32
1,0 pg/μl	29,11	
1,0 pg/μl	26,79	
0,1 pg/μl	30,45	31,64
0,1 pg/μl	32,29	
0,1 pg/μl	32,19	

Tabla 7-9. Evaluación de la sensibilidad del método en cultivo puro (Figura 4-13)

Nombre	Cq	Cq promedio
blanco	29,76	29,76
blanco	NEG (NTC)	
blanco	NEG (NTC)	
0	19,98	19,85
0	19,75	
0	19,83	
-1	23,49	23,15
-1	22,93	
-1	23,04	
-2	25,87	26,39
-2	25,52	
-2	27,79	
-3	30,65	29,76
-3	29,36	
-3	29,27	
-4	31,88	32,78
-4	32,81	
-4	33,65	
-5	39,03	36,89
-5	36,27	
-5	35,37	

Tabla 7-10. Detección de Cmm en matriz semilla por Q-PCR directa (Figura 4-14)

Nombre	Cq	Cq promedio
ES	NEG (NTC)	
ES	NEG (NTC)	
-1 SF	20,38	20,52
-1 SF	20,65	
-1 ES	26,92	26,9
-1 ES	26,89	
-2 SF	24,38	24,28
-2 SF	24,17	
-2 ES	30,45	31,55
-2 ES	32,64	
-3 SF	27,76	27,49
-3 SF	27,23	
-3 ES	33,02	34,3
-3 ES	35,58	
-4 SF	31,14	30,61
-4 SF	30,07	
-4 ES	36,72	36,72
-4 ES	NEG (NTC)	
-5 SF	33,55	34,08

-5 SF	34,6	
-5 ES	34,02	34,02
-5 ES	NEG (NTC)	
-6 SF	NEG (NTC)	
-6 SF	NEG (NTC)	
-6 ES	NEG (NTC)	
-6 ES	NEG (NTC)	
-1 ADN	18,35	18,67
-1 ADN	19	
-5 ADN	33,3	33,03
-5 ADN	32,76	
blanco	NEG (NTC)	
blanco	NEG (NTC)	

Tabla 7-11. Detección de Cmm en matriz semilla por q-PCR directa (Figura 4-15)

Nombre	Cq	Cq promedio
ES	NEG (NTC)	
ES	NEG (NTC)	
-1 ES	25,21	25,12
-1 ES	25,02	
-2 ES	28,75	29,8
-2 ES	30,86	
-3 ES	31,11	32,48
-3 ES	33,84	

Tabla 7-12. Detección de Cmm en matriz semilla por BIO-Q-PCR (Figura 4-18)

Nombre	3 días de incubación		4 días de incubación	
	Cq	Cq promedio	Cq	Cq promedio
-3 ES	19,39	19,41	17,02	17,22
-3 ES	19,43		17,43	
-4 ES	20,67	20,62	18,34	18,22
-4 ES	20,57		18,1	
-5 ES	25,69	25,4	20,37	20,35
-5 ES	25,1		20,34	
-6 ES	27,27	27,34	23,98	23,87
-6 ES	27,4		23,77	
-7 ES	29,05	29,52	28,25	28,2
-7 ES	29,99		28,16	
-8 ES	NEG (NTC)		NEG(NTC)	
-8 ES	NEG (NTC)		NEG(NTC)	
ES C-	NEG (NTC)		NEG(NTC)	
ES C-	NEG (NTC)		NEG(NTC)	

8- BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. University of Florida. Elsevier Academic Press, p 651-653.
- Avrova A., Venter E., Birch P.R.J. and Whisson S.C. 2003. Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. Fungal Genetics and Biology, 40: 4-14.
- Bach H. J., Jessen I., Schloter M., Munch J. C. 2003. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. Journal of Microbiological Methods 52, 85–91.
- Banchemo L., Campelo E., Giménez G., González P., Maeso D., Paullier J. 2002. Programa de producción integrada. Directivas y Normas. Tomate a campo. Consultado 15 agosto 2012. Disponible en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/PI/Index.html>
- Bermpohl, A., Dreier J., Bahro R., and Eichenlaub R. 1996. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. Microbiol. Res. 151:391–399.
- Biggerstaff C. M., Gleason M. L., Braun E. J. 2000. Refinement of a nondestructive tomato seed assay for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using seed fiber. Seed Science and Technology 28, 261–9.
- Borboa Flores J., Rueda Puente E. O., Acedo Félix E., Ponce J. F., Cruz M., Grimaldo Juárez O., García Ortega A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del Estado de Sonora, México. Revista Fitotecnica Mexicana, Vol. 32, Núm. 4, pp. 319-326.
- Burokiene D., 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. Agronomy Research 4: 151-154.
- Chang R.J., Ries S.M., Pataky J.K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. Phytopathology 81:1276-1281.
- De León L., Rodríguez A., López M.M., Siverio F. 2007. Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. Journal of Applied Microbiology 104, 776–786.
- De León L., Siverio F., López M.M., Rodríguez A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. Plant disease, Vol. 95, Núm. 11.
- De León, L., Siverio, F., López, M. M., and Rodríguez, A. 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. Crop Prot. 27:1277-1283.
- Dreier J., Bermpohl A., Eichenlaub R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology, 85, 462–468.

- Dreier, J., Meletzus, D., Eichenlaub, R., 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Mol. Plant Microbe Interact. 10, 195–206.
- EPPO/OEPP 2010. Data sheets on quarantine pest. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Fatmi M. and Schaad N. W. 1988. Semiselective Agar Medium for Isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from Tomato Seed. Phytopathology 78:121-126.
- Fatmi, M., and Schaad, N. W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. Plant Pathology, 51, 149–154.
- Gartemann K. H., Abt B., Bekel T., Burger A., Engemann J., Flügel M., Gaigalat L., Goesmann A., Graffen I., Kalinowski J., Kaup O., Kirchner O., Krause L., Linke B., McHardy A., Meyer F., Pohle S., Rückert C., Schneiker S., Zellermann E. M., Pühler A., Eichenlaub R, Kaiser O., and Bartels D. 2008. The Genome Sequence of the Tomato-Pathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 Reveals a Large Island Involved in Pathogenicity. Journal of Bacteriology, p. 2138–2149.
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Grefen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. Journal of Biotechnology, 106, 179–191.
- Gitaitis R., Beaver R.W., Voloudakis A.E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. Plant Dis. 75:834-838.
- Gleason M., Gitaitis R. D., Ricker M. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. Plant Disease, Vol. 77, 1069–1076.
- Gross, D. y Vidaver A. K. 1978. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. Phytopathology 69:82-87.
- Guía de interpretación de resultados. Sistemas de detección de patógenos por pcr a tiempo real. Microbial, 2009. Consultado el 3 de mayo de 2012. Disponible en: http://www.microbialsystems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SP_Av2.pdf
- Hadas R., Kritzman G., Kleitman F., Gefen T., Manulis S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. Plant Pathology, 54, 643–649.
- Jaramillo, J.; Rodríguez, V. P.; Guzmán, M.; Zapata. M.; Rengifo, T. 2007. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de tomate bajo condiciones protegidas. FAO, Gobernación de Antioquia, Mana, Corpoica, Centro de Investigación “La Selva”.

- Kageyama K., Komatsu T., Suga H. (2003). Refined PCR protocol for the detection of plant pathogens in soil. *Journal of General Plant Pathology*. 69:153-160.
- Kleitman F., Barash I., Burger A., Iraki N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K. H., Einchenlaub, R., Manulis-Sasson, S. 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur. J. Plant Pathology* 121:463–475.
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. John Wiley and Sons. New York.
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., *et al.* 1998. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88, 862–868
- Luo L. X., Walters C., Bolkan H., Liu X. L., Li J. Q. 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathology* 57, 332–337.
- Maeso D., Fernández A., Walasek W. 2009. Evaluación de métodos de transmisión de cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) en condiciones de invernadero. Trabajo presentado en la Jornada Anual de Resultados Experimentales en el cultivo del tomate, Rincón del Colorado, 2009.
- Maeso D., Walasek W. 2010. Evaluación de métodos de desinfección de semillas para disminuir la incidencia del cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Trabajo presentado en el 12 Congreso Nacional de Horti-Fructicultura, Montevideo, 2010.
- Meletzus, D., A. BERPPOHL, J. Dreier, and R. Eichenlaub. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bacteriol.* 175:2131–2136.
- Meletzus, D., and Eichenlaub, R. 1991. Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector. *J. Bacteriol.* 173:184-190.
- MGAP/DIEA-DIGEGR. Anuario estadístico agropecuario 2011. Encuesta hortícola zafra 2009/2010.
- Ozdemir, Z. 2005. Development of a Multiplex PCR Assay for Concurrent Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Plant Pathology Journal* 4 (2): 133-137.
- Roberts C.A., Dietzgen R. G., Heelan L. A., Maclean D.J. 2000. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *Journal of Virological Methods*. Volume 88, Issue 1, July 2000, Pages 1–8.
- Saettler A. W., Schaad N. W. y Roth D. A. 1989. Detection of bacteria in seed and other planting material. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

- Sambrook J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3th ed. Cold Spring Harbor, NY. Vol. 3. Appendix 1.
- Sandoval, C. 2004. Manual Técnico. Manejo integrado de Enfermedades en cultivos hidropónicos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Chile.
- Schaad N. W., Jones J. B., and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Plant Pathogenic Bacteria. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- Schaad N.W., Berthier S.Y., Sechler A., 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83: 1095-1100.
- Schaad N.W., Cheong S.S., Tamaki S., Hatziloukas E., Panopoulos N.J. 1995. A combined biological amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. Phytopathology, 85: 243–248.
- Tlatilpa M.I. 2010. Estrategias de manejo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en jitomate. Tesis Maestría en Ciencias. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Campus Montecillo, Texcoco, Edo de México.
- Tsiantos J. A., 1987. Epiphytic survival of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* on tomato leaves. Microbios Lett. 34:59-66.
- Valasek M. A. y Repa J. J. 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education 29: 151-159.
- Waters, C. M. y Bolkan H. A. 1992. An improved semi-selective medium for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. Phytopathology 82: 1072. (Abstract)
- Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N., 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* from potato tissue by post enriched TaqMan™ PCR. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 33: 381- 383.
- Xu X., Miller S. A., Baysal-Gurel F., Gartemann K. H., Eichenlaub R., Rajashekara G. 2010. Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. Appl. Environ. Microbiol. 76:3978-3988.
- Zhang, Y., Yang W., Li Y., Liu D., Zhang T. 2009. A multiplex PCR method for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with co-amplification of its host DNA. Front. Agric. China, 3(2): 140–145.
- Zhao W. J., Chen H. Y., Zhu S. F., Xia M. X., Tan T. W. 2007. One-step detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato seeds using a Taqman probe. Journal of Plant Pathology, 89 (3), 349-351.

AGRADECIMIENTOS:

Primero que nada quiero agradecerle de forma muy especial a María Inés por ser mi gran orientadora, por estar siempre a las órdenes ante cualquier inquietud de mi parte y por saber acoplar su trabajo con su familia, especialmente por el nacimiento de Pedro que se juntó con mi tesis.

Otro agradecimiento especial es para María Julia, mi gran co-orientadora, por darme la oportunidad de formar parte de un grupo excelente de investigadores y personas, además de trasmitirme sus valorables conocimientos.

A todos mis compañeros y amigos del 12, por hacer que el ambiente de trabajo sea alegre y por estar siempre dispuestos a responder mis preguntas. En particular le agradezco a Analía y Rodrigo, por trasmitirme todos sus conocimientos y experiencias con el real time; por ayudarme a entender y analizar las gráficas! También a Gianna y Sonia por estar siempre dispuestas a contestar dudas y transmitirme sus conocimientos. Y al resto de los integrantes de la cátedra por todos los momentos compartidos.

A la ANII por otorgarme la beca de iniciación a la investigación.

A mis compañeros de "lucha"; Fede, Ponchi, Guille, Rodri, las Sofis, Vero, Eli y Hugo; y al resto de mis compañeros de facultad, por hacer que el estudio fuera más llevadero y por todas las clases y experiencias compartidas en nuestra querida facultad.

A mamá y papá por la educación que me dieron y por darme todo para que pudiera terminar con mi carrera. A Lu por ser mi amiga además de mi hermana, y por ser mi mejor cómplice.

A Titi, por todas las veces que me abrió la puerta de su laboratorio para contestarme dudas y aconsejarme.

A Nacho, por ser mi gran ayuda en los momentos conflictivos de mi escritura, por estar siempre y bancarse todo, y por todo el cariño que me da cada día.

A mis amigas de siempre, Anys, Pato, Sofi, Vale y Eli, por acompañarme en las diferentes etapas de mi vida y por estar presentes en las buenas y en las malas, siempre buscando algún motivo para reír.

A todos ellos,

Muchas gracias...