



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

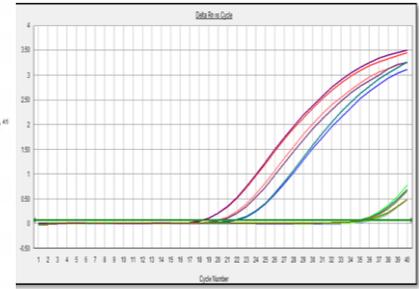
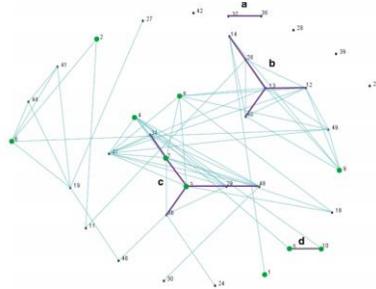
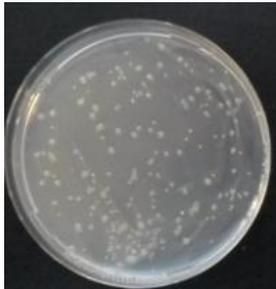


FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

HERRAMIENTAS MOLECULARES APLICABLES AL CONTROL PREVENTIVO DEL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE EN URUGUAY



Valentina Croce

Facultad de Ciencias, Facultad de Química

Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

Junio de 2016



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Herramientas moleculares aplicables al control preventivo del cancro bacteriano del tomate en Uruguay

Valentina María Croce Paullier

Tesis de Maestría presentada al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas, como parte de los
requisitos para la obtención del título de
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBÁREA MICROBIOLOGÍA

Directora de tesis:

Dra. María Inés Siri

Co-directora:

Dra. María Julia Pianzola

Tribunal de defensa de tesis:

Presidenta: Dra. Karina Antúnez

Vocales: Dra. Lucía Ferrando

Dr. Pedro Mondino

Montevideo, junio de 2016

Croce Paullier, Valentina María

Herramientas moleculares aplicables al control preventivo del cancro bacteriano del tomate en Uruguay /Valentina María Croce Paullier.

- Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Química, Facultad de Ciencias, 2016.

118 p.

Directora de tesis:

María Inés Siri

Co-directora de tesis:

María Julia Pianzola

Tesis de Maestría – Universidad de la República, Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas, 2016

Referencias bibliográficas: p. 111 - 119.

Universidad de la República, Maestría en Ciencias Biológicas.

Herramientas moleculares aplicables al control preventivo del cancro bacteriano del tomate en Uruguay.

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones que financiaron este trabajo. A la ANII, por otorgarme la beca de Maestría. A CSIC (Grupos I+D) por financiar mi estadía en Angers. A Pedeciba por otorgarme la beca de movilidad para la pasantía en Madrid.

Quiero agradecer a María Inés, por haber confiado en mí y por su constante apoyo siempre. Gracias por la motivación, consejos y enseñanzas que recibí durante todos estos años. A María Julia, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el grupo y confiar en mí para la realización de esta tesis. Gracias a las dos por su preocupación y buena disposición siempre.

A la Cátedra de Microbiología, por crear un lindo ambiente de trabajo y por todos los momentos compartidos durante estos años. En especial a mis compañeros y amigos del laboratorio 12: Vicky, César, MIL, Rodrigo, Paola, Marianita, Gabi, Susana, Maru, Stefanie, Diego, que han hecho del laboratorio un ambiente especial de trabajo. A los que ya no están, en especial a Analía por todo lo que me enseñó y por estar siempre dispuesta a darme consejos. También quiero agradecer de manera muy especial a Gianna y Sonia por tantos consejos y por sus conocimientos compartidos.

A Diego Maeso de INIA Las Brujas, por su gran apoyo durante el desarrollo de esta tesis y por sus valorables aportes; en especial por brindarme todos sus conocimientos del tema y colaborar en la colecta de cepas.

A Matías González y Ana Arruabarrena de INIA Salto Grande, por acompañarme en las colectas y en el aislamiento de las cepas. A Federico Boschi de INASE por brindarme las muestras de semillas y plantas y estar siempre a disposición. A María José Montelongo y Elisa Silvera por proporcionarme las cepas de la Cátedra de Fitopatología de Facultad de Agronomía. A Enrique Verdier del MGAP, también por proporcionarme cepas.

A la Dra Mariè Agnès Jacques, quien me recibió de la mejor forma y me acompañó durante toda mi pasantía en Angers. Y a su familia (Raphael, Elsa y Francis) que me recibieron en su casa sin conocerme, e hicieron que disfrute de cada día (y las mejores cenas!) durante mi estadía en Angers. Fue una de las mejores experiencias vividas durante esta tesis haber trabajado con los investigadores, técnicos y pasantes del IRHS, tengo que agradecer por la buena disposición a Perrine, Mathew, Karine, Samir, Youness, Camille, Arnaud, Amandine, Ziyi, Martial, Sophie, Marie, Félix y Sophia. Además de los buenos momentos compartidos, me ayudaron mucho a entender el idioma. Merci beaucoup à tous!

Al Dr Leandro De León, por su gran entusiasmo y dedicación durante mi pasantía en Madrid. Por alegrarse conmigo con los buenos resultados y frustrarse con los no tan buenos, siempre dando para adelante y planteando nuevos desafíos. Gracias por acompañarme durante los ensayos, por trabajar en equipo y por todas las enseñanzas en esta bacteria que compartimos en nuestras tesis. También le agradezco a Isra, Jose y Cristina por hacerme sentir a gusto en el laboratorio.

A mis compañeros de máster de la Universidad de Salamanca, donde realicé todos los cursos de esta Maestría, por todo lo compartido en ese lugar que me trae recuerdos tan lindos, en especial a Leyre, Lorena, Alexandra, Martín y Caro.

A la banda de facultad, por compartir las alegrías y los conflictos de nuestra vida académica.

A mis amigas de la vida, Vale, Sofi, Eli, Pato, Anys y Lu por estar siempre y ser las mejores!

A mis padres y a mi hermana, por todo lo que me enseñan cada día, por compartir mis alegrías y bancarme en los momentos conflictivos, sin saber mucho de lo que hago.

A Nacho, por entenderme y acompañarme siempre. Por toda la gran ayuda y consejos durante la etapa final de escritura. Gracias por todos los momentos tan especiales que compartimos y disfrutamos juntos.

A todos ellos,

Muchas Gracias!

RESUMEN

El cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Cmm) constituye una amenaza fitosanitaria para la producción de tomate del mundo. En Uruguay, la enfermedad adquirió relevancia al encontrarse cultivos afectados tanto en el norte como en el sur del país. El conocimiento de la estructura poblacional del patógeno y la detección precoz, resultan fundamentales para el desarrollo de medidas eficientes para el control de la enfermedad. Las semillas infectadas son 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. El objetivo de esta tesis es generar conocimiento que contribuya al establecimiento de estrategias de control del cancro bacteriano del tomate. Se realizó un relevamiento de las cepas de Cmm presentes en nuestro país, generando una colección local caracterizada en base a la presencia de genes específicos y ensayos de patogenicidad. Se llevó a cabo el primer estudio epidemiológico de Cmm en Uruguay con el objetivo de conocer el origen de los brotes y las fuentes de diseminación de este patógeno. Se realizó la tipificación mediante la técnica *Multilocus Sequence Analysis and Typing* (MLSA-MLST) y se comparó con cepas procedentes de otras partes del mundo. Se encontró una alta diversidad genética entre las cepas de Uruguay, reflejando su introducción al país desde distintos orígenes a causa de la importación de semillas. Por otra parte, se evaluó la PCR a tiempo real (qPCR) como herramienta de diagnóstico para la detección del patógeno en semillas y plantas de tomate. Para aumentar la sensibilidad de detección en los extractos vegetales se evaluaron varias estrategias previas a la amplificación incluyendo la extracción de ADN de la muestra, BIO-qPCR e IMS-qPCR. Estos métodos permitieron la detección de hasta 1 semilla infectada en un lote de 2000 semillas sanas. Además, se verificó la transmisión del patógeno de la semilla a la planta, en semillas contaminadas con hasta 10^2 ufc/semilla. También se comprobó la aplicabilidad de estas metodologías para la detección de Cmm en plantas asintomáticas, pudiendo ser de utilidad para la detección de este patógeno en viveros. La implementación de estas herramientas moleculares puede significar un importante aporte para la valorización de la semilla de tomate nacional de alta calidad y contribuir a evitar la diseminación de esta importante enfermedad en nuestro país. Este trabajo aporta información sobre el origen y la distribución de las cepas de Cmm responsables del cancro bacteriano en Uruguay, y sirve como guía para el establecimiento de medidas preventivas de control de la enfermedad.

ABSTRACT

Bacterial canker caused by the *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* (Cmm) has been a phytosanitary threat to tomato production worldwide. Uruguay took notice of its relevance as it saw crops being affected by it in the south area as well as the north area. In order to successfully develop efficient disease control measures, it is necessary to acquire a deep understanding of its genetic structure as well as providing an early diagnosis. Infected seeds are the primary source of inoculum and, therefore, the main agents for severe infection outbreaks. Even if the infection level of a seed lot is low, it is enough to start a major epidemic, so it is consequently necessary to carry out reliable, efficient and sensible control methods. The aim of this work is to gain knowledge to contribute to the establishment of efficient control measures of bacterial canker of tomato. In this study, information was gathered regarding the type of Cmm strains in our country, creating a local characterized collection based on the presence of specific genes and pathogenicity assays. The first Cmm epidemiological study was executed in Uruguay in order to search for the origin of outbreaks and sources of pathogen infection. The Multilocus Sequence Analysis and Typing (MLSA-MLST) technique was applied for strain typing, and later comparison with various strains from other countries. Uruguayan strains show high genetic variation, reflecting that its introduction to the country comes from different origins, as a result of seed import. As a second step, real time PCR (qPCR) was assessed as a diagnosis tool for detection of pathogen in tomato seeds and plants. To increase the detection sensibility in vegetal extracts, various approaches were appraised prior to amplification, including DNA extraction from the sample, BIO-qPCR and IMS-qPCR. The sensibility of these methods was sufficiently assessed, resulting in the detection of up to 1 infected seed in a lot of 2000, using the three of the abovementioned methodologies. The pathogen transmission from the seed to the plant was verified, present in even seeds contaminated with 10^2 cfu/seed. It was also confirmed that these methodologies can be applied for Cmm detection in asymptomatic plants, being useful for disease diagnosis in nurseries. The application of this diagnosis tools by the national institutions responsible for phytosanitary control would contribute to the valorization of national high quality tomato seed and assists to avoid the dissemination of this disease in our country. This study provides relevant information about the distribution and origin of Cmm strains causing bacterial canker in Uruguay and will serve as a basis to establish preventive measures to control the disease.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	v
Abstract	vi
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xiii
Abreviaturas.....	xiv
Capítulo 1. Introducción general	1
1.1 El cultivo de tomate	1
1.1.1 Generalidades	1
1.1.2 Producción	1
1.2 La enfermedad: el cancro bacteriano del tomate	3
1.2.1 Antecedentes	3
1.2.2 Importancia y Distribución.....	4
1.2.3 Sintomatología	5
1.2.4 Ciclo de la enfermedad	7
1.2.5 Agente causal: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	8
1.3 Interacción planta-patógeno	10
1.3.1 Colonización y multiplicación <i>in planta</i>	10
1.3.1 Factores de virulencia de Cmm.....	11
1.3.2 Mecanismos de defensa vegetal.....	13
1.4 Estrategias de control de la enfermedad.....	14
1.4.1 Control preventivo	14
1.4.2 Manejo del cultivo	15
1.4.3 Control químico.....	16
1.4.4 Control biológico.....	17
1.4.5 Resistencia genética.....	17
1.5 Antecedentes en Uruguay y justificación de la propuesta	18
Capítulo 2. Objetivos, hipótesis y presentación de la tesis.....	21
2.1 Objetivos	21
2.2 Hipótesis de trabajo	21
2.3 Presentación de la tesis	22

Capítulo 3. Estudio de la diversidad genética de cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	23
3.1 Introducción.....	23
3.2 Materiales y métodos.....	27
3.2.1 Aislamiento de Cepas de Cmm.....	27
3.2.2 Ensayos de patogenicidad.....	28
3.2.3 Identificación de Cmm por métodos moleculares.....	30
3.2.4 Amplificación de genes de patogenicidad.....	32
3.2.5 Multi Locus Sequence analysis and Typing (MLSA-MLST).....	32
3.3 Resultados.....	35
3.3.1 Conformación de una colección de aislados de Cmm.....	35
3.3.2 Identificación y caracterización molecular de los aislados de Cmm de Uruguay.....	36
3.3.3 Multi-Locus Sequence Analysis and Typing.....	38
3.3.4 Diversidad entre aislados de Cmm de diversos orígenes.....	46
3.3.5 Diversidad entre cepas de Cmm presentes en Uruguay.....	47
3.4 Discusión.....	50
Capítulo 4. Detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en semillas y plantas de tomate.....	57
4.1 Introducción.....	57
4.1.1 Aislamiento en medios semi-selectivos.....	57
4.1.2 Métodos serológicos.....	58
4.1.3 Métodos moleculares.....	62
4.1.4 Bioensayos.....	68
4.2 Materiales y métodos.....	70
4.2.1 Cepas utilizadas y preparación de inóculos.....	70
4.2.2 Semillas y plantas utilizadas.....	70
4.2.3 Preparación de extractos vegetales.....	70
4.2.4 Sistemas de qPCR para la detección de Cmm.....	71
4.2.5 BIO-qPCR.....	75
4.2.6 Extracción de ADN de extractos vegetales.....	76
4.2.7 Separación inmuno-magnética (IMS).....	77
4.2.8 Estudio comparativo de las diferentes metodologías de detección de Cmm en lotes de semilla de tomate.....	79

4.2.9 Detección de Cmm en plantas de tomate asintomáticas	80
4.3 Resultados.....	83
4.3.1 Optimización de la reacción de qPCR	83
4.3.2 Detección de Cmm mediante BIO-qPCR.....	87
4.3.3 Detección de Cmm en lotes con semillas contaminadas de manera artificial	90
4.3.4 Ensayo comparativo con semillas de diferente origen	94
4.3.5 Detección de Cmm en plantas de tomate	98
4.4 Discusión	101
Capítulo 5. Conclusiones y perspectivas	107
5.1 Conclusiones	107
5.2 Perspectivas	109
Referencias bibliográficas	111
Anexos.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1. Producción de tomate por continente. Fuente: FAOSTAT, 2015.	2
Figura 1-2. Producción de tomate por zona y según modalidad productiva. Zafra 2013/2014. Fuente: MGAP/DIEA 2015.....	3
Figura 1-3. Distribución mundial de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . Fuente: <i>European Plant Protection Organization (OEPP/EPPO)</i>	4
Figura 1-4. Síntomas típicos de una infección sistémica causada por <i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en plantas de tomate.	5
Figura 1-5. Síntomas típicos de una infección localizada causada por <i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en plantas de tomate: A, en tallo; B, en hojas y C, en frutos (Fuente: De León <i>et al.</i> , 2011).	6
Figura 1-6. Ciclo de infección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . Figura adaptada de De León <i>et al.</i> (2011).	8
Figura 1-7. Colonización de plantas de tomate (tallos) por <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm).....	10
Figura 1-8. Mapa físico de la region <i>chp/tomA</i> de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (NCPB382).	12
Figura 3-1. Foto de un cultivo protegido de tomate afectado por cancro bacteriano (Salto, diciembre de 2012). A. Marchitamiento generalizado en toda la fila del invernáculo y B. Planta de tomate con marchitez.....	28
Figura 3-2 A. Trozos de tallos de plantas de tomate con síntomas a partir de los cuales se realizaron los aislamientos. B. Colonias típicas de Cmm en medio NBY. C. Observación microscópica con tinción Gram (100x).	35
Figura 3-3 Test de patogenicidad en plantas de tomate. A. Plantas mostrando síntomas de marchitamiento a los 14 ddi y B. marchitamiento unilateral de las hojas.	36
Figura 3-4 Gel de agarosa al 1% con los productos de amplificación de <i>celA</i> (arriba, 580 pb) y <i>chpC</i> (abajo, 638 pb).	37
Figura 3-5 Resultados de la amplificación por qPCR de 6 aislamientos de Cmm con el sistema de Luo <i>et al.</i> (2008).(Croce <i>et al.</i> , 2016)	38
Figura 3-6. Árbol filogenético (<i>Neighbor-Joining</i>) basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes <i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>dnaK</i> , <i>ppk</i> y <i>recA</i> de 143 aislamientos de Cmm.....	39
Figura 3-7. Árbol filogenético (<i>Neighbour Joining</i>) basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes <i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>dnaK</i> , <i>ppk</i> y <i>recA</i> de 123 aislamientos de <i>C.</i> <i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> utilizadas en este estudio.....	41

Figura 3-8 Imagen tomada del software Geneious que muestra como ejemplo el alineamiento de las secuencias del gen <i>ppk</i> para varios aislamientos uruguayos. Se pueden observar algunos sitios polimórficos (sin fondo de color).	42
Figura 3-9. Diagrama de e-BURST conformado a partir de 38 secuenciotipos de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> identificados mediante el análisis MLSA-MLST sobre 123 aislamientos de Cmm.....	47
Figura 3-10. Gráfico de diversidad representando la distribución geográfica de los secuenciotipos (STs) de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> identificados en este estudio.....	48
Figura 3-11. Árbol filogenético (<i>Neighbor-Joining</i>) basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes (<i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>dnaK</i> , <i>ppk</i> y <i>recA</i>) representando todas las cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> aisladas en Uruguay.	49
Figura 4-1. Morfología de las colonias de Cmm en medios semi-selectivos a los 10 días de incubación. A, medio CMM1T; B, medio SCM y C, medio SCM-fast. Fuente: ISF, 2015.....	58
Figura 4-2. Detección de células de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) (en verde) mediante Inmuno-fluorescencia (IF).	60
Figura 4-3. Diferentes modalidades de separación inmunomagnética. Imagen cedida por L. De León.	61
Figura 4-4. Esquema del procedimiento de separación inmuno-magnética. Fuente: www.invitrogen.com	61
Figura 4-5. Esquema de la reacción de qPCR con sondas Taqman®. Fuente: (http://www.eoligos.com/eoweb/products/eo-taqman.asp).....	65
Figura 4-6. Esquema general de la BIO-qPCR llevada a cabo en este trabajo.	75
Figura 4-7. A. Imagen ampliada de las Dynabeads (Dnal, Noruega), y B. Imán utilizado (MPC-s) magnetic particle concentrator para la captura de las inmunobeads (IMBs).....	78
Figura 4-8. Esquema general para la infección de lotes de semillas, procesamiento y obtención de las muestras para la evaluación de la sensibilidad de las distintas metodologías.	80
Figura 4-9. Esquema general de la estrategia utilizada para la detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en plantas provenientes de semillas contaminadas.	81
Figura 4-10. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para la evaluación de kits de qPCR con el sistema <i>Ptssk</i>	83
Figura 4-11. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> con el sistema <i>Ptssk</i> (línea punteada) y <i>MVS21</i> (línea continua).	84
Figura 4-12 Curvas de calibración de las reacciones de qPCR con los sistemas <i>Ptssk</i> (A) y <i>MVS21</i> (B).	85

Figura 4-13. Gráficos de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para evaluar el efecto matriz en la detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en extractos de semillas (A) y extractos de planta (B) utilizando el sistema <i>Ptssk</i>	86
Figura 4-14. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos obtenido a partir de la BIO-qPCR para la detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en extractos de semilla (ES, línea punteada) y de plantas de tomate (EP, línea continua) inoculados.	88
Figura 4-15. Foto de las placas control de la BIO-qPCR luego de 6 días de incubación en CMM1T a 28°C.	89
Figura 4-16. A. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos obtenido a partir de la BIO-qPCR de lotes de semillas sin inocular (Lm-1, Lm-2 y Lm-3) y un control positivo inoculado (ctrl+).	90
Figura 4-17. Determinación por recuento en placa en medio NBY del nivel de infección de las semillas de tomate infectadas de manera artificial con <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm), una semana y seis meses luego de la infección.	91
Figura 4-18. Foto de la placa de KingB (4 días de incubación) correspondiente al IMS-plating del L4. Se contaron 59 colonias de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	92
Figura 4-19. Placas control con 6 días de incubación a 28°C en CMM1T (arriba) y SCM (abajo). En el margen inferior se indica el lote al que corresponden las placas.	94
Figura 4-20. Esquema de las metodologías utilizadas para evaluar la sensibilidad de detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en lotes de semillas con diferentes niveles de infección.	95
Figura 4-21. Placas control en medio SCM luego de 6 días de incubación a 28°C de la BIO-qPCR con semillas de Tailandia (A) y de Uruguay (B) con diferentes niveles de infección por <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	97
Figura 4-22. Síntomas típicos de cancro bacteriano en una planta de tomate de 8 semanas generada a partir de una semilla artificialmente inoculada con un nivel de infección de 102 ufc/semilla de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	98
Figura 4-23. Detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) mediante BIO-qPCR en plántulas de tomate obtenidas de semillas infectadas artificialmente con distintas concentraciones del patógeno. Se analizaron <i>pools</i> de 5 plantas de: (A) parte aérea (P1, P2, P3, P4 y P5) y (B) cotiledones (C1, C2, C3, C4, C5).	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1-1. Enfermedades ocasionadas por las distintas subespecies de <i>C. michiganensis</i> en sus hospederos. Fuente: Gartemann <i>et al.</i> (2003).	9
Tabla 3-1. Resumen de técnicas de tipificación utilizadas para estudios de diversidad genética de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	24
Tabla 3-2. Colección de aislamientos de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> de Uruguay.....	29
Tabla 3-3. Sistemas utilizados para la identificación y caracterización de cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	31
Tabla 3-4. Primers utilizados para la amplificación de los genes housekeeping seleccionados para el análisis MLSA-MLST (Jacques <i>et al.</i> , 2012).....	33
Tabla 3-5. Parámetros de diversidad y tests de neutralidad para las secuencias parciales de los 5 genes analizados y para el total de secuencias concatenadas entre los aislamientos de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	40
Tabla 3-6. Agrupación de los aislamientos de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> según su ST.....	43
Tabla 4-1. Algunos medios semi-selectivos desarrollados para el aislamiento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	58
Tabla 4-2. Resumen de los sistemas de qPCR diseñados para la detección de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	67
Tabla 4-3. Preparación de las mezclas de reacción de qPCR con los sistemas <i>Ptssk</i> y <i>MVS21</i>	71
Tabla 4-4. Características del sistema <i>Wu</i> utilizado como control interno de amplificación en qPCR.	72
Tabla 4-5. Preparación de la reacción de multiplex-qPCR con el sistema <i>MVS21</i> y el control interno de amplificación <i>Wu</i>	72
Tabla 4-6. Valores de detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> por qPCR (Cq promedio \pm intervalo de confianza del 95%) en lotes de 2000 semillas sanas inoculados con una semilla infectada con diferentes niveles de bacteria (L1, L2, L3, L4) y los controles negativo (ctrl-) y positivo (ctrl+).	92
Tabla 4-7. Valores de detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> por qPCR (Cq promedio \pm intervalo de confianza del 95%) en lotes de 2000 semillas sanas inoculados con una semilla infectada con diferentes niveles de bacteria (L1, L2, L3, L4, L5) y el control negativo sin infectar (Ctrl-).	96

ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
μl	microlitro
μM	micromolar
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i>
C _q	valor umbral de ciclo
cv.	cultivar
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EPPO	<i>European Plant Protection Organization</i>
EP	extracto de planta
ES	extracto de semilla
g	gramo
hs	horas
há	hectárea
IMBs	<i>Inmuno-beads</i>
IMS	Inmuno-magnetic separation
ISF	<i>International Seed Federation</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kb	kilobases
MAI	Microorganismos de interés Agrícola e Industrial
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramos
nm	nanómetros
pb	pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	picogramos
PM	peso molecular
pmol	picomol
qPCR	<i>quantitative polimerase chain reaction</i>
rcf	<i>Relative Centrifugal Force</i>
SEB	<i>Seed Extraction Buffer</i>
s	segundos
SF	suero fisiológico
subsp.	Subespecie
TE	Buffer Tris EDTA
T _m	temperatura de fusión
Ton	toneladas
ufc	unidad formadora de colonia
UV	ultravioleta

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

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 existen un gran número de especies silvestres relacionadas. Tiene un importante valor nutricional ya que aporta proteínas, hidratos de carbono, fibra, vitaminas y minerales. Además, es rico en licopeno (pigmento que le proporciona su característico color rojo), un antioxidante muy potente. También estimula el sistema inmune lo cual ayuda a detener algunas enfermedades (Jaramillo *et al.*, 2007).

El origen del género *Lycopersicon* se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile, pero su domesticación se inició en el sur de México y norte de Guatemala. Con la llegada de los españoles, el 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 Estados Unidos y Canadá, donde su consumo como fuente de alimento ocurrió aproximadamente en 1850, y a partir de esta fecha comenzó a tener mayor interés agronómico. 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).

1.1.2 PRODUCCIÓN

El tomate se utiliza 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. En total se producen unas 160 millones de toneladas de tomate al año siendo China el principal productor (50 millones de toneladas al año) seguido de India, Estados Unidos, Turquía y Egipto (FAOSTAT, 2015). Como se observa en la Figura 1-1, Asia es el continente con la mayor producción de tomate (60%) seguido de América (15%) y Europa (12,8%).

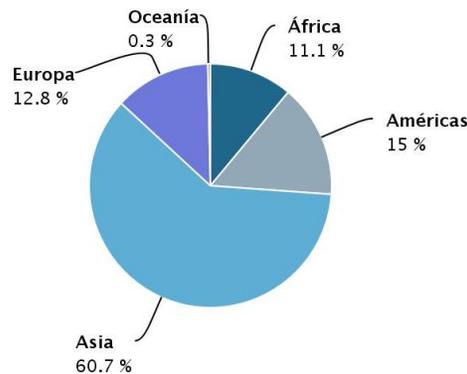


Figura 1-1. Producción de tomate por continente. Fuente: FAOSTAT, 2015.

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 (zafra 2013/2014) fue de 39.280 toneladas en una superficie de 580 hectáreas. El cultivo nuclea a unos mil productores y la mayor parte de su producción la realizan en superficies pequeñas (promedio de 0,6 há/productor). En nuestro país existen dos zonas principales para la producción de tomate: zona Sur, que abarca los departamentos de Montevideo, Canelones y San José; y zona Norte, abarcando los departamentos de Salto y Artigas. Además, el tomate se produce bajo dos modalidades: a campo o protegido (invernáculo). El tomate para consumo en fresco (también llamado tomate de mesa) se cultiva tanto a campo como protegido, mientras que el tomate para industria (tomate perita) se cultiva sólo en condiciones de campo (Figura 1-2). 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 Norte es la principal productora de cultivos producidos a contra-estación (para oferta en invierno y primavera), produciéndose en la zafra 2013/2014 el 67% de la producción total anual en esta zona. El cultivo en invernáculo ha ido aumentando en los últimos años, representado en esta zafra el 87% de la producción. Este hecho se justifica ya que los rendimientos obtenidos bajo esta modalidad son mucho mayores. En esta zafra se registró un rendimiento promedio de 120 ton/há, mientras que el rendimiento promedio del cultivo a campo fue de 20 ton/há, unas 6 veces menor (MGAP/DIEA, 2015).

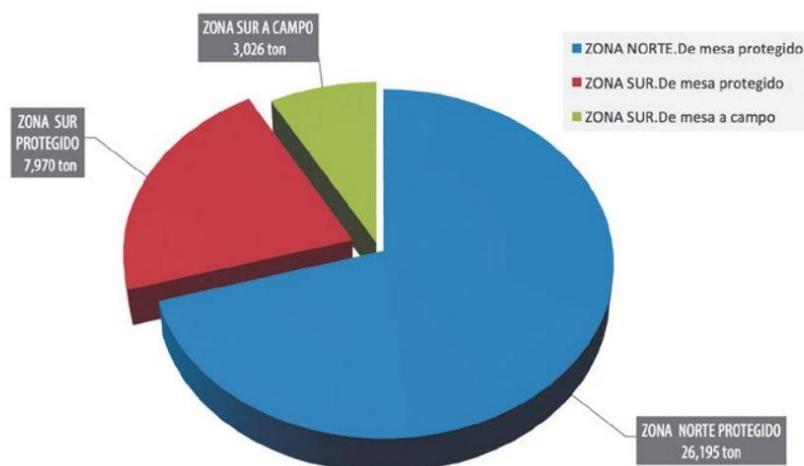


Figura 1-2. Producción de tomate por zona y según modalidad productiva. Zafra 2013/2014. Fuente: MGAP/DIEA 2015.

1.2 LA ENFERMEDAD: EL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE

1.2.1 ANTECEDENTES

El cancro bacteriano es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al cultivo de tomate en el mundo. La enfermedad fue detectada por primera vez en 1909 en Michigan, EE.UU y desde entonces ha sido reportada en casi todas las regiones donde se cultiva tomate del mundo. Los episodios más críticos de la enfermedad sucedieron en América del Norte en las décadas de los 30s, 60s y 80s, con pérdidas de hasta el 80 % de la producción (Gleason *et al.*, 1993). En los últimos años, los brotes de cancro bacteriano se han reportado esporádicamente en varios países del mundo sobre todo en Asia y Europa, aunque también ha habido en América y África. Por ejemplo, se han reportado brotes de la enfermedad desde el año 2000 en Israel (Kleitman *et al.*, 2008), en Japón (Kawaguchi *et al.*, 2010), en Islas Canarias (De León *et al.*, 2009), en Serbia (Milijašević-Marčić *et al.*, 2012), entre otros. En la región, hubo una gran incidencia de la enfermedad en Chile en el año 2000 que afectó a semilleros de tomate para exportación (Vega *et al.*, 2001). En Uruguay, la enfermedad fue reportada por primera vez en la década del 80 (Lasa *et al.*, 1981), y desde entonces han ocurrido brotes de manera esporádica en varios invernáculos y campos del país aunque no han sido reportados formalmente.

1.2.2 IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN

Desde el primer reporte en EE.UU en 1909, el cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) se ha extendido por el mundo y ha causado importantes pérdidas tanto a nivel de campo como de invernadero. La enfermedad se presenta generalmente de manera esporádica, con brotes devastadores que causan importantes pérdidas económicas que aparecen impredeciblemente en el tiempo. Su naturaleza esporádica permite explicar las dificultades que han habido para mejorar la eficacia de medidas de control (Gleason *et al.*, 1993). Como se observa en la Figura 1-3, el patógeno se encuentra distribuido en todas las zonas donde se cultiva tomate en el mundo. La *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (OEPP/EPPO), ha incluido a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en la lista A2 de patógenos de cuarentena (<https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>). Esto significa que está presente en alguna parte de la región EPPO, pero está siendo oficialmente controlado. Además, actualmente Cmm también fue incluido como plaga cuarentenaria por otras organizaciones de control fitosanitario como: *Asia and Pacific Plant Protection Commission*, APPPC; *The Caribbean Plant Protection Commission*, CPPC; *The Inter-African Phytosanitary Council* (IAPSC). En Uruguay, Cmm no figura como plaga cuarentenaria según las disposiciones establecidas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP/DIGESSAA, 2010). Por lo tanto, actualmente no se realiza ningún control fitosanitario a las semillas de tomate que ingresan al país.

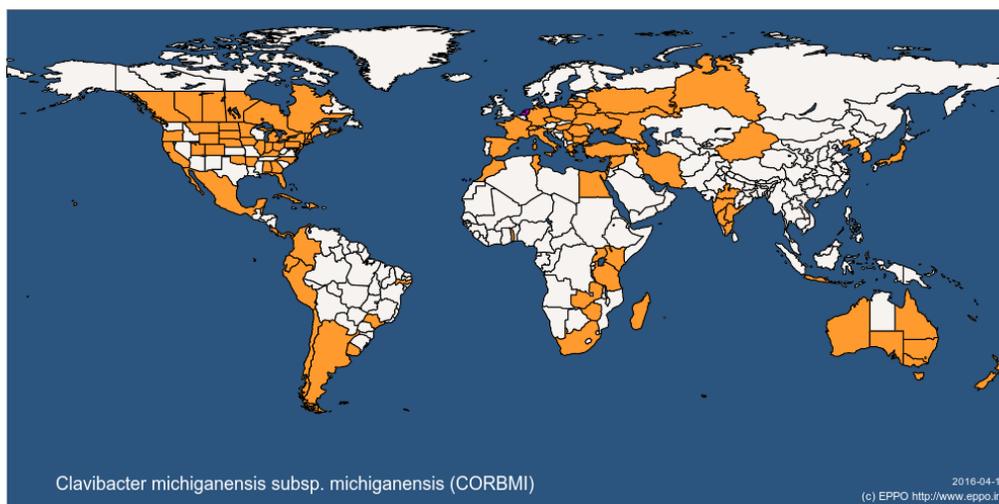


Figura 1-3. Distribución mundial de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Fuente: *European Plant Protection Organization* (OEPP/EPPO) (<https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution>).

1.2.3 SINTOMATOLOGÍA

La sintomatología del cancro bacteriano del tomate es muy variable y depende de circunstancias como la edad de la planta, la susceptibilidad del cultivar, el tipo de producción (a campo o en invernáculo), condiciones ambientales, entre otros (Figuras 1-4 y 1-5). Dada esta variabilidad y complejidad, no es efectivo basarse en los síntomas para diagnosticar la enfermedad. Los síntomas pueden ser divididos en dos tipos, sistémicos o localizados, dependiendo del sitio donde se da la infección (Gleason *et al.*, 1993).

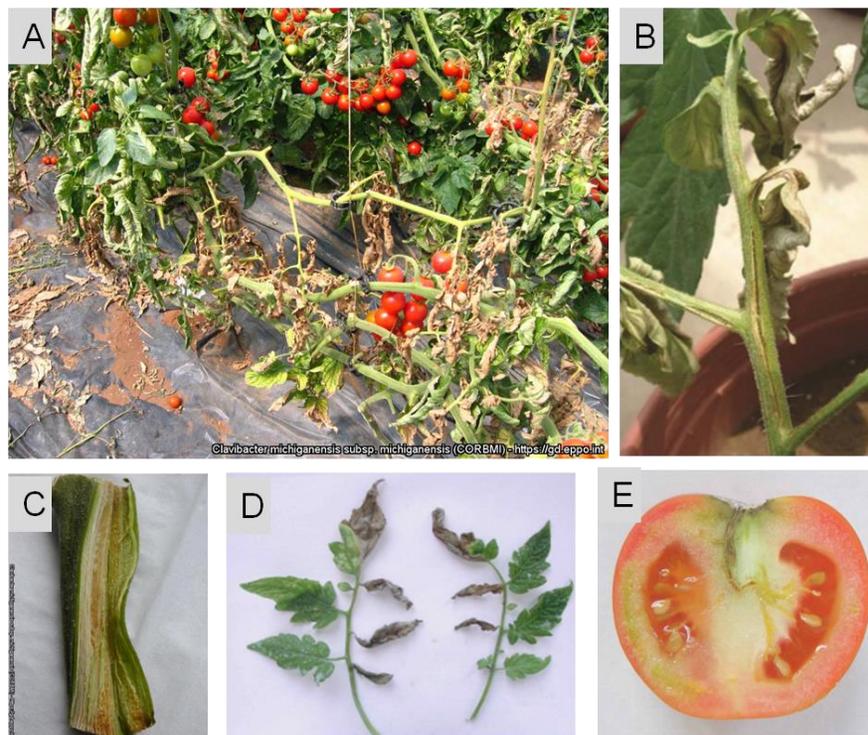


Figura 1-4. Síntomas típicos de una infección sistémica causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de tomate. A, Marchitamiento generalizado (Fuente: Oepp/Eppo, 2013); B, Cancros abiertos en tallo (Fuente: Sen *et al.*, 2015); C, parte del sistema vascular invadida por el patógeno mostrando oscurecimiento (Fuente: Oepp/Eppo, 2013); D, marchitamiento unilateral en hojas y E, corte longitudinal de un tomate invadido por el patógeno (Fuente: De León *et al.*, 2011).

Durante una infección sistémica, el patógeno invade el sistema vascular produciendo el marchitamiento de las plantas (Figura 1-4, A). Este tipo de infección es la que ocurre cuando la enfermedad es transmitida a través de semillas infectadas. Es frecuente que el marchitamiento ocurra de forma unilateral viéndose afectada una parte de la planta o incluso la mitad de un folíolo (Figura 1-4, D). En tallos, es frecuente la formación de canchales, que en ocasiones pueden abrirse liberando al exterior un líquido amarillento que

contiene la bacteria (Figura 1-4, B). Los cortes longitudinales de los tallos afectados muestran un oscurecimiento de los haces vasculares como resultado de la colonización y destrucción de los tejidos por el patógeno (Figura 1-4, C). Cuando la bacteria alcanza los frutos durante el desarrollo de una infección sistémica, éstos se desprenden de la planta y caen al suelo. El interior del fruto puede ser completamente invadido por el patógeno que llegará hasta los receptáculos de las semillas (Figura 1-4, E) (Gleason *et al.*, 1993).

Cuando la infección se produce por heridas superficiales o aberturas naturales (estomas o hidatodos), se produce una infección localizada y los síntomas difieren de los descritos anteriormente. En este caso, en los tallos y pecíolos se observan con frecuencia pequeñas manchas de color blanco (Figura 1-5, A), y se produce un enrollamiento de los márgenes de las hojas y su posterior amarilleo (Figura 1-5, B). En frutos es común la aparición unas lesiones denominadas “ojo de pájaro” que consisten en pequeñas lesiones oscuras con un halo blanco alrededor (Figura 1-5, C) (De León *et al.*, 2011).

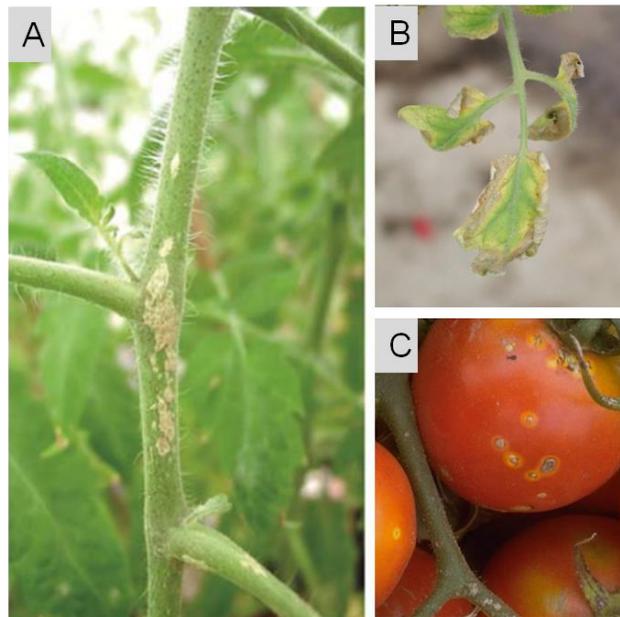


Figura 1-5. Síntomas típicos de una infección localizada causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de tomate: A, en tallo; B, en hojas y C, en frutos (Fuente: De León *et al.*, 2011).

Generalmente los síntomas causados por Cmm no aparecen hasta el desarrollo de los frutos, y no suelen observarse en plantas jóvenes. Además, los síntomas de marchitamiento suelen confundirse con otras enfermedades sistémicas de tomate como *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium* spp. y *Verticillium* spp. (Oepp/Eppo, 2013).

1.2.4 CICLO DE LA ENFERMEDAD

La principal fuente de diseminación de la enfermedad es por semilla infectada (Figura 1-6, A). La cantidad de Cmm en semillas naturalmente infectadas es variable, pero se ha reportado que puede estar entre 10^2 y 10^4 ufc/semilla (Hadas *et al.*, 2005). Además, recientemente Lelis *et al.*, (2014) han reportado que niveles tan bajos como cinco células bacterianas por semilla pueden desencadenar la aparición de síntomas en la planta. La bacteria puede colonizar la superficie de la semilla y el endosperma tanto por vía sistémica como por contaminación externa de los frutos (Tancos *et al.*, 2013).

La incidencia de la enfermedad no depende únicamente de la concentración del inóculo inicial. La presencia de unas pocas plantas enfermas puede resultar en altas poblaciones del patógeno, que pueden servir de inóculo para infecciones secundarias. La subsecuente diseminación de la enfermedad en el cultivo (infección secundaria), ocurre principalmente por prácticas culturales como: poda, contacto de plantas infectadas con plantas sanas, lluvia, salpicaduras, prácticas de riego, etc. (Figura 1-6, B) (Gitaitis *et al.*, 1991). 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 1-6, C). Las herramientas utilizadas al podar plantas infectadas, pueden servir de vía de diseminación del inóculo desde plantas enfermas a plantas sanas. Por ejemplo, la técnica de *grafting* recientemente adoptada por varios viveros, que implica provocar heridas en los tejidos vegetales, ha provisto una rápida vía de acceso de Cmm a la planta. Un estudio usando mutantes bioluminocentes de Cmm permitió la visualización de la dinámica de la colonización bacteriana en la transmisión del patógeno a través de semillas infectadas y la translocación de Cmm en plantas injertadas. Los resultados demostraron la ocurrencia de contaminación a través de los materiales utilizados para los injertos (Xu *et al.*, 2010). Generalmente, una alta humedad relativa y la condensación de agua sobre la superficie de la planta son las condiciones más favorables para que se produzca la entrada del patógeno en el interior de los tejidos (Sharabani *et al.*, 2013).

Una vez dentro de la planta, la bacteria invade el sistema vascular, se traslada y multiplica en los vasos del xilema (Figura 1-6, D), y sale de ellos por el floema, médula y corteza, donde forma los canchros (Agrios, 2005). Una vez colonizada la planta, se da la aparición de los síntomas de la enfermedad (Figura 1-6, E). Aunque esta bacteria no persiste en el suelo de forma libre durante mucho tiempo, sí puede sobrevivir de uno a tres años asociada a restos vegetales del hospedador (Figura 1-6, F) (Fatmi y Schaad,

2002). Además, otras especies de solanáceas y no solanáceas se han descrito como huéspedes alternativos, convirtiéndose en reservorios del patógeno (<https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/hosts>).

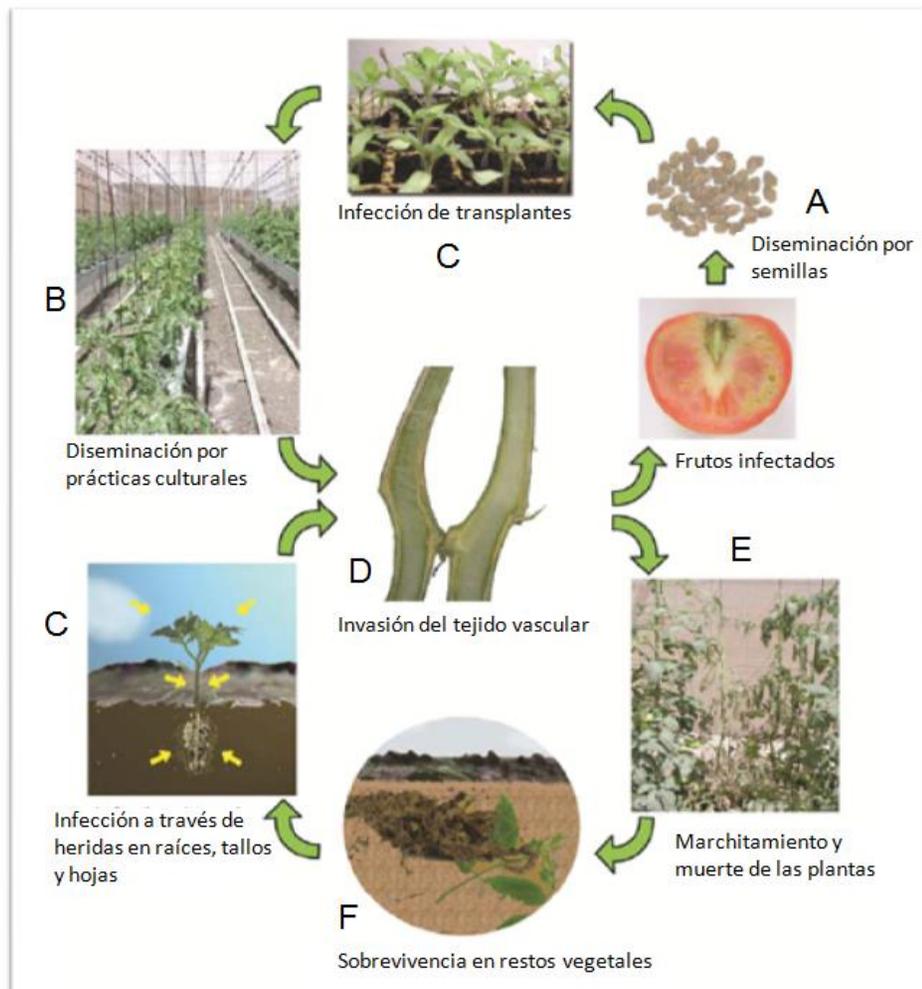


Figura 1-6. Ciclo de infección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Figura adaptada de De León *et al.* (2011).

1.2.5 AGENTE CAUSAL: *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*

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).

El género *Clavibacter* se clasifica a nivel taxonómico de la siguiente manera: Dominio *Bacteria*, Clase *Actinobacteria*, Orden *Actinomycetales* y Familia *Microbacteriaceae*. Este género, actualmente incluye una única especie, *C. michiganensis* que está subdividida en 5 subespecies, todas ellas patógenas de plantas. Las mismas, se diferencian en rasgos fenotípicos como pigmentación, crecimiento en medios diferenciales, perfiles proteicos, reacciones serológicas; así como también en su rango de hospederos (Tabla 1-1). Algunos trabajos empleando el gen de ARNr 16S han demostrado que las 5 subespecies están muy relacionadas filogenéticamente (Lee *et al.*, 1997). Otras técnicas moleculares con un mayor poder discriminatorio (rep-PCR) también han permitido diferenciar las cinco subespecies de *C. michiganensis* con los iniciadores ERIC, REP y BOX (Louws *et al.*, 1998).

Tabla 1-1. 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	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>)

Como características principales, *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 (Agris, 2005). Esta bacteria puede cultivarse en un medio nutriente como NBY (Agar caldo-nutriente extracto de levadura) o NAD (Agar Nutriente Dextrosa) donde forma colonias de color amarillo, mucoides, lisas, brillantes, y redondas con el borde entero (Schaad *et al.*, 2001). 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.

1.3 INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

1.3.1 COLONIZACIÓN Y MULTIPLICACIÓN *IN PLANTA*

En los últimos años, hubo un gran avance en la comprensión de mecanismos moleculares mediante los cuales las bacterias fitopatógenas interactúan con su planta hospedera. En el caso de la interacción Cmm-tomate, los estudios realizados en este ámbito son muy recientes. Esta interacción, se puede dividir en dos fases: una fase endofítica y una de inducción de síntomas (Gartemann *et al.*, 2003). La transición a la segunda fase se basa en la multiplicación del patógeno en el xilema llegando a altas poblaciones bacterianas y provocando la formación de agregados bacterianos en la luz del vaso. Como se observa en la Figura 1-7 A y C, Cmm puede formar estructuras en forma de *biofilm* como lo hacen muchas bacterias vasculares. Esto puede llevar a que disminuya la capacidad de conducción de agua dentro de la planta, provocando su deshidratación y posterior muerte. En etapas tempranas de la infección, Cmm invade el protoxilema, pero no los vasos adyacentes (Figura 1-7, B). Este hecho, podría explicar el marchitamiento unilateral observado durante el desarrollo de la enfermedad, y podría ser una estrategia del patógeno para mantener la planta a salvo como fuente nutricional (Chalupowicz *et al.*, 2012).

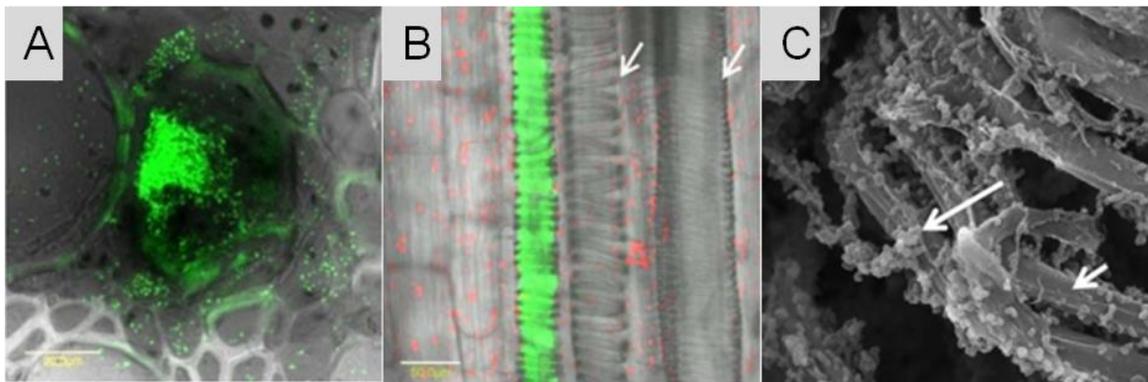


Figura 1-7. Colonización de plantas de tomate (tallos) por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). A y B: Imágenes obtenidas por microscopía de laser confocal (CLSM) con corte transversal (A) y longitudinal (B) 7 días luego de inoculación con una Cmm marcada con la proteína verde fluorescente (eGFP). Las flechas indican vasos no colonizados. C: Imagen obtenida con microscopía electrónica de barrido (SEM) 15 días luego de la inoculación con Cmm. La flecha larga indica las células bacterianas, y la corta el engrosamiento de la pared celular en forma de espiral. Fuente: Chalupowicz *et al.* 2012.

Los exopolisacáridos (EPS) y glicoproteínas producidos por bacterias, pueden interferir en la obstaculización del transporte de agua en los vasos del xilema (Dreier *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha visto que los EPS no son un factor de patogenicidad crucial en Cmm, 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 (Bermphohl *et al.*, 1996). Se cree que los EPS están implicados en la colonización mediante la protección de las células bacterianas por generación de *biofilm* (Chalupowicz *et al.*, 2012; Flügel *et al.*, 2012).

1.3.1 FACTORES DE VIRULENCIA DE CMM

En el año 2008, Gartemann y colaboradores obtuvieron la secuencia completa del genoma de una cepa de Cmm (NCPPB382), lo que permitió avanzar en el conocimiento de los genes implicados en la virulencia de Cmm. El cromosoma de Cmm tiene una capacidad codificadora del 90,5%, de las cuales al 68% se le han asignado funciones biológicas. El mismo incluye la región *chp/tomA* que se ha demostrado que es esencial para la patogenicidad. Además, se identificaron dos plásmidos circulares: pCM1 (27,4 kb) y pCM2 (70,0 kb), los cuales contienen genes de patogenicidad esenciales para la virulencia de Cmm (Gartemann *et al.*, 2008).

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. La región *chp/tomA* constituye una isla de patogenicidad (IPA) del cromosoma y se ha demostrado que una cepa carente de esta región (Cmm27) es incapaz de colonizar efectivamente la planta de tomate (Gartemann *et al.*, 2008). Esta región presenta un bajo contenido en GC y se divide en 2 subregiones: *Chp* y *tomA* (Figura 1-8). La subregión *chp*, contiene genes codificadores de varias serín-proteasas, las cuales tienen un importante rol en la interacción Cmm-tomate. Por ejemplo, se ha demostrado que los genes *chpC* y *ppaA* aumentan su expresión a los 4 días luego de la infección. Esto sugiere que los mismos, podrían estar implicados en el aumento de la población de Cmm dentro de la planta, necesaria para que Cmm se vuelva patógena (Chalupowicz *et al.*, 2010). La subregión *tomA* contiene genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, otros que codifican para glicosidasas, y el gen *tomA*. Esta región si bien no está directamente involucrada en la patogenicidad, permite al patógeno obtener los nutrientes de la planta (Flügel *et al.*, 2012). El gen *tomA* codifica a la tomatinasa, una enzima involucrada en la detoxificación de la α -tomatina, un componente de defensa basal producido por la planta de tomate. El

rol de *tomA* no es del todo claro, ya que cepas deficientes en este gen son igual de virulentas que las cepas salvajes (Sen *et al.*, 2015). Por otra parte, también se han descrito otros genes que codifican para enzimas degradadoras de la pared celular como *pelA1*, *celB*, *xysA* y *xysB* que aumentan su expresión en etapas tempranas de la infección. Estos genes (excepto *pelA1*) se encuentran en el cromosoma por fuera de la región *chp/tomA* de la isla de patogenicidad.

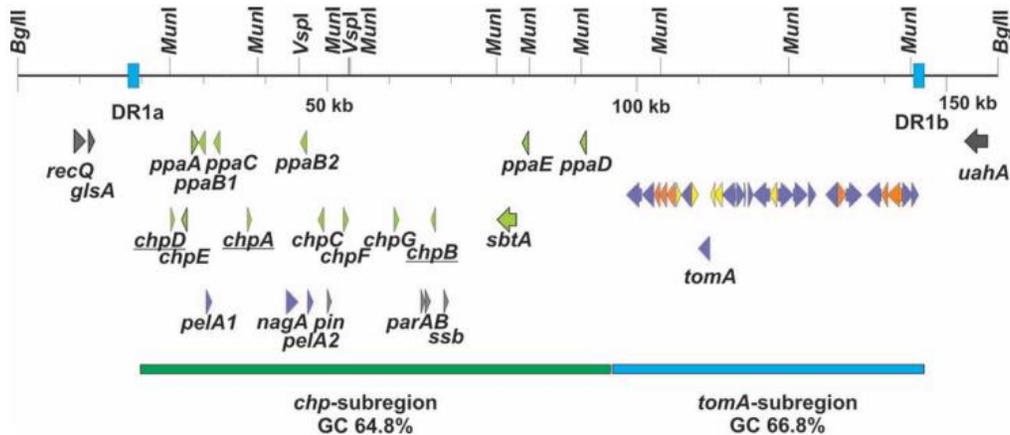


Figura 1-8. Mapa físico de la región *chp/tomA* de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (NCPPB382). Se resaltan en color verde, genes codificadores de serín-proteasas; en amarillo, genes que codifican para reguladores; en anaranjado, genes codificadores de transportadores; y violeta, genes que codifican glicosidasas. Fuente: (Gartemann *et al.*, 2008).

Los plásmidos pCM1 y pCM2 también contienen determinantes genéticos esenciales para la virulencia de Cmm: *celA* y *pat1*, respectivamente. La pérdida de cualquiera de ellos reduce los síntomas, mientras que la ausencia de ambos genes elimina los síntomas aunque la bacteria mantiene la capacidad de colonización de la planta, que permanece como endófito (Gartemann *et al.*, 2008). Ambos genes son inducidos significativamente en las primeras 72 horas luego de la infección, por tanto deben estar asociados a mecanismos que llevan a la aparición de síntomas (por ejemplo mediante cascadas de señalización) (Chalupowicz *et al.*, 2010). El gen *celA* codifica para una β -1,4-endocelulasa (CelA), y tiene 3 dominios: uno catalítico, uno de unión a celulosa, y un tercer dominio 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. Esta celulasa participa en la provisión de nutrientes derivados de la pared celular vegetal y la degradación del tejido en etapas avanzadas de infección. El desarrollo de síntomas puede ser parcialmente atribuido a oligosacáridos generados por CelA que dañan la membrana de las células

vegetales y posiblemente llevan a la producción de etileno. El otro factor de patogenicidad es Pat-1, una serín-proteasa codificada por el gen *pat-1* que se ha demostrado que es esencial para el desarrollo de síntomas (marchitamiento) (Gartemann *et al.*, 2008). En el plásmido pCM2 se identificaron otros dos genes (*phpA* y *phpB*) que también codifican para serín-proteasas y presentan una alta homología con *pat-1*, pero no son esenciales para la patogenicidad (Dreier *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que existe una interdependencia entre la expresión de genes cromosómicos y genes plasmídicos, ya que la expresión de *celA* y *pat1* es notoriamente reducida en ausencia de la región *chp/tomA* y viceversa. Esta interdependencia, se cree que es fundamental en la colonización ya que cepas carentes de la IPA o de uno de los plásmidos no son capaces de colonizar toda la planta, y la bacteria se restringe al sitio de inoculación (Chalupowicz *et al.*, 2010).

1.3.2 MECANISMOS DE DEFENSA VEGETAL

Los pioneros en investigar las respuestas de la planta en la interacción Cmm con tomate fueron Balaji *et al.* (2008), quienes mediante un análisis utilizando la tecnología de *microarrays*, monitorearon cambios en la expresión génica en plantas inoculadas con Cmm y plantas control. De 9254 genes estudiados, encontraron 122 genes con expresión diferencial en las plantas inoculadas. Los mismos fueron clasificados como genes típicos de defensa basal de la planta; incluyendo genes relacionados a la defensa, producción de radicales libres de oxígeno, potenciamiento del recambio proteico y producción de hormonas. Además, también se indujeron genes relacionados con la biosíntesis y respuestas de etileno que, aparentemente juega un rol importante en la inducción de síntomas en tomate (Balaji *et al.*, 2008). Las respuestas basales de la planta incluyen la inducción de proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PR) como quitinasas, glucanasas y proteasas; las cuales presentan actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que la IPA de Cmm cumple un rol importante en la supresión de los mecanismos de defensa basal, ya que en una cepa carente de la IPA (Cmm27) aumenta significativamente la expresión de una quitinasa II y de la proteína PR-5 en comparación con una cepa salvaje (Chalupowicz *et al.*, 2010).

1.4 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Aunque el agente causal del cancro bacteriano del tomate se describió por primera vez a principios del siglo pasado, aún no se ha conseguido un control efectivo de esta enfermedad. Muchos trabajos se centran en la búsqueda de sustancias antibacterianas o agentes de biocontrol, pero una vez que el patógeno se establece en el cultivo y aparecen los primeros síntomas, las medidas que se pueden adoptar para un control efectivo son muy limitadas (De León *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de compuestos antibacterianos (químicos o biológicos) es una de las primeras medidas a las que se recurre cuando aparece un brote de la enfermedad. El modo de acción de estos compuestos puede ser por inducción de resistencia en el huésped o efecto bactericida sobre el patógeno. Los métodos desarrollados hasta el momento para el control de esta enfermedad se centran en cinco aspectos principales: i) prevención, mediante la utilización de material vegetal libre de la bacteria; ii) manejo del cultivo, mediante prácticas culturales que eviten su dispersión; iii) control químico, con productos con actividad antibacteriana que ayuden a reducir los síntomas en campo; iv) control biológico, mediante el uso de microorganismos antagonistas y v) mejoramiento genético del hospedero, enfocado al desarrollo de variedades de tomate con resistencia al patógeno.

1.4.1 CONTROL PREVENTIVO

La sanidad del material vegetal es fundamental para que los cultivos dispongan de las máximas garantías de producción y calidad. Sin embargo, el comercio internacional de semillas y plántulas ha facilitado la introducción y el establecimiento de un gran número de fitopatógenos en diversas regiones geográficas (De León *et al.*, 2011). Para el control del cancro bacteriano del tomate, el uso de semillas sanas es la medida de control más eficiente. Por este motivo, 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 (Oepp/Eppo, 2013). Recientemente, en la Unión Europea se ha fundado una organización llamada *Good Seed and Plant Practices (GSPP)* cuyo objetivo es prevenir la infección de Cmm en lotes de semillas en campos destinados a su producción (<http://www.gspp.eu/>). Este hecho, nos da una idea del alcance que tiene esta enfermedad para las grandes empresas productoras de semillas de tomate del mundo, las cuales se vieron forzadas a implementar dichos controles. Las empresas semilleras han trasladado sus campos de producción a países sub-

desarrollados donde los costos de la mano de obra son menores. Este hecho constituye un riesgo para los patógenos de semilla por su consecuente introducción en zonas donde el patógeno no estaba presente previamente. Hace unos años, la OEPP ha recibido notificaciones de incumplimientos, debido a la detección de Cmm en semillas de tomate de lotes provenientes de países como India, Taiwan, Tailandia, Bolivia y Brasil (De León *et al.*, 2011).

Por otra parte, se han investigado diversos métodos que incluyen tratamientos químicos o térmicos de las semillas con el objetivo de proveer un protocolo efectivo para la obtención de semillas libres del patógeno. En el caso del tomate, una de las prácticas más habituales es la fermentación hasta 96 hs. de la semilla en la propia pulpa del fruto, otros tratamientos incluyen extracción de las semillas con ácidos, uso de sustancias antimicrobianas, etc. El tratamiento térmico, implica sumergir las semillas en agua a una temperatura de aproximadamente 50°C y mantenerlas durante cierto intervalo de tiempo. Sin embargo, la mejora del poder desinfectante no deberá ir acompañada de efectos nocivos sobre la semilla. En el trabajo de Maeso y Walasek (2012) recomiendan el baño en hipoclorito de sodio (1% cloro activo por un minuto) para el tratamiento de las semillas. Si bien son efectivos en reducir la población de Cmm, no existe ningún método que asegure la completa erradicación del patógeno de la semilla de tomate sin afectar su germinación (De León *et al.*, 2011).

Con el fin de realizar un control preventivo de esta enfermedad, se han realizado numerosos trabajos para desarrollar y optimizar nuevas técnicas de detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas o semillas. La sensibilidad del método es fundamental a la hora de emitir un diagnóstico fiable ya que material certificado como libre de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* puede estar contaminado con bajas concentraciones de la bacteria, suficientes para iniciar una epidemia en condiciones favorables (Gleason *et al.*, 1993). En el Capítulo 4 de la presente tesis se abarca la evaluación de métodos para la detección de Cmm, y en la introducción del mismo se resumen los más utilizados.

1.4.2 MANEJO DEL CULTIVO

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). Cuando la producción se realiza en cultivo protegido en invernaderos, se recomienda antes de iniciar el cultivo hacer una desinfección de los postes, vigas y cualquier estructura que pueda ser reservorio del patógeno. 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 Uruguay, se han llevado a cabo trabajos de evaluación de desinfección de las herramientas de poda y aplicación de productos durante el riego, pero en ningún caso se encontraron medidas que hayan prevenido totalmente la transmisión de Cmm (Maeso *et al.*, 2015a). Además, en las normas de producción integrada de tomate bajo invernáculo se establecen medidas como evitar exceso de humedad, erradicar plantas infectadas y plantas vecinas asintomáticas, y desinfección de herramientas de corte con hipoclorito (Banchemo *et al.*, 2008)

1.4.3 CONTROL QUÍMICO

En cuanto al control químico se puede recurrir a aplicaciones de productos como sulfato de cobre, hidróxido de cobre, estreptomina o mezclas de cobre con Mancozeb o con estreptomina. Los productos cúpricos, tienen buen efecto bactericida, pero son incapaces de penetrar a la planta para eliminar la bacteria. Este tipo de sustancias son más efectivas cuando se combinan con Mancozeb, sugiriendo un efecto sinérgico de ambos compuestos (Hausbeck *et al.*, 2000). El tratamiento de esta enfermedad con sustancias antimicrobianas está poco documentado, y los escasos datos que existen apuntan a una baja eficacia. En muchos casos se ha comprobado la eficacia de estas sustancias *in vitro* pero sus efectos *in vivo* no han sido evaluados (De León *et al.*, 2008). En experimentos realizados *in vitro* por De León *et al.* (2008) se mostró que los antibióticos; ácido oxolínico, oxitetraciclina y estreptomina presentaban un gran efecto bactericida contra Cmm. Sin embargo, utilizando estos mismos compuestos *in vivo*, se demostró que los síntomas aparecían igual en mayor o menor medida. Entonces, si bien estos tratamientos reducen la incidencia de la enfermedad, ninguno de ellos es capaz de controlar efectivamente este patógeno. En Uruguay, actualmente están autorizados productos formulados a base de hidróxido de cobre, kasugamicina y estreptomina, para su uso en el cultivo de tomate (MGAP/DIGESSAA, 2016). Sin embargo, en muchos países los antibióticos están prohibidos en la agricultura por su inherente posibilidad de inducción de resistencia (De León *et al.*, 2011). Por su parte, la aplicación intensiva de productos cúpricos en cultivos comerciales a lo largo de los años lleva a la acumulación de cobre en suelo, lo que trae consecuencias negativas para las plantas y el ambiente (De León *et al.*, 2008).

1.4.4 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico se define como la reducción de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno que se quiere controlar (Cook y Baker, 1983). Así, se establecen 3 formas posibles de control biológico: utilización de microorganismos antagonistas, el uso de fungicidas derivados de plantas y manipulación de resistencia del hospedero. Ha habido algunos intentos de controlar a Cmm mediante el uso de agentes de biocontrol, ya sea mediante el uso de bacterias antagonistas, compost, activadores vegetales para la inducción de resistencia, o aceites vegetales. Por ejemplo se ha visto antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* (De Boer *et al.*, 1999) y que el tratamiento de semillas con *Pseudomonas fluorescens* mejora su calidad en condiciones de laboratorio y reduce la incidencia de cancro bacteriano en campo (Umesha, 2006). Maeso *et al.* (2015b) encontraron un efecto beneficioso en el control del cancro bacteriano del tomate en aplicaciones foliares de productos a base de *Bacillus subtilis*. Otros trabajos indican que el pre-tratamiento de plántulas con el inductor de resistencia *acibenzolar-S-methyl* reduce la severidad de la enfermedad así como el crecimiento de la bacteria en la planta (Soylu *et al.*, 2003). Más recientemente, se observó que la aplicación de esporas de *Pseudozyma aphidis* en plantas de tomate en invernáculo reduce significativamente (60%) la incidencia de cancro bacteriano causado por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. El mecanismo de acción es por activación de genes relacionados con la patogénesis (PR) en las plantas de tomate, que llevan a una respuesta de inducción de resistencia (Barda *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso de estas alternativas actualmente está lejos de proporcionar un control exitoso de la enfermedad en el cultivo de tomate (De León *et al.*, 2011).

1.4.5 RESISTENCIA GENÉTICA

El uso de hospederos resistentes es uno de las estrategias más efectivas y ambientalmente convenientes para el control de enfermedades que afectan a los cultivos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados hoy en día no se dispone de cultivares de tomate con resistencia completa a cancro bacteriano (Sen *et al.*, 2012). Se han reportado algunas especies de *Solanum* con cierto grado de resistencia a Cmm. Por ejemplo, la especie silvestre *S. peruvianum* presenta resistencia caracterizada por la desaparición de síntomas de marchitamiento y crecimiento limitado de la bacteria dentro de la planta (van Heusden *et al.*, 1999). A su vez, también se han reportado algunas accesiones de especies

silvestres de tomate con cierta tolerancia a Cmm como *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites* y *S. parviflorum*. Algunas fuentes de resistencia han sido incorporadas en *S. lycopersicon* generando líneas o variedades tolerantes, como Bulgaria 12 (Elenkov, 1965), Heinz2990 (Emmatty y John, 1973) y Okitsu Sozay (Kuriyama y Kuniyasu, 1974). Este germoplasma presenta altos niveles de tolerancia al marchitamiento inducido por Cmm, aunque actualmente se encuentra en un estado marginal de mejoramiento respecto a los cultivares modernos. Una de las principales limitantes encontradas ha sido la dificultad de generar buenos niveles de tolerancia en líneas *elite* sin incorporar caracteres negativos ligados a la resistencia. La complejidad de la base genética hasta ahora encontrada y las dificultades en los fenotipados han dificultado este proceso (MSc. Matías González, com. pers.).

1.5 ANTECEDENTES EN URUGUAY Y JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

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.

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, se han evaluado algunas estrategias de control del patógeno como la aplicación de productos cúpricos sobre el follaje y en riego, uso de desinfectantes sobre tijeras de poda, así como métodos de desinfección de semillas (Maeso *et al.*, 2015a; Maeso *et al.*, 2015b, Maeso y Walasek, 2012).

Nuestro grupo comenzó a estudiar este patógeno en el marco del Programa Grupos de Investigación CSIC I+D 2010 “Fitopatógenos de importancia hortícola: estudios dirigidos a contribuir a su control integrado”. Este programa abarcó el estudio de varios fitopatógenos relevantes para los cultivos de papa, tomate y cebolla y contempla la participación de investigadores de diversas instituciones (Facultad de Química, Facultad de Agronomía, INIA). En esta problemática realicé mi Tesis de Licenciatura en Bioquímica, que abarcó la optimización y evaluación de un método para la detección de Cmm en

material de propagación (Croce, 2012). La experiencia y perspectivas de trabajo generadas a partir de este primer estudio, dieron lugar al planteamiento de la presente tesis.

Si bien el cancro bacteriano del tomate se ha reportado en Uruguay desde la década del 80' nunca se profundizó en el estudio de este patógeno. La Cátedra de Fitopatología de Facultad de Agronomía, el INIA y el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) cuentan con aislados del patógeno provenientes de brotes surgidos en Uruguay desde el año 1997. Los daños ocasionados en diversas plantaciones tanto en el norte como sur del país fueron cuantiosos, y no se ha realizado un relevamiento de las cepas presentes hasta el momento. Para poder diseñar estrategias de manejo exitosas es fundamental contar con información y herramientas disponibles para evaluar la introducción y subsecuente diseminación de Cmm en los cultivos. En este contexto, en esta tesis se propone realizar el correspondiente relevamiento y la caracterización genética de la población de Cmm presente en Uruguay. Recientemente, el grupo de Marie-Agnès Jacques del INRA-Angers realizó el análisis de una colección mundial de cepas de Cmm, incluyendo también cepas pertenecientes a otras subespecies de *Clavibacter michiganensis* y cepas *Clavibacter-like* no patogénicas (Jacques *et al.*, 2012). La metodología empleada en este estudio (*Multilocus Sequence Analysis and Typing*, MLSA-MLST), demostró una muy buena reproducibilidad y capacidad de discriminación entre cepas, lo que resalta su aplicabilidad a estudios epidemiológicos que profundicen en los mecanismos de transmisión de este importante patógeno.

Las semillas de tomate contaminadas por Cmm son el origen principal de las infecciones de los cultivos de tomate y las responsables de que la bacteria se haya distribuido por diversas regiones productoras del mundo (Oepp/Eppo, 2013). Concentraciones muy bajas del patógeno en la semilla son suficientes para que, en condiciones ambientales favorables se pueda desencadenar una epidemia. Por este motivo, los países han adoptado medidas cuarentenarias para controlar la comercialización de semillas o plántulas de tomate infectadas con el patógeno y se aconseja el análisis de este material vegetal como estrategia para el control preventivo de la enfermedad (EFSA, 2014). Las técnicas utilizadas en los protocolos de análisis de semillas de tomate de organizaciones enfocadas al control fitosanitario como la EPPO y la ISF (*International Seed Federation*), recomiendan la siembra en medios de cultivo semi-selectivos y posterior identificación del patógeno a partir del análisis de las colonias con apariencia típica

de Cmm. Esta estrategia basada en el cultivo del patógeno, permite detectar la presencia de células viables y contar con un aislamiento que sirve como respaldo de los resultados positivos. Sin embargo, esta bacteria crece lentamente en estos medios y suele verse inhibida por el crecimiento más rápido o la competencia con otros microorganismos presentes en la semilla. Consecuentemente, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de detección con alta especificidad y sensibilidad, que contribuyan a mejorar el control del estado fitosanitario de los materiales de propagación. La PCR a tiempo real ha mostrado ser rápida, sensible y específica para la detección de Cmm. Sin embargo, al utilizar muestras complejas para realizar la detección, como semillas o plantas de tomate, pueden presentarse problemas de inhibición y es necesario mejorar la sensibilidad. Debido a esto en esta tesis se plantea la evaluación de distintas estrategias como la BIO-qPCR, para evaluar la mejora de la sensibilidad de detección de la bacteria en semillas o plantas de tomate contaminadas.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y PRESENTACIÓN DE LA TESIS

2.1 OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es generar conocimiento que contribuya al establecimiento de estrategias de control del cancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un relevamiento de las cepas de Cmm que afectan los cultivos de tomate en Uruguay.
2. Evaluar la diversidad genética de las cepas de Cmm presentes en Uruguay mediante la técnica MLSA-MLST y realizar una comparación con cepas de la bacteria de otras áreas geográficas
3. Desarrollar un método basado en el uso de qPCR para la detección de Cmm en material de propagación (semillas y plántulas de tomate).

2.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Esta tesis plantea dos hipótesis:

1. El análisis mediante MLSA-MLST es una herramienta capaz de discriminar los aislados de Cmm a nivel de cepa. Este método puede ser utilizado para estudiar el origen de los brotes de cancro bacteriano y las principales vías de introducción y diseminación de este patógeno en Uruguay.
2. La PCR a tiempo real ha mostrado ser una herramienta efectiva en el diagnóstico molecular de fitopatógenos. Es posible ajustar un método basado en qPCR para la detección directa de Cmm en muestras vegetales, como herramienta de diagnóstico molecular que pueda contribuir al control fitosanitario de material de propagación.

2.3 PRESENTACIÓN DE LA TESIS

El trabajo experimental realizado en el marco de esta tesis se divide en dos grandes capítulos.

En el **Capítulo 3**, se presenta un relevamiento de las cepas de Cmm presentes en Uruguay, así como su caracterización y tipificación a través de técnicas moleculares. Este capítulo abarca los resultados presentados en el artículo “*Multilocus Sequence Typing reveals high variability among Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strains affecting tomato crops in Uruguay*”, publicado en enero de 2016 en la revista *European Journal of Plant Pathology* (Anexo I). En dicho artículo se compara una colección de 39 aislados de Uruguay con una colección mundial de cepas de Cmm mediante la técnica MLSA-MLST. Este trabajo se realizó en el marco de una colaboración con la Dra. Marie Agnès Jacques del IRHS - INRA (*Institut de Recherche en Horticulture et Semences - Institut National de la Recherche Agronomique*) de la ciudad de Angers, Francia. Durante los meses de marzo a mayo de 2014 se realizó una pasantía de investigación en este laboratorio, en la cual se recibió capacitación para el análisis de datos por MLSA-MLST y se llevó a cabo el análisis de las cepas de Cmm aisladas hasta el momento. En una etapa posterior de esta tesis, se obtuvieron nuevos aislados de Cmm los cuales fueron incorporados al análisis que se presenta en este capítulo. También se incluye la evaluación de diversos métodos disponibles para la identificación de cepas de Cmm.

En el **Capítulo 4**, se presenta la evaluación y optimización de un protocolo de detección de Cmm por qPCR en semillas y plantas de tomate asintomáticas, las cuales constituyen las principales vías de diseminación de este patógeno. Se evaluaron diferentes metodologías y abordajes experimentales y se optimizaron las condiciones para lograr la detección del patógeno viable con adecuada sensibilidad y especificidad. Parte de este trabajo se realizó durante una pasantía en el Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria de Madrid, España, en el marco de la colaboración establecida con el Dr. Leandro de León.

Finalmente, en el **Capítulo 5** se presentan las conclusiones de los principales resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis así como las perspectivas del trabajo.

CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*

3.1 INTRODUCCIÓN

La caracterización de la estructura poblacional y diversidad genética de fitopatógenos es fundamental en la determinación de posibles fuentes de inóculo y para diseñar medidas efectivas para el control de las enfermedades (Quesada-Ocampo *et al.*, 2012). Al igual que para otros patógenos, cada vez que surgen brotes importantes de cancro bacteriano del tomate, consecuentemente se reportan trabajos de estudios epidemiológicos de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). El conocimiento de la estructura genética y poblacional de Cmm en cada país puede contribuir a definir los riesgos cuarentenarios que deben adoptarse. Debido a esto, recientemente se han desarrollado diversas técnicas de tipificación y caracterización del patógeno (Tabla 3-1). Muchos de estos trabajos comparan más de una técnica para evaluar la eficacia de cada una de ellas.

La metodología basada en secuencias repetitivas del genoma (Rep-PCR) ha sido muy utilizada en la caracterización de bacterias fitopatógenas, debido a su relativa rapidez y sencillez. Louws *et al.* (1999) desarrollaron esta técnica para la identificación y diferenciación de las distintas subespecies de *C. michiganensis*. En particular, estos autores fueron los primeros en lograr diferenciar cepas dentro de la subespecie *michiganensis* mediante la utilización de *primers* BOX. Esta técnica fue ampliamente utilizada en posteriores estudios epidemiológicos de Cmm permitiendo la diferenciación de cuatro grupos principales dentro de la subespecie (Kawaguchi *et al.*, 2010; Kleitman *et al.*, 2008; De León *et al.*, 2009; Nazari *et al.*, 2007). Sin embargo, las propias dificultades inherentes a la técnica, como la identificación de los patrones de PCR (subjetividad de los geles), vuelve a la misma irreproducible a nivel interlaboratorio reduciendo su efectividad (Tancos *et al.*, 2015). Lo mismo sucede con otras técnicas como *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) y *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE). PFGE ha sido utilizada para estudiar la diversidad genética de cepas de Cmm en Israel y en Serbia comparando la técnica con Rep-PCR y MLSA-MLST, respectivamente (Kleitman *et al.*, 2008; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012). En ambos casos, los resultados obtenidos utilizando técnicas diferentes fueron similares. La técnica *Amplified*

Fragment Length Polymorphism (AFLP), recientemente utilizada por Ialacci *et al.* (2015), tiene un alto poder discriminatorio pero es cara, requiere mucho tiempo y es muy laboriosa. Otra técnica, *Multilocus Variable Number Tandem Repeats Analysis* (MLVA), basada en la amplificación por multiplex-PCR de secuencias repetidas en el genoma (VNTR, *variable number of tandem repeats*) también ha sido desarrollada recientemente y aplicada con éxito para la tipificación de Cmm (Zaluga *et al.*, 2013).

Tabla 3-1. Resumen de técnicas de tipificación utilizadas para estudios de diversidad genética de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Origen de los aislados	Técnica(s) utilizada(s) ^a	Referencia
Islas Canarias (España)	RAPD-PCR BOX-PCR AFLP	De León <i>et al.</i> (2009)
Israel	PFGE Rep-PCR (ERIC y BOX)	Kleitman <i>et al.</i> (2008)
Azerbaiyán (Irán)	Perfiles proteicos Rep-PCR	Nazari <i>et al.</i> (2007)
Turquía	ISSR-PCR	Baysal <i>et al.</i> (2011)
Okayama (Japón)	Rep-PCR (ERIC y BOX)	Kawaguchi <i>et al.</i> (2010)
Japón (9 prefecturas)	Rep-PCR (ERIC y BOX) ISSR-PCR	Kawaguchi y Tanina (2014)
Serbia	MLSA-MLST PFGE	Milijašević-Marčić <i>et al.</i> (2012)
Michigan (EEUU)	BOX-PCR <i>Bayesian Cluster analysis</i> (6 genes)	Quesada-Ocampo <i>et al.</i> (2012)
Sicilia (Italia)	BOX-PCR <i>Fluorescent AFLP</i>	Ialacci <i>et al.</i> (2015)
Nueva York (EEUU)	MLSA-MLST BOX-PCR	Tancos <i>et al.</i> (2015)
Bélgica	MLVA	Zaluga <i>et al.</i> (2013)
Colección mundial	MLSA-MLST	Jacques <i>et al.</i> (2012)

^a RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*, Rep-PCR: *Repetitive Sequence-based PCR*, PFGE: *Pulse Field Gel Electrophoresis*, ISSR: *Inter Simple Sequence Repeat*, AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*, MLSA-MLST: *Multilocus Sequence Analysis and Typing*, MLVA: *Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis*.

En este trabajo nos enfocamos a analizar la diversidad genética de Cmm utilizando la técnica *Multilocus Sequence Analysis and Typing* (MLSA-MLST). Este método desarrollado por Maiden *et al.* (1998) ha demostrado ser rápido, eficiente y reproducible para la determinación de la variabilidad genética de varios patógenos (Almeida *et al.*, 2010; Maiden *et al.*, 1998; Nunney *et al.*, 2012). La técnica surgió como

una alternativa a otras técnicas de tipificación como Rep-PCR o PFGE, donde enzimas de restricción o *primers* de PCR son seleccionados con el fin de aportar la máxima variación entre la especie en cuestión. Este tipo de técnicas responden bien a la epidemiología de corto plazo, es decir buscan variaciones que cambian rápidamente en los genomas. Sin embargo, la técnica de MLST, así como su antecesora MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), utiliza regiones del genoma cuya variación se acumula muy lentamente en las poblaciones bacterianas, por tanto es útil para epidemiología a largo plazo o epidemiología global (Maiden *et al.*, 1998). Una de las características más destacables de esta técnica es que los resultados pueden ser fácilmente comparados entre laboratorios debido a la portabilidad de los mismos.

Multilocus Sequence Analysis y *Typing* se basa en la amplificación por PCR de fragmentos internos de usualmente siete genes de mantenimiento celular (*housekeeping*), y la detección de variantes alélicas por diferencias en sus secuencias nucleotídicas. Cada región de aproximadamente 450-500 pb se secuencia y a aquellas que sean únicas entre las cepas estudiadas se les asigna un número arbitrario de alelo. De esta forma cada cepa queda identificada por un conjunto de alelos dados por cada *locus*, lo que constituye su secuenciotipo (ST) (Pérez-Losada *et al.*, 2013). Mientras que MLSA se basa en la comparación de secuencias parciales de ADN de cada gen, el MLST es más específico y se basa en el análisis de la combinación de alelos en cada *locus* definiendo un secuenciotipo (ST). Por tanto, el MLSA provee una herramienta robusta para identificación de especie y el MLST se utiliza para una identificación a nivel infra-específico.

Las secuencias obtenidas luego pueden ser comparadas con secuencias depositadas en bases de datos, lo que permite integrar fácilmente nuevos datos a medida que se analiza un mayor número de aislados. Además, laboratorios de diferentes países pueden comparar sus cepas sin necesitar transportarlas y así evitar las limitaciones que implican las regulaciones cuarentenarias. Debido al uso creciente de esta técnica para el estudio de bacterias fitopatógenas, se ha creado una base de datos accesible *online* que permite tener una plataforma cooperativa donde poder bajar otras secuencias disponibles del patógeno de interés y así compararlas con las propias (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>). La base de datos de bacterias fitopatógenas PAMDB (*Plant-associated microbes database*) fue creada por varios investigadores de todo el mundo en el año 2010 conteniendo información de MLSA-MLST para *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas* sp., *Ralstonia solanacearum*, y *Acidovorax* (Almeida *et al.*, 2010). En esta plataforma, los usuarios pueden obtener toda la información disponible de MLSA-MLST para un

patógeno de interés: los esquemas disponibles (cuáles genes *housekeeping* utilizan, los *primers* diseñados para PCR), los alelos ya asignados para las cepas estudiadas, etc. Además, mediante contacto previo y registro con los administradores se puede solicitar la incorporación de nuevos patógenos a la base de datos. Muy recientemente, se ha incorporado a Cmm en esta plataforma, encontrándose actualmente disponibles los esquemas de MLSA-MLST de Jacques *et al.* (2012), Milijašević-Marčić *et al.* (2012) y el recién añadido de Sen *et al.* (2015). Los distintos esquemas de MLST se diferencian en el uso de distintos genes *housekeeping* e incluso algunos también incluyen genes de patogenicidad en el análisis (Tancos *et al.*, 2015).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 AISLAMIENTO DE CEPAS DE CMM

Se colectaron plantas de tomate con síntomas de cancro en diferentes quintas e invernáculos de las dos principales zonas productoras de tomate de Uruguay entre los años 2011 y 2014. Para este relevamiento se contó con la colaboración de Matías González (INIA, Salto Grande) y Diego Maeso (INIA, Las Brujas). En diciembre del año 2012, se recorrieron diversas quintas del departamento de Salto, donde se colectaron muestras de tallos con síntomas. Se observaron plantas con síntomas típicos de cancro bacteriano, como el marchitamiento generalizado de las mismas y en algunos casos marchitamiento unilateral en las hojas (Figura 3-1). Por otra parte, durante el año 2014 se obtuvieron muestras de tallos provenientes mayoritariamente de quintas de Canelones y Montevideo, aportadas por el Ing. Agr. Diego Maeso. Las cepas bacterianas fueron aisladas a partir de tallos que presentaban una coloración interna amarronada y en algunos casos canchros superficiales. Para ello, se cortó una pequeña sección del interior del tallo que presentaba esta coloración, se realizaron lavados con una solución de hipoclorito al 1% durante 30 s y sucesivos lavados con agua estéril. Los pequeños trozos de tallo se colocaron en bolsas, se agregaron 5 ml de agua estéril y se maceró, obteniendo un extracto turbio. A partir de los mismos, se realizaron los aislamientos por estría en medio NBY (*Nutrient Broth Yeast*), y las placas se incubaron a 28°C durante 48-72 horas. Posteriormente se realizaron re-aislamientos para obtener cultivos puros.



Figura 3-1. Foto de un cultivo protegido de tomate afectado por cancro bacteriano (Salto, diciembre de 2012). A. Marchitamiento generalizado en toda la fila del invernáculo y B. Planta de tomate con marchitez.

En la Tabla 3-2 se detalla la colección total de 54 aislados de Cmm aisladas en Uruguay, las cuales se encuentran actualmente conservadas a -70°C en glicerol 10% y están incluidas en la colección MAI (Microorganismos de Interés Agrícola e Industrial) del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química. Además de las cepas aisladas en el marco de esta tesis, también se incluyen en la colección cepas de brotes anteriores de cancro bacteriano aportadas por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca y la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía.

3.2.2 ENSAYOS DE PATOGENICIDAD

Se realizó la siembra de las semillas de tomate cv. Repique en almaciguera con sustrato para horticultura profesional (*Tref, Jiffy Products International*, Holanda). Cuando los plantines comenzaron a desarrollar sus primeras hojas verdaderas, se transplantaron a macetas más grandes. Se mantuvieron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas: temperatura de 25°C , fotoperíodo de 10 horas de luz y 14 hs en oscuridad, humedad 70-80% en todo el ciclo. Se utilizaron plantas de tomate de 4 semanas para realizar las inoculaciones con cada cepa y así analizar su patogenicidad. El procedimiento de inoculación consistió en realizar una herida con aguja estéril en el pecíolo correspondiente a la segunda hoja verdadera y luego inocular con un palillo estéril embebido en una colonia fresca de la bacteria (Jacques *et al.*, 2012). Se inocularon 4 plantas con cada cepa y 4 plantas adicionales se inocularon con agua como control negativo. Las plantas inoculadas y los controles se mantuvieron en cámara de crecimiento a 28°C

y se registró la aparición de síntomas hasta los 22 días luego de la inoculación. 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.

Tabla 3-2. Colección de aislados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de Uruguay.

Nombre	Origen		Nombre	Origen	
	Departamento	Año		Departamento	Año
MAI 1001	Salto	2012	MAI 1028	Salto	2011
MAI 1002	Salto	2012	MAI 1029	Salto	2011
MAI 1003	Salto	2012	MAI 1030 ^b	Montevideo	2010
MAI 1004	Salto	2012	MAI 1031 ^b	Montevideo	2010
MAI 1005	Salto	2012	MAI 1032 ^b	Montevideo	2010
MAI 1006	Salto	2012	MAI 1033 ^b	Montevideo	2010
MAI 1007	Salto	2012	MAI 1034 ^b	Montevideo	2010
MAI 1008	Salto	2012	MAI 1035 ^b	Montevideo	2010
MAI 1009	Salto	2012	MAI 1036 ^b	Montevideo	2010
MAI 1010	Salto	2012	MAI 1037 ^b	Montevideo	2010
MAI 1011	Salto	2012	MAI 1038 ^b	Montevideo	2010
MAI 1012	Salto	2012	MAI 1039 ^b	Montevideo	2010
MAI 1013	Salto	2012	MAI 1040 ^b	Montevideo	2010
MAI 1014	Salto	2012	MAI 1041	Canelones	2014
MAI 1015	Salto	2012	MAI 1042	Canelones	2014
MAI 1016	Salto	2012	MAI 1043	Canelones	2014
MAI 1017 ^a	San José	2012	MAI 1044	Canelones	2014
MAI 1018 ^a	San José	2012	MAI 1045	Montevideo	2014
MAI 1019 ^a	Montevideo	2012	MAI 1046	Montevideo	2014
MAI 1020 ^a	Montevideo	2012	MAI 1047	Montevideo	2014
MAI 1021 ^a	Montevideo	2012	MAI 1048	Montevideo	2014
MAI 1022 ^a	Artigas	1997	MAI 1049	Montevideo	2014
MAI 1023 ^a	Artigas	1997	MAI 1050	Montevideo	2014
MAI 1024 ^a	Artigas	1997	MAI 1051	Salto	2014
MAI 1025 ^a	Montevideo	2005	MAI 1052	Salto	2014
MAI 1026 ^a	Canelones	1999	MAI 1053	Canelones	2014
MAI 1027 ^a	Canelones	2008	MAI 1054	Canelones	2014

^a Cepas provistas por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP-Uruguay).

^b Cepas provistas por la Cátedra de Fitopatología de Facultad de Agronomía (UdelAR).

3.2.3 IDENTIFICACIÓN DE CMM POR MÉTODOS MOLECULARES

Se realizó la extracción del ADN genómico de cada aislado según el protocolo de Sambrook y Russell (2001). La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X y tinción con *Good View (Ecoli s.r.o, Bratislava, Eslovaquia)*. Posteriormente, se realizó su cuantificación mediante espectrofotometría (A_{260nm}) en un equipo Nanodrop ND-100 (*Nanodrop Technologies*). La concentración se ajustó a 10 ng/ μ l y se conservó a -20°C hasta su uso.

Para la identificación de los aislados se utilizaron diferentes métodos basados en PCR convencional y qPCR (Tabla 3-3). En una primera instancia, se realizó la amplificación del gen del ARNr 16S utilizando *primers* universales para el dominio *Bacteria* Eub 27F/1492R (Lane, 1991). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo: 1X de *Taq buffer (Invitrogen)*, 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada *primer*, 0,4 U de *Taq* polimerasa (*Invitrogen*) y 20 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: desnaturalización inicial (94°C, 5 minutos) seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 60 s), hibridación (55°C, 60 s) y extensión (72°C, 60 s); y una etapa de extensión final (72°C, 5 minutos). Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por *Macrogen Services* (Seoul, 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*. También se realizó la identificación de todos los aislados mediante amplificación con *primers* específicos dirigidos a la región intergénica ITS (PSA4/R), siguiendo las condiciones reportadas por Pastrik y Rainey (1999). En todos los casos, se verificó el tamaño del producto de amplificación por electroforesis en gel de agarosa 1,0 % en buffer TBE 0.5X y tinción con *Good View (Ecoli s.r.o, Bratislava, Eslovaquia)*, utilizando como referencia un marcador de peso molecular comercial (*Smart Ladder, Eurogentec*).

Tabla 3-3. Sistemas utilizados para la identificación y caracterización de cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Objetivo	Primers/sonda	Blanco	Tamaño del producto	Secuencia 5'- 3'	Referencia
Identificación	27F 1492R	ARNr 16S	1465 pb	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACT	Lane (1991)
	PSA-4 PSA-R	ITS	270 pb	TCATTGGTCAATTCTGTCTCCC TACTGAGATGTTTCACTTCCCC	Pastrik y Rainey (1999)
	<i>Spm4F</i> <i>Spm2R</i> <i>CMM (sonda)</i>	ITS	223 pb	TCAGGCGTCTGTTCTGGC CCCACCACCATCCACAAC FAM-CCTTCTGGGTGTGTCTGGTTTC-TAMRA	Luo <i>et al.</i> (2008)
	<i>RZ_Ptssk 10</i> <i>RZ_Ptssk 11</i> <i>RZ_Ptssk 12 (sonda)</i>	<i>Ptssk</i>	132 bp	GGG GCC GAA GGT GCT GGT G CGT CGC CCG CCC GCT G FAM-TGGTCG TCC TCG GCG-BHQ1	Berendsen <i>et al.</i> (2011)
	<i>MVS21 F</i> <i>MVS21 R</i> <i>MVS21 (sonda)</i>	nr	83 pb	CTAGTTGCTGAATCCACCCAG TACCGCTTGACTCTCGTTTC HEX-CTGCCACCCGATGTTGTTGTTCC-BHQ1	ISF (2015)
	CMM5 (P5) CMM6 (P6)	<i>pat-1</i> (pCM2)	614 pb	GCG AAT AAG CCC ATA TCA A CGT CAG GAG GTC GCT AAT A	Dreier <i>et al.</i> (1995)
	PFC3 PFC5	<i>celA</i> (pCM1)	580 pb	GGTACGAAGTTCGAGACGAC TGTAGCGGTGAGTCGTGGTGA	Kleitman <i>et al.</i> (2008)
	<i>ppaA-F</i> <i>ppaA-R</i>	<i>ppaA</i> (PAI)	587 pb	CATGATATTGGTGGGAAAG CCCCGTCTTTGCAAGACC	Kleitman <i>et al.</i> (2008)
	<i>chpC-F</i> <i>chpC-R</i>	<i>chpC</i> (PAI)	638 pb	GCTCTTGGGCTAATGGCCG GTCAGTTGTGGAAGATGCTG	Kleitman <i>et al.</i> (2008)
	<i>tomA-F</i> <i>tomA-R</i>	<i>tomA</i> (PAI)	528 pb	CGAACTCGACCAGGTTCTCG GGTCTCACGATCGGATCC	Kleitman <i>et al.</i> (2008)

nr: no reportado

Para la identificación de los aislados fueron utilizados también tres sistemas de *primers* y sonda *TaqMan* diseñados para qPCR (Tabla 3-3). Uno de ellos es el sistema *Spm4F/2R*, diseñado por Luo *et al.* (2008) que tiene como blanco la región intergénica ITS. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 10 µl conteniendo: 1X de *master mix* (*Quanti-Tec, Qiagen*), 0,40 µM de cada *primer*, 0,20 µM de sonda y 20 ng de ADN. Se utilizó el equipo *Rotor-gene 6000 Real-Time Rotary Analyzer* (*Corbett Life Science*) con las siguientes condiciones de ciclado: 15 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 s a 94°C y 60 s a 60°C (Luo *et al.*, 2008). Los otros dos sistemas *TaqMan* utilizados son los recomendados por la *International Seed Federation* (ISF) y se encuentran disponibles en el protocolo “*Method for the Detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on Tomato Seed*” (ISF, 2015; Anexo II). Uno de ellos es el sistema *Ptssk* (*Putative Two-component System Sensor Kinase*) (Berendsen *et al.*, 2011) y el otro es el sistema *MVS21* (ISF, 2015). Ambas amplificaciones se realizaron en un volumen final de 12,5 µl conteniendo: 1X de *master mix* (*Rotor gene, Qiagen*), 0,24 µM de cada *primer* y de la sonda, y 20 ng de ADN. Se utilizó el equipo *Rotor-gene 6000 Real-Time Rotary Analyzer* (*Corbett Life Science*) bajo las siguientes condiciones: 5 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 30 s a 60°C. Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

3.2.4 AMPLIFICACIÓN DE GENES DE PATOGENICIDAD

Para caracterizar el potencial patogénico de las cepas aisladas, se evaluó la presencia de genes específicos involucrados en la patogenicidad de Cmm: *pat1*, *celA*, *ppaA*, *chpC* y *tomA* (Dreier *et al.*, 1995; Kleitman *et al.*, 2008) (Tabla 3-3). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo: 1X de *GoTaq buffer* (*Promega*), 250 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada *primer*, 0,4 U de *GoTaq* polimerasa y 20 ng de ADN. El tamaño de los productos de PCR fue verificado mediante electroforesis tal como se mencionó anteriormente.

3.2.5 MULTI LOCUS SEQUENCE ANALYSIS AND TYPING (MLSA-MLST)

Con el objetivo de conocer más a fondo la estructura poblacional, se llevó a cabo la tipificación de la colección a través de la técnica MLSA-MLST. El procedimiento abarcó la amplificación de 5 genes *housekeeping* previamente reportados (Jacques *et al.*, 2012): *atpD* (*ATP synthase β chain*), *dnaK* (*70 kDa heat shock protein*), *gyrB* (*DNA gyrase β subunit*), *ppk* (*polyphosphate kinase*) y *recA* (*recombinase A*) (Tabla 3-4). Cada amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo: 1x *GoTaq*

buffer (Promega), 200 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de cada *primer*, 0,75 U de *GoTaq* polimerasa y 5 ng de ADN. Las reacciones se realizaron utilizando un termociclador (*Applied Biosystems*) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94°C, 5 min; seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 60 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 30 s; y una extensión final durante 7 min a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos fueron chequeados en gel para verificar su tamaño y posteriormente enviados a secuenciar en ambas direcciones a *Genoscreen* (Lille, Francia) o *Macrogen* (Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas para cada producto (*forward* y *reverse*) fueron ensambladas, editadas, traducidas y alineadas usando el *software Geneious Pro 4.8.5* (Biomatters, Nueva Zelanda) para obtener secuencias de alta calidad.

Tabla 3-4. *Primers* utilizados para la amplificación de los genes *housekeeping* seleccionados para el análisis MLSA-MLST (Jacques *et al.*, 2012).

Primers	Blanco	Tamaño del producto	Secuencia 5'-3'
<i>atpD-F</i>	<i>atpD</i>	697 pb	CGGTCTACAACGCCCTCAAGA
<i>atpD-R</i>			TGCGTGAAGCGGAAGATGTTG
<i>dnaK-F</i>	<i>dnaK</i>	704 pb	GCTCGTGCAGTAGGAATCG
<i>dnaK-R</i>			CTTGGCGATCTGTCGTTCCGAGAC
<i>gyrB-F</i>	<i>gyrB</i>	909 pb	GGGGTTCGGCAGCTCCGTCGTGAAC
<i>gyrB-R</i>			TGGCAGTCCTTGAGCTTGCCAG
<i>Ppk-F</i>	<i>ppk</i>	604 pb	GAGAACCTCATCCAGGCCCT
<i>Ppk-R</i>			CGAGCTTGCAAGTGGGTCTTGAG
<i>recA-F</i>	<i>recA</i>	724 pb	GACCGCGCTCGCACAGATCGACCG
<i>recA-R</i>			GCCATCTTGTCTTGACGACCTTG

Para comparar la diversidad genética de las cepas de Uruguay con cepas de Cmm de otros orígenes, se incluyeron en el análisis las correspondientes secuencias parciales de los genes *housekeeping* previamente mencionados de 89 cepas de *C. michiganensis* de la colección mundial CFBP (*French Collection for Plant-associated Bacteria*) (Jacques *et al.*, 2012). Dentro de las mismas se incluyeron: 69 cepas de la subsp. *michiganensis*, 3 de la subsp. *insidiosus*, 3 de la subsp. *sepedonicus*, 3 de la subsp. *tessellarius*, 4 de la subsp. *nebraskensis*, 6 cepas *Clavibacter*-like y una especie relacionada *Rathayibacter iranicus*. Para cada cepa, las secuencias parciales de los diferentes genes fueron concatenadas siguiendo el orden alfabético de los genes utilizando el programa *Geneious Pro 4.8.5* (Biomatters, Nueva Zelanda). Los análisis filogenéticos fueron realizados tanto sobre los genes individuales como sobre el conjunto de genes concatenados. Para ello, se utilizaron los algoritmos

Neighbor-Joining y *Maximum Likelihood* en el programa MEGA 6.0 (Tamura, 2011) y PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010). La topología de los árboles obtenidos fue evaluada mediante el análisis de *bootstrap* (Hillis y Bull, 1993) basado en 1000 repeticiones. Para calcular los parámetros de polimorfismo en las secuencias se utilizó el programa DnaSP v5 (Rozas *et al.*, 2003).

Por último, se seleccionó el subconjunto de todas las cepas correspondientes a la subespecie *michiganensis* (54 de Uruguay y 69 de la colección CFBP) para realizar la tipificación de las distintas cepas presentes. Para ello, cada secuencia única encontrada para cada gen fue asignada de forma arbitraria con un número de alelo mediante el software *Geneious Pro 4.8.5* (Biomatters, Nueva Zelanda). De esta manera, queda conformado el secuenciotipo (ST) de cada cepa (combinación de números de alelo de cada gen). Posteriormente, la relación evolutiva entre los STs se analizó utilizando el programa *eBURST* (Feil *et al.*, 2004). Este programa permite predecir complejos clonales dentro de una población de bacterias y el genotipo fundador de estos grupos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 CONFORMACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE AISLADOS DE CMM

El relevamiento realizado entre los años 2011-2014 en ambas zonas de producción de tomate del país y el aporte de cepas de años anteriores por parte de otras instituciones, permitió generar la primera colección local de cepas de Cmm causantes de cancro bacteriano de tomate en Uruguay (Tabla 3-1). Se cuenta en total con 54 aislados provenientes de los departamentos de Artigas, Salto, San José, Canelones y de la zona rural de Montevideo. En la Figura 3-2 se observan algunas de las muestras a partir de las cuales se realizaron los aislamientos, las colonias típicas de Cmm en medio NBY (amarillas, convexas y brillantes) y su observación microscópica como bacilos gram positivos.

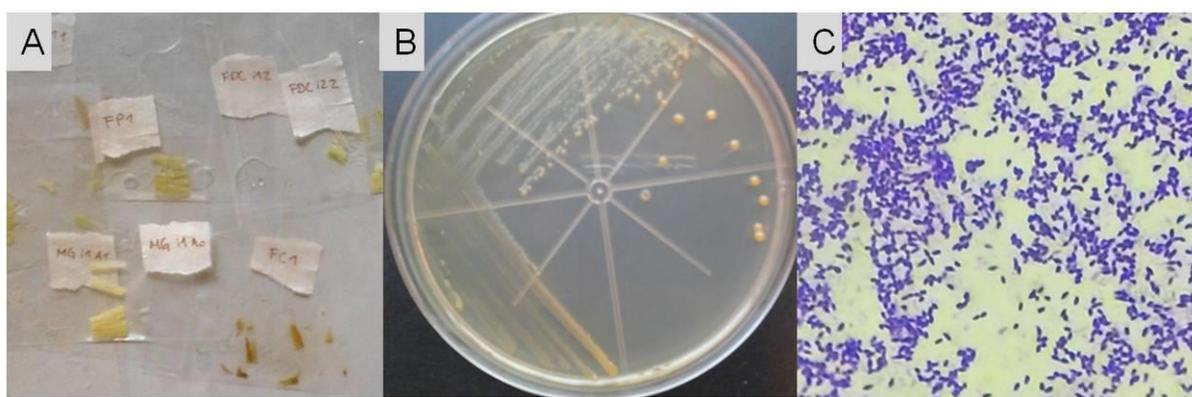


Figura 3-2 A. Trozos de tallos de plantas de tomate con síntomas a partir de los cuales se realizaron los aislamientos. B. Colonias típicas de Cmm en medio NBY. C. Observación microscópica con tinción Gram (100x).

Todos los aislados fueron patogénicos en tomate mostrando los síntomas típicos de cancro a partir del día 14 después de la inoculación. Todas las plantas se marchitaron completamente a los 21 días (Figura 3-3, A) observándose síntomas típicos de cancro bacteriano como el marchitamiento unilateral (Figura 3-3, B).

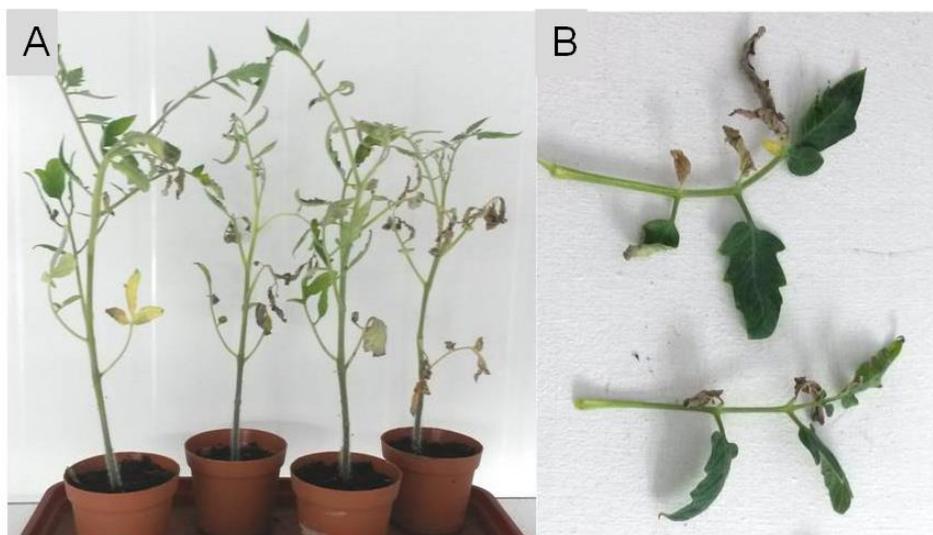


Figura 3-3 Test de patogenicidad en plantas de tomate. A. Plantas mostrando síntomas de marchitamiento a los 14 ddi y B. marchitamiento unilateral de las hojas.

3.3.2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE CMM DE URUGUAY

La identificación preliminar realizada a partir de la comparación de las secuencias obtenidas del gen de ARNr 16S en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mostró 99-100% de identidad de todos los aislados con la cepa de Cmm de referencia NCPPB 382 (número de acceso: AM711867). Además, todos generaron el producto del tamaño esperado (270 pb) a partir de la amplificación con *primers* específicos para Cmm dirigidos a la región intergénica ITS.

Adicionalmente, se confirmó la presencia de genes importantes para la patogenicidad de Cmm en todos los aislados obtenidos. Algunos de estos genes se encuentran codificados en la isla de patogenicidad de Cmm ubicada en el cromosoma (*chpC*, *tomA*, *ppaA*) y otros en los plásmidos pCM1 y pCM2 (*pat1* y *celA*). A modo de ejemplo, en la Figura 3-4 se muestra la imagen de un gel con los productos de amplificación *celA* y *chpC* de algunos aislados.

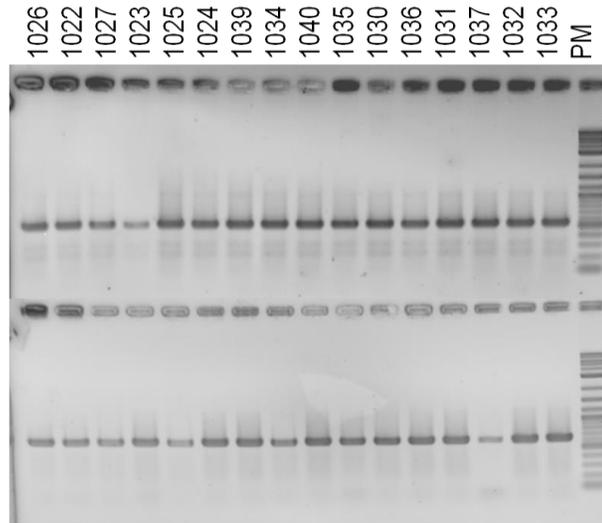


Figura 3-4 Gel de agarosa al 1% con los productos de amplificación de *celA* (arriba, 580 pb) y *chpC* (abajo, 638 pb). Arriba de cada carril se indica el número MAI del aislado al que corresponden los productos de PCR. PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder, Eurogentec*)

Por último, para completar la identificación y caracterización de cepas de Cmm, se evaluaron diferentes sistemas de qPCR reportados en bibliografía. En una primera instancia se utilizó el sistema *TaqMan* reportado por Luo *et al.* (2008), el cual fue utilizado previamente con una cepa de Cmm aislada en Uruguay durante el desarrollo de mi tesis de grado (Croce, 2012). Sorprendentemente, al evaluar este sistema con un mayor número de cepas se observaron diferencias en la forma de las curvas de amplificación obtenidas. Al menos 13 aislados de Cmm presentaron curvas atípicas, sugiriendo una baja eficiencia de amplificación para estos (Figura 3-5, A). Para evaluar si esto se debía a una baja especificidad del sistema *TaqMan* utilizado, se secuenciaron los productos de amplificación y una vez obtenidas las secuencias consenso, se alinearon junto con la sonda CMM (Luo *et al.*, 2008) (Figura 3-5, B). Para todos los aislados que presentaron curvas atípicas, se observó una diferencia de 1 base (T en lugar de C) respecto a la secuencia de la sonda CMM. Este hallazgo explica la menor eficiencia en la hibridación de la sonda CMM, lo que se traduce en una menor emisión de fluorescencia durante la amplificación de estos aislados. A modo de ejemplo, en la Figura 3-5 se muestran los resultados para tres aislados de Cmm de cada tipo.

Por el contrario, los dos sistemas de *primers* y sonda recomendados en el protocolo de la ISF, *Ptssk* y *MVS21* (Anexo II), dieron resultados positivos para todos los aislados uruguayos mostrando curvas típicas con buena eficiencia de amplificación. Esto demuestra una muy buena especificidad de estas

sondas y su utilidad como métodos de identificación de Cmm. En el Capítulo 4 nos centraremos en el estudio de estos sistemas como herramientas para la detección de Cmm.

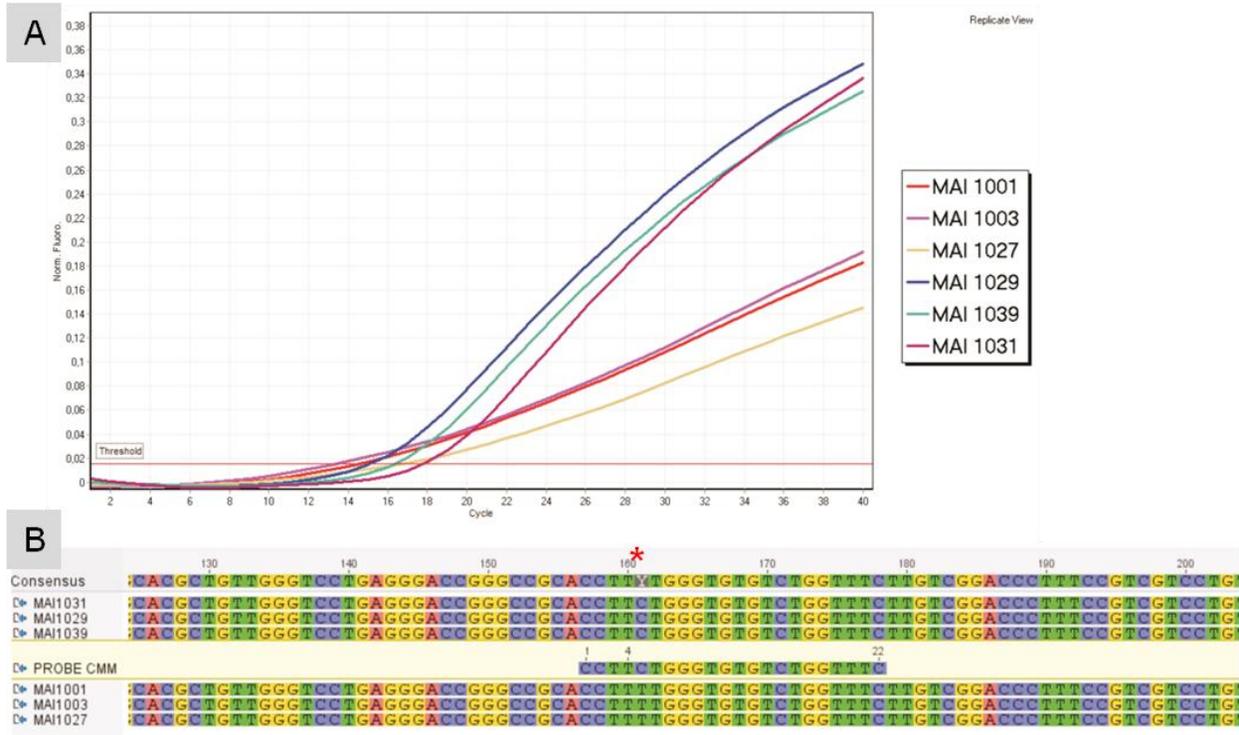


Figura 3-5 Resultados de la amplificación por qPCR de 6 aislados de Cmm con el sistema de Luo *et al.* (2008). A) Gráfica de fluorescencia vs. ciclos (*Replicate view*, resultado promedio de duplicados) mostrando las curvas típicas obtenidas para las cepas MAI1031, MAI1029 and MAI1039 y las curvas atípicas obtenidas para las cepas MAI 1001, MAI 1003 y MAI 1027. B) Alineamiento realizado a partir de las secuencias de los productos de amplificación de los 6 aislados y la sonda utilizada para la reacción. El asterisco indica el *miss-match* de la sonda con las secuencias de las cepas que muestran curvas atípicas en (A). (Croce *et al.*, 2016)

3.3.3 MULTI-LOCUS SEQUENCE ANALYSIS AND TYPING

Se evaluó la diversidad genética de Cmm mediante la técnica MLSA-MLST, utilizando el esquema reportado por Jacques *et al.* (2012). En este análisis se incluyeron los 54 aislados de Uruguay y 89 secuencias parciales de aislados de *C. michiganensis* de diversos orígenes, a los efectos de evaluar la diversidad genética a diferentes niveles taxonómicos. En la Figura 3-6 se presenta el árbol filogenético resultante de la concatenación de las secuencias parciales de los 5 genes (*atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *ppk* y *recA*) analizados para cada aislado. A partir de este análisis se pueden diferenciar claramente, con altos valores de *bootstrap*, las 5 subespecies de *Clavibacter michiganensis* y un grupo de cepas denominadas

Clavibacter-like. Dentro de este grupo, se incluyen cepas aisladas de semilla de tomate que presentan morfología similar a Cmm en los medios de cultivo semiselectivos (CMM1T y SCM, Anexo II) y dan un resultado positivo con algunos sistemas de *primers* específicos para Cmm, pero no presentan genes de patogenicidad ni son capaces de inducir síntomas en tomate (Jacques *et al.*, 2012). Todos los aislados de Uruguay fueron agrupados dentro del *cluster* de la subespecie *michiganensis* junto con cepas de Cmm de diversos orígenes, corroborando así su identificación.

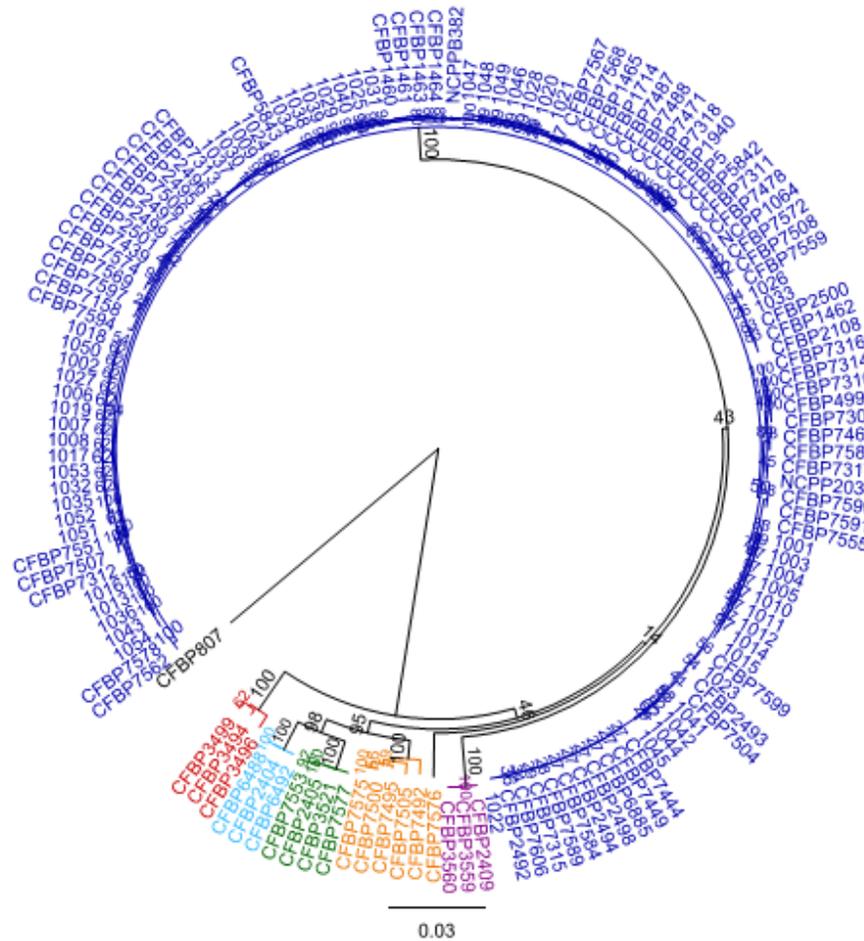


Figura 3-6. Árbol filogenético (*Neighbor-Joining*) basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes *atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *ppk* y *recA* de 143 aislados de Cmm. Los aislados de Uruguay (54) se indican con su número MAI. En cada nodo, se muestran los valores de *bootstrap*. Los colores distintos indican diferentes subespecies de *Clavibacter michiganensis*: *michiganensis* (azul), *sepedonicus* (violeta), *nebraskensis* (verde), *insidious* (turquesa), *tessellarius* (rojo) y el grupo *Clavibacter-like* (anaranjado).

Los árboles filogenéticos individuales construidos para cada uno de los genes analizados se presentan como material suplementario en el artículo publicado (ver Anexo I). Además, mediante el test de

Shimodaira-Hasegawa se demostró que los árboles son congruentes con el árbol basado en el conjunto de datos concatenados, lo que valida su uso para el análisis global de los resultados obtenidos (Croce *et al.*, 2016).

Posteriormente, se seleccionó una sub-muestra de 123 aislados pertenecientes a la subespecie *michiganensis*, con el objetivo de analizar más en profundidad la estructura poblacional de dicha subespecie. Se realizaron nuevos alineamientos y se construyeron los árboles filogenéticos correspondientes utilizando una cepa de *C. michiganensis* subsp *sepedonicus* como grupo externo (Figura 3-7). En la Tabla 3-5 se resumen los resultados obtenidos de los parámetros de polimorfismo en las secuencias utilizando el programa DnaSP v5 (Rozas *et al.*, 2003).

Tabla 3-5. Parámetros de diversidad para las secuencias parciales de los 5 genes analizados y para el total de secuencias concatenadas entre los aislados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Parámetros de diversidad							
Locus	N° de sitios	%GC	S	% S	Hap	Hd	π
<i>atpD</i>	561	67,9	9	1,6	10	0,8	0,00441
<i>dnaK</i>	576	69,2	7	1,2	9	0,7	0,00239
<i>gyrB</i>	735	66	8	1,1	8	0,7	0,00125
<i>ppk</i>	543	68,9	26	4,8	12	0,8	0,01215
<i>recA</i>	573	70	7	1,2	9	0,6	0,00207
concat.	2988	68,3	58	1,9	38	0,959	0,00420

S, Número de sitios polimórficos; Hap, Número de Haplotipos; Hd, Diversidad de Haplotipos; π , Diversidad nucleotídica; %S, Porcentaje de sitios polimórficos; concat: secuencias concatenadas

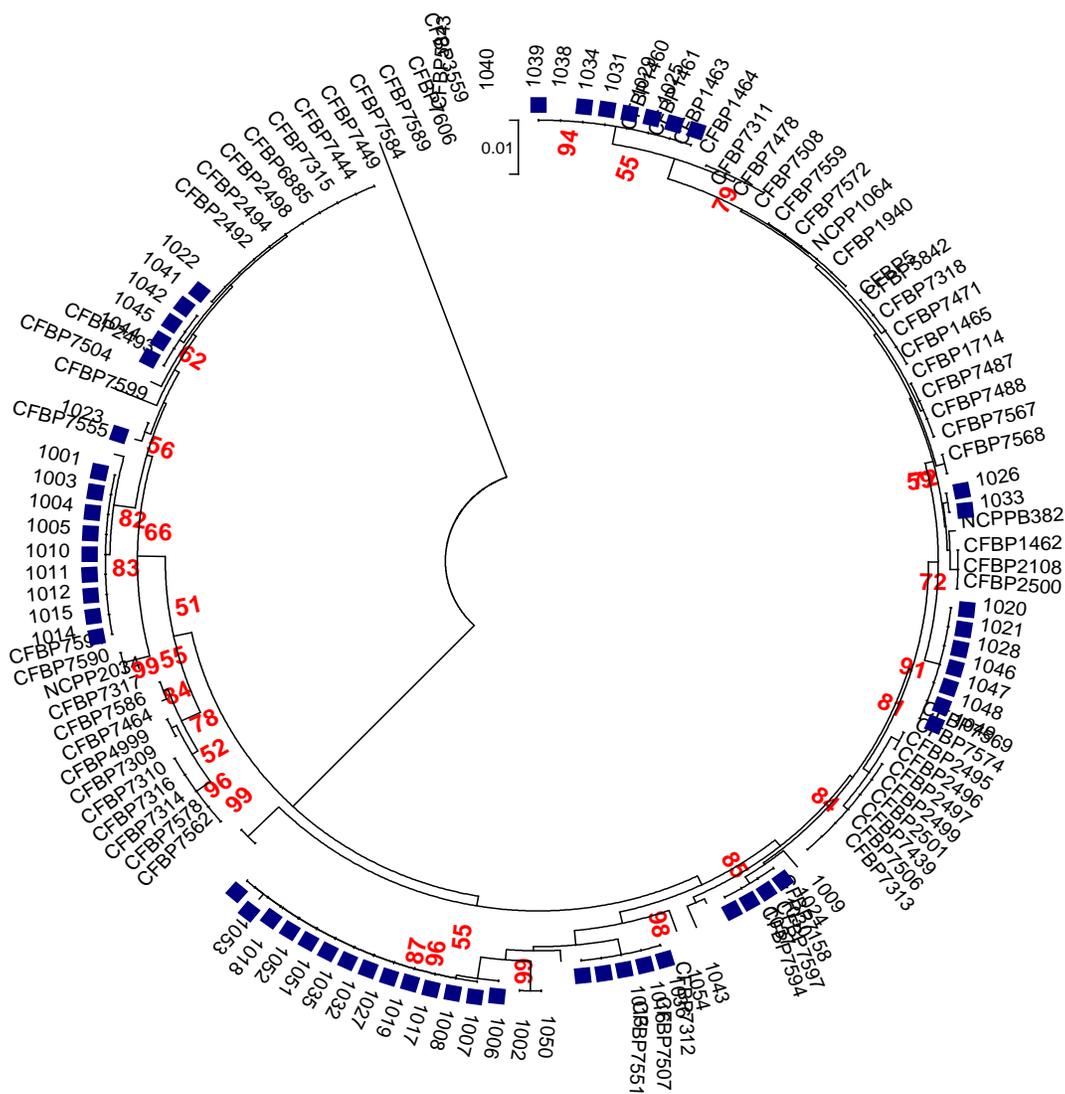


Figura 3-7. Árbol filogenético (*Neighbour Joining*) basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes *atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *ppk* y *recA* de 123 aislados de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este estudio. Los aislados de Uruguay están identificados por su número MAI y resaltadas con el ícono azul. En cada nodo, se muestran en rojo los valores de *bootstrap* (sólo los mayores al 50%). Se utilizó la cepa CFBP3559, correspondiente a *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* como grupo saliente para enraizar el árbol.

La diversidad genética total encontrada fue de 1,9% (58 sitios polimórficos en un total de 2988 sitios totales). El porcentaje de sitios polimórficos varió entre 1-2% para los genes *atpD*, *dnaK*, *gyrB* y *recA*, mientras que el gen *ppk* fue el que tuvo mayor porcentaje de sitios variables (4,8%, 26 sitios variables en un total de 543). A modo ilustrativo, en la Figura 3-8 se muestra parte del alineamiento de secuencias

correspondientes al gen *ppk*, donde se pueden observar algunos sitios polimórficos entre los aislados de Uruguay. Como se observa en la Tabla 3-5, se encontraron entre 8 y 12 secuencias únicas distintas para cada gen (haplotipos), y un total de 38 haplotipos distintos tomando en cuenta las variables aportadas por los 5 genes. Los test realizados indicaron en todos los casos que no hay desviaciones significativas de la neutralidad.



Figura 3-8 Imagen tomada del *software* Geneious que muestra como ejemplo el alineamiento de las secuencias del gen *ppk* para varios aislados uruguayos. Se pueden observar algunos sitios polimórficos (sin fondo de color).

La tipificación mediante MLST se realizó con la sub-muestra de los 123 aislados de la subespecie *michiganensis*. El aspecto fundamental del MLST es la asignación de números de alelo a cada secuencia única encontrada para cada gen. La Tabla 3-6 se construyó asignándole un número de alelo (arbitrario) a cada secuencia única encontrada en cada uno de los *loci*. A partir de los números asignados a cada *locus*, se deduce el secuenciotipo (ST) de cada aislado. Por ejemplo, los aislados MAI 1020, MAI 1021, MAI 1028, MAI 1046, MAI 1047, MAI 1048 y MAI 1049 fueron asignados al ST 1 y la asignación de alelos a cada gen (en orden alfabético) fue 20-1-7-19-4.

Tabla 3-6. Agrupación de los aislados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* según su secuenciotipo (ST).

Aislado	Origen	Año	ST	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>ppk</i>
MAI 1020	Uruguay (Montevideo)	2012	1	20	1	7	19	4
MAI 1021	Uruguay (Montevideo)	2014	1	20	1	7	19	4
MAI 1028	Uruguay (Salto)	2011	1	20	1	7	19	4
MAI 1046	Uruguay (Montevideo)	2014	1	20	1	7	19	4
MAI 1047	Uruguay (Montevideo)	2014	1	20	1	7	19	4
MAI 1048	Uruguay (Montevideo)	2014	1	20	1	7	19	4
MAI 1049	Uruguay (Montevideo)	2014	1	20	1	7	19	4
CFBP 5843	Brasil	1994	2	3	21	2	2	3
MAI 1025	Uruguay (Montevideo)	2005	2	3	21	2	2	3
MAI 1029	Uruguay (Salto)	2011	2	3	21	2	2	3
MAI 1031	Uruguay (Montevideo)	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1034	Uruguay (Montevideo)	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1038	Uruguay (Montevideo)	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1039	Uruguay (Montevideo)	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1040	Uruguay (Montevideo)	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1001	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1003	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1004	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1005	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1010	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1011	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1012	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1014	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1015	Uruguay (Salto)	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1013	Uruguay (Salto)	2012	4	3	2	1	2	6
MAI 1016	Uruguay (Salto)	2012	4	3	2	1	2	6
MAI 1036	Uruguay (Montevideo)	2010	4	3	2	1	2	6
MAI 1043	Uruguay (Canelones)	2014	4	3	2	1	2	6
MAI 1054	Uruguay (Canelones)	2014	4	3	2	1	2	6
MAI 1002	Uruguay (Salto)	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1006	Uruguay (Salto)	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1007	Uruguay (Salto)	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1008	Uruguay (Salto)	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1017	Uruguay (San José)	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1019	Uruguay (Montevideo)	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1027	Uruguay (Canelones)	2008	5	19	2	1	21	6
MAI 1032	Uruguay (Montevideo)	2010	5	19	2	1	21	6
MAI 1035	Uruguay (Montevideo)	2010	5	19	2	1	21	6
MAI 1051	Uruguay (Salto)	2014	5	19	2	1	21	6
MAI 1052	Uruguay (Salto)	2014	5	19	2	1	21	6
MAI 1053	Uruguay (Canelones)	2014	5	19	2	1	21	6
MAI 1009	Uruguay (Salto)	2012	6	1	1	2	2	3

Tabla 3-6 Continuación

Aislado	Origen	Año	ST	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>ppk</i>
MAI 1024	Uruguay (Artigas)	1997	6	1	1	2	2	3
MAI 1030	Uruguay (Montevideo)	2010	6	1	1	2	2	3
MAI 1037	Uruguay (Montevideo)	2010	6	1	1	2	2	3
CFBP 2492	Argelia	1985	7	2	2	1	2	1
CFBP 2494	Argelia	1984	7	2	2	1	2	1
CFBP 2498	Argelia	1984	7	2	2	1	2	1
CFBP 6885	Francia	2004	7	2	2	1	2	1
CFBP 7315	Estados Unidos	1998	7	2	2	1	2	1
CFBP 7444	-	1998	7	2	2	1	2	1
CFBP 7449	Francia	1998	7	2	2	1	2	1
CFBP 7584	Holanda	2008	7	2	2	1	2	1
CFBP 7589	Bélgica	1984	7	2	2	1	2	1
CFBP 7606	Holanda	1998	7	2	2	1	2	1
MAI 1022	Uruguay (Artigas)	1997	7	2	2	1	2	1
MAI 1023	Uruguay (Artigas)	1997	8	1	2	21	2	1
MAI 1026	Uruguay (Canelones)	1999	9	1	2	7	19	3
MAI 1033	Uruguay (Montevideo)	2010	9	1	2	7	19	3
MAI 1018	Uruguay (San José)	2012	10	19	2	1	20	6
MAI 1041	Uruguay (Canelones)	2014	11	7	22	1	2	1
MAI 1042	Uruguay (Canelones)	2014	11	7	22	1	2	1
MAI 1044	Uruguay (Canelones)	2014	11	7	22	1	2	1
MAI 1045	Uruguay (Montevideo)	2014	11	7	22	1	2	1
MAI 1050	Uruguay (Montevideo)	2014	12	19	2	1	21	24
CFBP 1460	Francia	1974	13	3	6	7	2	3
CFBP 1461	Francia	1974	13	3	6	7	2	3
CFBP 1463	Francia	1975	13	3	6	7	2	3
CFBP 1464	Francia	1975	13	3	6	7	2	3
CFBP 1462	Francia	1975	14	1	2	7	2	23
CFBP 2108	Francia	1981	14	1	2	7	2	23
CFBP 2500	Argelia	1984	14	1	2	7	2	23
CFBP 1465	Francia	1975	15	1	2	7	2	4
CFBP 1714	Francia	1975	15	1	2	7	2	4
CFBP 7487	Francia	2008	15	1	2	7	2	4
CFBP 7488	Francia	2008	15	1	2	7	2	4
CFBP 1940	España	1978	16	1	6	7	19	4
CFBP 5	Francia	1956	16	1	6	7	19	4
CFBP 5842	Brasil	1993	16	1	6	7	19	4
CFBP 7318	-	2001	16	1	6	7	19	4
CFBP 7471	Francia	1997	16	1	6	7	19	4
CFBP 2493	Argelia	1985	17	18	2	20	2	1
CFBP 2495	Argelia	1985	18	1	1	1	1	3
CFBP 2496	Argelia	1978	18	1	1	1	1	3
CFBP 2497	Argelia	1978	18	1	1	1	1	3

Tabla 3-6 Continuación

Aislado	Origen	Año	ST	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>ppk</i>
CFBP 2499	Argelia	1984	18	1	1	1	1	3
CFBP 2501	Argelia	1984	18	1	1	1	1	3
CFBP 7439	-	1992	18	1	1	1	1	3
CFBP 7506	-	2009	18	1	1	1	1	3
CFBP 4999	Argelia	1984	19	4	1	18	2	21
CFBP 7309	Estados Unidos	1998	19	4	1	18	2	21
CFBP 7310	Estados Unidos	1998	19	4	1	18	2	21
CFBP 7314	Estados Unidos	2002	19	4	1	18	2	21
CFBP 7316	Estados Unidos	1998	19	4	1	18	2	21
CFBP 7158	Nueva Zelanda	1968	20	3	1	4	5	4
CFBP 7311	Marruecos	1989	21	1	6	7	2	4
CFBP 7478	Suiza	2007	21	1	6	7	2	4
CFBP 7508	Francia	2009	21	1	6	7	2	4
CFBP 7559	-	-	21	1	6	7	2	4
CFBP 7572	-	2002	21	1	6	7	2	4
NCPPB 1064	Italia	1961	21	1	6	7	2	4
CFBP 7312	China	1998	22	1	20	1	1	6
CFBP 7313	Estados Unidos	2002	23	17	20	2	4	3
CFBP 7317	Francia	2001	24	4	2	1	2	9
CFBP 7464	Marruecos	-	25	8	1	1	19	9
CFBP 7586	Bélgica	1998	25	8	1	1	19	9
CFBP 7504	Francia	2009	26	2	2	1	2	16
CFBP 7507	Francia	2010	27	5	16	2	6	6
CFBP 7551	Suiza	2007	28	5	1	2	6	6
CFBP 7555	Eslovenia	2001	29	4	1	1	2	1
CFBP 7562	Portugal	1998	30	1	7	2	9	10
CFBP 7578	-	-	30	1	7	2	9	10
CFBP 7567	-	-	31	1	2	7	1	4
CFBP 7568	Estados Unidos	2000	31	1	2	7	1	4
CFBP 7569	-	-	32	1	8	2	1	3
CFBP 7574	-	-	32	1	8	2	1	3
CFBP 7590	Taiwan	1988	33	1	1	2	1	1
CFBP 7591	Taiwan	1988	33	1	1	2	1	1
CFBP 7594	Bélgica	2008	34	3	3	3	3	2
CFBP 7597	Bélgica	2008	35	4	1	1	4	3
CFBP 7599	Francia	2007	36	1	2	1	2	5
NCPPB 2034	Sudáfrica	1992	37	8	2	1	2	9
NCPPB 382	-	1956	38	1	2	4	2	3

-, origen desconocido

3.3.4 DIVERSIDAD ENTRE AISLADOS DE CMM DE DIVERSOS ORÍGENES

Los 123 aislados de Cmm analizados se asignaron a 38 haplotipos o secuenciotipos (STs) diferentes, algunos de ellos abarcando aislados de diversos orígenes (por ejemplo, el ST 7) y otros abarcando aislados de un único origen (Tabla 3-6). El análisis de los aislados de Uruguay permitió incorporar 10 nuevos STs no identificados en el trabajo previo realizado por Jacques *et al.* (2012). Se identificaron sólo 2 secuenciotipos (ST 2 y ST 7) donde los aislados de Uruguay se agrupan con aislados de otros países. El caso más destacable, es el del aislado MAI 1022 (Artigas, 1997) que comparte el ST 7 junto con otros de diversas partes del mundo (Argelia, Bélgica, Estados Unidos, Francia y Holanda). Este resultado refleja la transmisión de Cmm través de semilla y su rol en la diseminación de este patógeno a nivel global. El otro caso es el de un grupo de aislados uruguayos (MAI: 1025, 1029, 1031, 1034, 1038, 1039 y 1040) que comparten el ST 2 junto con una cepa de Brasil. Esto sugiere la posible diseminación del patógeno entre los 2 países vecinos o el uso de semilla contaminada del mismo origen.

Otra forma de representar la relación entre los 123 aislados de Cmm de todo el mundo es mediante la aproximación eBURST (Figura 3-9). De esta manera, los datos obtenidos mediante MLST (Tabla 3-6) se dividen en grupos relacionados y complejos clonales (CC), pudiéndose predecir el genotipo (secuenciotipo) fundador de cada complejo clonal. En la Figura 3-9, cada punto representa un ST y la líneas turquesas y violetas representan las relaciones entre ellos. Las líneas violetas relacionan cepas variables en un solo locus y forman los denominados complejos clonales, mientras que las líneas turquesas relacionan cepas variables en dos *loci*. Los STs que no tienen relación alguna con otros ST se denominan *singletons*, que en este caso son los STs 20, 30, 34 y 23. En este análisis, se identificaron 4 CCs, que agruparon 60 de los 123 aislados de Cmm analizados (49%). Un resultado muy destacable de este análisis es que en algunos CCs (Figura 3-9, A y B), se encuentran agrupadas cepas aisladas en diferentes países y aún en distintos continentes, y en un largo período de tiempo. Además, gracias a la incorporación de los aislados uruguayos en el análisis en este trabajo se identificaron dos nuevos complejos clonales no identificados en el trabajo previo de Jacques *et al.* (2012). El CC "D" pertenece enteramente a cepas de Uruguay, mientras que en el CC "A" se relacionan cepas de variados orígenes, siendo el ST 3 (conformado por cepas de Salto) el genotipo fundador.

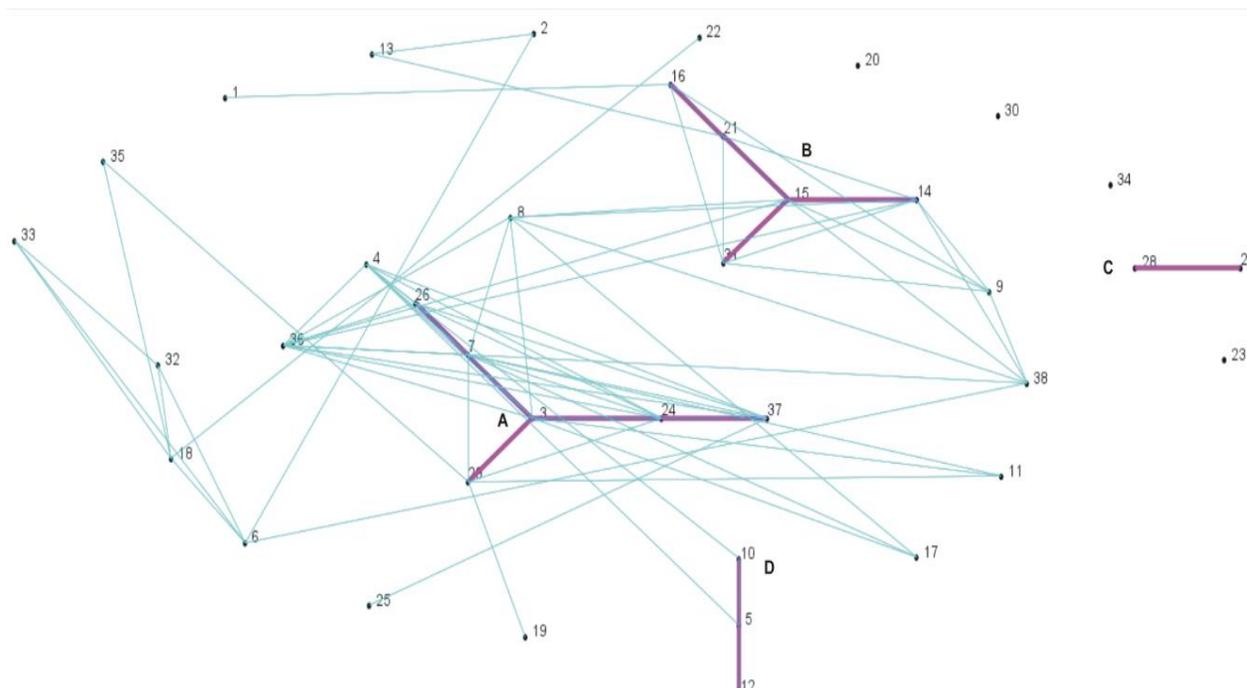


Figura 3-9. Diagrama de e-BURST conformado a partir de 38 secuenciotipos de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* identificados mediante el análisis MLSA-MLST sobre 123 aislados de Cmm. Cada punto representa un secuenciotipo (ST) y la relación entre ellos está dada por líneas violetas formando complejos clonales (CCs) (variaciones en un locus) y líneas turquesas (variaciones en 2 loci). Los cuatro CCs están identificados con las letras A, B, C y D.

3.3.5 DIVERSIDAD ENTRE CEPAS DE CMM PRESENTES EN URUGUAY

Con el objetivo de evaluar más en detalle la diversidad genética presente en nuestro país se analizaron por separado los 54 aislados de Cmm de Uruguay. Los resultados del MLST resolvieron a los 54 aislados de Uruguay en 12 STs, mostrando una alta diversidad de cepas de Cmm que afectan al cultivo de tomate en Uruguay (Tabla 3-6, Figura 3-10).

En la Figura 3-10 se muestra un gráfico de diversidad indicando los departamentos de origen de los aislados de cada ST identificado. En la Figura 3-11 se muestra el árbol filogenético resultante de la concatenación de los 5 genes, donde los aislados marcados con colores distintos pertenecen a los distintos departamentos. Se agregó la cepa de referencia de Cmm NCPPB382 y la cepa CFBP3559 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) como grupo externo para enraizar el árbol (Figura 3-11).

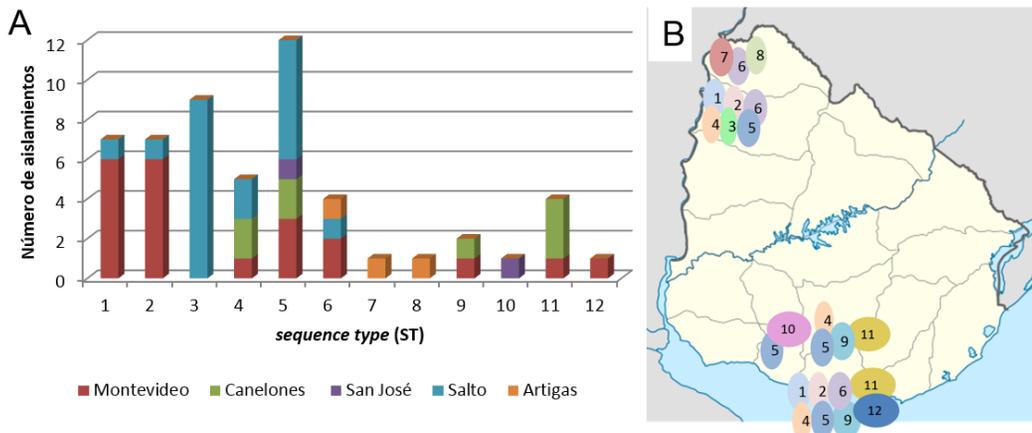


Figura 3-10. Gráfico (A) y mapa (B) de la distribución geográfica de los secuenciotipos (STs) de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identificados en Uruguay.

Los resultados obtenidos indican que los secuenciotipos identificados no presentan relación con el origen geográfico ni temporal de los aislados. Se obtuvieron aislados provenientes del mismo lugar y mismo año que presentan distintos perfiles alélicos e incluso se encuentran formando parte de distintos complejos clonales (Figuras 3-9 y 3-10). Este es el caso de los obtenidos en Salto (2012), los cuales fueron asignados a 6 STs diferentes (ST 1 a 6). El ST 3 corresponde exclusivamente a aislados obtenidos en distintas quintas de Salto durante la zafra 2012, sugiriendo un origen común de infección entre las mismas. Por otra parte, algunos STs no están restringidos a una región particular, sino que están presentes en todo el país. Por ejemplo, los aislados identificados con el ST 5 provienen de los departamentos de Salto, San José, Canelones y Montevideo.

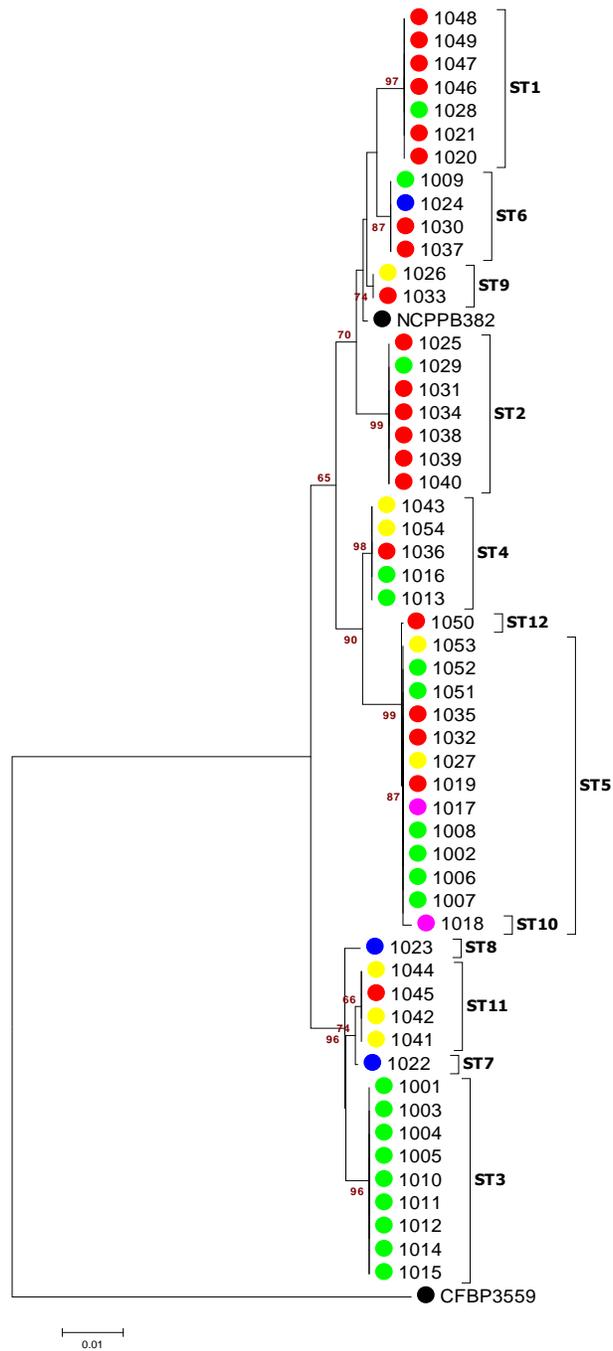


Figura 3-11. Árbol filogenético (*Neighbor-Joining*) basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes (*atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *ppk* y *recA*) representando todas las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas en Uruguay. En cada nodo se muestran los valores de *bootstrap* (solo los superiores al 50%), y en cada *cluster* se indica con cuál ST fue identificado (Tabla 3-6). Los aislados provenientes de distintos departamentos están marcados con distinto color: Salto (verde), Artigas (azul), Montevideo (rojo), Canelones (amarillo) y San José (fucsia).

3.4 DISCUSIÓN

A pesar de que el cancro bacteriano ha sido un problema en nuestro país desde la década de 1980 existen limitados antecedentes de investigación sobre esta problemática. Los principales trabajos realizados estuvieron enfocados a estudiar aspectos sobre sobrevivencia del patógeno y evaluación de prácticas culturales y productos químicos que contribuyan al control integrado de la enfermedad. Entre estos trabajos se incluyen estudios sobre la sobrevivencia del patógeno en suelos, restos vegetales y elementos de entutorado así como la evaluación de distintas metodologías para la desinfección de semillas y erradicación del patógeno una vez establecido en el cultivo (Maeso y Walasek, 2012; Maeso *et al.*, 2015a; Maeso *et al.*, 2015b).

El trabajo desarrollado en esta tesis constituye el primer relevamiento, caracterización y análisis de la diversidad de cepas de Cmm presentes en el país. Se generó y caracterizó una colección local de cepas de Cmm que afectaron los cultivos de tomate en Uruguay durante las zafas del 2011 al 2014 y se amplió con aislados obtenidos en años anteriores. Se evaluaron e implementaron diferentes métodos moleculares disponibles para la identificación de Cmm, procurando abarcar los últimos protocolos validados y recomendados por organismos internacionales de control fitosanitario (Oepp/Eppo, 2013; ISF, 2015). Los principales contenidos de este capítulo fueron publicados en la revista *European Journal of Plant Pathology* en enero de 2016 (Croce *et al.*, 2016).

La identificación de los organismos patógenos constituye una etapa clave en el diagnóstico de enfermedades, y es fundamental contar con técnicas confiables para evitar la detección de falsos-positivos. En particular, los sistemas basados en qPCR, *Ptssk* (Berendsen *et al.*, 2011) y *MVS21* (ISF, 2015) demostraron ser herramientas confiables para la identificación de cepas de Cmm. Sin embargo, el sistema *Spm4F/2R* (Luo *et al.*, 2008) no resultó adecuado para este fin. En varias cepas de Cmm analizadas se detectó la variación de un nucleótido en la secuencia abarcada por la sonda fluorescente CMM. Esta pequeña variación resultó suficiente como para influir drásticamente en la eficiencia de hibridación de la sonda y consecuentemente disminuir la emisión de fluorescencia durante la amplificación. Estos resultados destacan la importancia de evaluar rigurosamente la especificidad de los sistemas de identificación reportados en bibliografía, a los efectos de seleccionar los mejores métodos moleculares para ser utilizados como herramientas para el control fitosanitario y diagnóstico de

enfermedades. En el Capítulo 4 de la presente tesis se profundiza en la utilización de estas herramientas para el desarrollo de métodos de detección de Cmm en semillas y plantas asintomáticas, principales fuentes de inóculo y diseminación de este patógeno.

En este trabajo también se verificó la presencia de genes específicos de patogenicidad en todos los aislados identificados como Cmm. Los genes analizados tienen diferentes efectos en la virulencia de este patógeno (Gartemann *et al.*, 2008). Por un lado, se determinó la presencia de dos factores genéticos de virulencia codificados a nivel de los plásmidos pCM1 y pCM2 (*celA* y *pat-1*). Se ha reportado que la expresión de estos genes es esencial para la inducción de síntomas de marchitamiento (Chalupowicz *et al.*, 2010). También se determinó la presencia de genes que integran una isla de patogenicidad presente a nivel del cromosoma de Cmm (*ppaA*, *chpC* y *tomA*), los cuales son esenciales para la colonización y multiplicación del patógeno dentro de su hospedero (Chalupowicz *et al.*, 2010). Además, la patogenicidad de todos los aislados de Cmm fue verificada mediante ensayos de inoculación en plantas de tomate, demostrando su capacidad de inducir los síntomas típicos de cancro bacteriano.

En este capítulo, nos enfocamos a estudiar la diversidad genética de los aislados de Cmm presentes en Uruguay y su relación con cepas previamente caracterizadas provenientes de diversos orígenes. Esta información puede ser utilizada para inferir el origen de los brotes de cancro bacteriano en Uruguay y realizar estudios epidemiológicos sobre la diseminación de este patógeno. En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la técnica MLSA-MLST es una potente herramienta molecular para determinar la variabilidad genética de Cmm, corroborando resultados obtenidos en estudios previos realizados sobre este patógeno (Jacques *et al.*, 2012). Esta técnica proporciona un “código de barras” que sirve para tipificar cualquier aislado a nivel de “cepa”, mediante lo que llamamos secuenciotipos (ST) (Nunney *et al.*, 2012). Además, tiene la gran ventaja de presentar una alta reproducibilidad entre laboratorios, debido a su particularidad de basarse en el análisis de secuencias nucleotídicas a través del uso de herramientas bioinformáticas. De esta manera, las relaciones filogenéticas de gran cantidad de aislados pueden ser comparadas por varios laboratorios de manera rápida y reproducible. Además, las plataformas informáticas con bases de datos de MLST de varios patógenos, facilitan el intercambio de información (Almeida *et al.*, 2010). Otros métodos de *fingerprinting* requieren extremos cuidados durante la manipulación y son muy dependientes de las condiciones experimentales, lo que hace que sean menos reproducibles entre laboratorios (Milijašević-Marčić *et al.*, 2012).

El análisis de secuencias de genes de mantenimiento celular (*housekeeping*) ha sido adoptado para estudios filogenéticos ya que los mismos evolucionan de manera neutral. Estos genes, están bajo selección estable y están presentes en todas las cepas de cualquier género o especie en cuestión (Quesada-Ocampo *et al.*, 2012). Los genes de patogenicidad también han sido utilizados en algunos esquemas de MLSA-MLST; por ejemplo, en el caso de Cmm, Tancos *et al.* (2015) incluyen los genes de patogenicidad *celA*, *tomA* y *nagA* en su esquema, además de otros cinco genes *housekeeping*. Estos genes en general están aún más conservados que los genes de mantenimiento celular, por lo tanto no son los más adecuados para tipificación. Al estar más conservados presentan muy pocos sitios polimórficos entre aislados (o ninguno) por lo que no sirven como indicadores de filogenia (Tancos *et al.*, 2015). Además, los genes de patogenicidad pueden perderse fácilmente en algunos casos (por ejemplo, si se pierden los plásmidos) y si no están presentes en todas las cepas no son adecuados para su uso en estudios de filogenia. El trabajo previo de Jacques *et al.* (2012) sugiere que para identificar las subespecies de *C. michiganensis*, es suficiente con analizar la filogenia de los genes *gyrB* y *recA*. Sin embargo, el presente trabajo está enfocado en conocer la diversidad existente dentro de la subespecie *michiganensis*. Por tanto, cuanto más polimórfico sea cada gen, más informativo es para nuestro propósito. En base a esto, en este trabajo, se eligieron 5 genes *housekeeping*, siendo el *ppk* el gen que presentó mayor cantidad de polimorfismos en su secuencia con un 4,8% de sitios variables (Tabla 3-5).

A partir del esquema de MLSA-MLST utilizado, los 123 aislados de Cmm se agruparon en 38 secuenciotipos (Tablas 3-5 y 3-6). Aquí, podemos introducir el concepto de “cepa”, en este caso dado por cada secuenciotipo identificado. Bajo este concepto, podemos destacar que los 54 aislados de Uruguay fueron identificados como 12 cepas distintas, indicando que la diversidad encontrada en el país fue alta. Además, la mayoría de los aislados uruguayos fueron identificados como cepas “nuevas” ya que sus correspondientes haplotipos no habían sido previamente identificados en el trabajo de Jacques *et al.* (2012). Esto puede deberse a que en la muestra de cepas de otros países evaluada no están representados dichos STs, o que dicha diversificación ocurrió luego de la introducción del patógeno en Uruguay.

En los últimos años, estudios de diversidad genética de cepas de Cmm basados en métodos de *fingerprinting* han aportado información útil acerca de cómo se introdujo el inóculo a un país o región y su consecuente diseminación. Estos análisis han mostrado diversos resultados dependiendo de la cantidad de aislados analizados y de la técnica de tipificación utilizada (Tabla 3-1). Por ejemplo, en un

estudio realizado en las Islas Canarias donde hubo una gran epidemia de cancro bacteriano en la temporada 2002, en una colección de 54 aislados de Cmm utilizando las técnicas RAPD, BOX-PCR y AFLP, se identificó un único *cluster* o genotipo sugiriendo que Cmm fue introducida a las islas desde un único origen (De León *et al.*, 2009). La re-aparición de brotes en el mismo lugar sugiere que a pesar de los esfuerzos realizados para la erradicación del patógeno, las medidas de control adoptadas siguen siendo insuficientes. Generalmente, Cmm es introducido a una región (o país) a través de la semilla, pero la aparición de Cmm en años consecutivos puede provenir de inóculo que se mantiene vivo en restos vegetales año tras año. Este escenario se ha observado en Islas Canarias, Japón, Israel, Serbia y Bélgica (Kawaguchi *et al.*, 2010; Kleitman *et al.*, 2008; De León *et al.*, 2009; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012; Zaluga *et al.*, 2013). En contraposición a esto, en un estudio realizado en Japón, se identificaron 22 grupos distintos a partir de 43 aislados mediante las técnicas ISSR-PCR y rep-PCR (Kawaguchi y Tanina, 2014). En ese caso se encontró una alta diversidad genética entre los aislados de Cmm, al igual que lo reportado en nuestro país (Croce *et al.*, 2016). Finalmente, otro esquema de MLSA llevado a cabo en Nueva York, dividió 51 aislados en 21 secuenciotipos, utilizando 5 genes *housekeeping* (*kdpA*, *sdhA*, *dnaA*, *ligA* y *gyrB*) y 3 genes de patogenicidad (*celA*, *tomA* y *nagA*) (Tancos *et al.*, 2015). Estos resultados, también indican múltiples orígenes de infección para el desarrollo de la enfermedad en esos sitios geográficos.

Otra ventaja que presenta el método MLSA-MLST es su naturaleza aditiva, es decir que nuevos aislados pueden ser fácilmente agrupados dentro de los secuenciotipos ya identificados, o identificarse nuevos secuenciotipos en sucesivos estudios de diversidad de un mismo microorganismo. Por ejemplo, en esta tesis se incluyeron aislados de Cmm obtenidos en 2014, algunos de los cuales fueron asignados a secuenciotipos previamente identificados en la primera etapa de esta tesis (Croce *et al.*, 2016). Además, los aislados que se obtengan a partir de futuros relevamientos de este patógeno en nuestro país, podrán ser identificados y agrupados en los distintos secuenciotipos ya existentes o pasar a conformar nuevos grupos. Esta información resulta de interés para los propios productores y comerciantes de semilla, ya que las pérdidas económicas ocasionadas por causa de esta enfermedad aumentan en cada temporada (Ing. Agr. Federico Boschi, com. pers.). El hecho de conocer si la cepa que está causando problemas en determinado invernáculo es la misma que la de la temporada anterior o no, puede ayudar a establecer cuál fue el origen de ese brote. Dependiendo de los resultados, los productores pueden tomar las medidas de control adecuadas. Por ejemplo, si la cepa se repite año a año, podría deberse a que no se

tomaron las medidas de desinfección apropiadas; y en caso contrario, el origen de infección podrían ser las semillas utilizadas en la plantación durante ese año.

Las semillas contaminadas son la fuente primaria de inóculo en la mayoría de los brotes de cancro bacteriano en el mundo (De León *et al.*, 2011). En Uruguay, cada año se introducen varias variedades de tomate provenientes de diversos países como consecuencia de la importación de semillas. Durante el período de 2010 a 2012 la mayoría de los lotes provinieron de Tailandia, Perú, Italia, China, Argentina, Dinamarca, Estados Unidos, Japón y Holanda (Ing. Agr. Federico Boschi, com. pers.). En este trabajo, se observó una alta diversidad genética de Cmm en los aislados obtenidos, por tanto, resulta evidente la introducción del patógeno a nuestro país a través de semillas contaminadas. Probablemente, el patógeno fue transmitido a través de estos lotes de semillas y multiplicado en viveros, generando plántulas infectadas asintomáticas que diseminaron la enfermedad a los diferentes sitios de producción. La otra posible fuente de inóculo, es la existencia de cepas dominantes que sobreviven en restos vegetales y son recuperadas año tras año en el mismo cultivo. Este hecho fue reportado en Israel, donde dos genotipos fueron reiteradamente aislados durante varios años en la región de Besor (Kleitman *et al.*, 2008). Sin embargo, en este trabajo no se encontraron resultados de este tipo en ninguno de los dos departamentos donde se obtuvieron aislados en años consecutivos (Montevideo y Salto). A pesar de que hay aislados de Montevideo pertenecientes al mismo secuenciotipo obtenidos en 2005 y 2010, la ubicación exacta (o la quinta) donde se obtuvieron los mismos es desconocida, por lo que no es posible extraer esta conclusión (Tabla 3-6). Sorprendentemente, en la localidad de Tropezón (Salto) de donde se cuenta con aislados obtenidos en los años 2011 y 2012 (MAI 1012, MAI 1013, MAI 1014, MAI 1015, MAI 1028 y MAI 1029), no hubo aislados identificados con el mismo secuenciotipo. Este resultado, sugiere que cada año se introducen nuevas fuentes de inóculo al invernáculo.

Otro aspecto relevante a considerar es la distribución geográfica de los secuenciotipos en el país. La mayoría de los STs identificados fueron encontrados en ambas zonas de producción de tomate de Uruguay (Sur y Norte). En particular el ST 5 se encontró en todos los departamentos muestreados, excepto en Artigas. Como contrapartida, el ST 3 parece ser exclusivo de un determinado lugar (Salto). Un factor a tener en cuenta, es que las temperaturas en la región norte de nuestro país son más elevadas que las de la región sur, por lo tanto, los ciclos de cultivo varían en ambas regiones. En la región sur (Montevideo, Canelones y San José) el tomate es un cultivo de estación, por lo que se cultiva desde el comienzo del verano hasta el comienzo del otoño. En el norte (Salto principalmente), se produce el

cultivo a contra-estación para su venta durante el invierno y la primavera, por lo que mayoritariamente son cultivos protegidos bajo cubierta (invernáculos). Quedaría por definir, si alguno de estos secuenciotipos está mejor adaptado a una región particular debido a su mejor adaptación a las altas temperaturas y otras condiciones climáticas, sistema de cultivo, etc.

Los árboles filogenéticos no son eficientes para representar eventos evolutivos recientes, ya que los mismos intentan construir las relaciones filogenéticas en ausencia de un modelo realístico de diversificación para formar complejos clonales (Feil *et al.*, 2004). Por esta razón, este estudio se complementó con la aproximación *eBURST* que permite representar complejos clonales y predecir cuál es el genotipo fundador de cada uno. En este trabajo, se encontraron algunas diferencias con respecto al diagrama presentado en el estudio previo reportado para Cmm (Jacques *et al.*, 2012). En primer lugar, el descubrimiento del ST 3 a partir de aislados provenientes de Salto, permitió la identificación del complejo clonal "A", siendo justamente el ST 3 el genotipo ancestral del mismo. Por otra parte, se identificó por primera vez el complejo clonal "D", integrado únicamente por cepas uruguayas. La existencia de complejos clonales formados por cepas (STs) aisladas de diferentes regiones geográficas y períodos de tiempo, demuestran la eficacia de la transmisión del patógeno por semilla (Jacques *et al.*, 2012).

En suma, en este trabajo se confirmó el gran potencial de la técnica MLSA-MLST como herramienta para la tipificación y evaluación de diversidad genética entre aislados de Cmm. Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión de la diversidad presente en este patógeno a nivel mundial, así como a dilucidar el origen de los brotes y la distribución de cepas de Cmm en nuestro país.

CAPÍTULO 4. DETECCIÓN DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* EN SEMILLAS Y PLANTAS DE TOMATE

4.1 INTRODUCCIÓN

Las semillas de tomate infectadas con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) constituyen la principal fuente de inóculo primario y son responsables de la aparición de brotes severos del cancro bacteriano. El uso de semillas de tomate libres de patógeno es una medida esencial en el control de este patógeno, ya que bajos niveles de infección son suficientes para iniciar una epidemia en condiciones favorables (Gleason *et al.*, 1993). Por ello, es necesario contar con métodos rápidos, confiables y de alta sensibilidad para el análisis de lotes de semillas.

Para el caso de Cmm existen métodos estándar para el análisis de semillas de tomate que son evaluados y validados por organismos internacionales como EPPO (*European Plant Protection Organization*) o ISF (*International Seed Federation*). Estos métodos son revisados y actualizados de forma periódica con el fin de incorporar los últimos avances en materia de detección de patógenos transmitidos por semillas (Oepp/Eppo, 2013; ISF,2015). La detección de Cmm puede realizarse mediante varias técnicas entre las que destacan: aislamiento en medios de cultivo generales o semi-selectivos, técnicas serológicas (inmuno-fluorescencia, ELISA), técnicas moleculares basadas en PCR, o combinaciones de las mismas. A continuación, se presenta una descripción de las principales metodologías disponibles para la identificación de Cmm.

4.1.1 AISLAMIENTO EN MEDIOS SEMI-SELECTIVOS

Los protocolos estándar recomendados por EPPO y por ISF, establecen que una vez obtenidos los extractos, los mismos deben ser sembrados en varios medios semi-selectivos. Generalmente el aislamiento a partir de muestras de semillas es una técnica barata, robusta y fácil de realizar; sin embargo, en el caso de Cmm es muy complicado debido a que es una bacteria de crecimiento lento y que frecuentemente es inhibida por otros microorganismos presentes en la semilla, incluso en medios semi-selectivos. Se han desarrollado diversos medios semi-selectivos para el aislamiento de Cmm, los

más utilizados y sus características se resumen en la Tabla 4-1 y Figura 4-1. Uno de los primeros medios semi-selectivos descritos para el aislamiento de Cmm fue el medio SCM (Fatmi y Schaad, 1988); reportando una sensibilidad de detección de hasta 1 semilla contaminada (con 50 ufc) en 10.000 semillas sanas (Fatmi y Schaad, 2002). Los laboratorios que realizan rutinariamente análisis de semillas no han observado tan alta sensibilidad; probablemente debido a los protocolos de extracción, variación en los niveles de contaminación, y/o la presencia variable de microorganismos saprófitos capaces de crecer en estos medios (De León *et al.*, 2011). En la actualidad los medios SCM, SCM-fast y CMM1T son los recomendados para el aislamiento de Cmm en semillas de tomate (Oepp/Eppo, 2013; ISF, 2015).

Tabla 4-1. Algunos medios semi-selectivos desarrollados para el aislamiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Medio ^a	Coloración y morfología de colonias ^b	Referencia
SCM	Color gris traslúcido y mucoides. Forma irregular	Fatmi y Schaad (1988)
mSCM	Color crema y mucoides	Waters y Bolkan (1992)
SCM fast	Color gris traslúcido, mucoides e irregulares. A veces con el centro gris más oscuro.	Koenraad <i>et al.</i> (2009)
CMM1T	Amarillas, mucoides y convexas, volviéndose más amarillas con el tiempo de incubación.	Koenraad <i>et al.</i> (2009)

^a La composición de los medios se detalla en Oepp/Eppo (2013)

^b Morfología de colonias a los 10 días de incubación

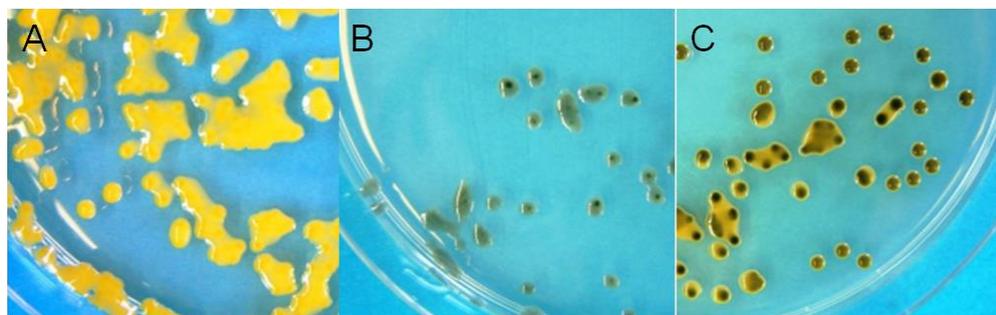


Figura 4-1. Morfología de las colonias de Cmm en medios semi-selectivos a los 10 días de incubación. A, medio CMM1T; B, medio SCM y C, medio SCM-fast. Fuente: ISF, 2015.

4.1.2 MÉTODOS SEROLÓGICOS

Actualmente se comercializan numerosos kits basados en el reconocimiento antígeno-anticuerpo para la detección y diagnóstico de diferentes especies bacterianas. Varias firmas comerciales como *Neogen*

Europe Ltd. (Reino Unido), *Agdia Inc.* (Estados Unidos), *Loewe Biochemica GmbH* (Alemania), *Plant Research international* (Holanda) o *Sediag* (Francia) disponen de kits con anticuerpos poli-clonales para la detección e identificación de Cmm. Sin embargo, los anticuerpos mono-clonales para Cmm presentan mejor especificidad siendo capaces de detectar hasta el 99% de las cepas de Cmm (Kaneshiro *et al.* 2006), mientras que con anticuerpos poli-clonales se han observado reacciones cruzadas con otros saprófitos e incluso con cepas *Clavibacter-like* (Jacques *et al.*, 2012). Lamentablemente, el número de kits comerciales que emplean anticuerpos mono-clonales es muy inferior al de aquellos que usan anticuerpos poli-clonales. Además, los anticuerpos mono-clonales para Cmm presentan gran especificidad, pero según Olivier *et al.* (2010) presentan baja sensibilidad por lo que su uso en protocolos de análisis de semillas no es recomendado.

Las técnicas inmunológicas que se describen a continuación para la detección e identificación de Cmm son: ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), inmunofluorescencia (IF), y separación inmunomagnética (IMS, *Immunomagnetic separation*).

4.1.2.1 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Las técnicas basadas en reacciones colorimétricas como los test ELISA son los métodos de inmunodiagnóstico mejor establecidos, con numerosos kits comercializados para la identificación de diversos fitopatógenos (Gleason *et al.*, 1993). Sin embargo, estas pruebas rápidas y sencillas de realizar poseen una baja sensibilidad (10^4 - 10^5 ufc/ml), por lo tanto su empleo sólo es adecuado para el análisis de muestras con altas concentraciones del patógeno como las obtenidas de plantas sintomáticas, o para confirmar la identidad de los aislados (L. De León *et al.*, 2008). La especificidad y el límite de detección de esta técnica dependen en gran medida del tipo de anticuerpo utilizado y de la calidad de los mismos. Además, esta técnica es incapaz de diferenciar entre células viables y no viables.

4.1.2.2 INMUNO-FLUORESCENCIA (IF)

La metodología para la detección de Cmm por IF se describe en detalle en Oepp/Eppo (2013). El procedimiento implica, el tratamiento de las muestras con un antisuero específico de Cmm más un antisuero conjugado marcado con un fluoróforo, y su posterior observación en un microscopio de epifluorescencia para la detección de células con la típica morfología de Cmm (Figura 4-2). En ocasiones células diferentes a las del patógeno también pueden emitir fluorescencia como resultado de una

reacción cruzada, por lo que esta técnica requiere de cierta familiarización con la morfología y la intensidad de la fluorescencia de las células diana. El límite de detección de esta técnica es de 10^3 ufc/ml en semillas contaminadas naturalmente. En análisis de rutina, las muestras que resulten positivas por IF son consideradas potencialmente positivas y son sometidas a posteriores análisis como aislamiento en medios semi-selectivos (Olivier *et al.*, 2010).

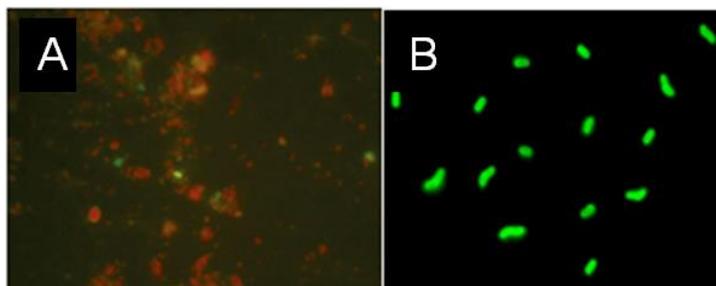


Figura 4-2. Detección de células de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) (en verde) mediante Inmuno-fluorescencia (IF). A, muestra de semillas de tomate positiva por IF (Fuente: Olivier *et al.* 2010); B, morfología de las células de Cmm por IF obtenidas de cultivo puro (Imagen cedida por L. De León).

Otra técnica basada en IF, es la inmuno-fluorescencia de colonias (*IFC- Inmuno-fluorescence colony staining*) la cual permite identificar colonias inmuno-teñidas, pero requiere de 3 a 5 días ya que es necesario el crecimiento de las mismas para su tinción. Así, esta técnica permite detectar bacterias vivas, aunque su uso requiere el empleo de grandes cantidades de anticuerpo lo que la hace inviable como método de diagnóstico rutinario. La sensibilidad reportada ha sido de hasta 10 ufc/ml, por lo que es 100 veces más sensible que la IF (Veena y van Vuurde, 2002).

4.1.2.3 SEPARACIÓN INMUNO-MAGNÉTICA (*INMUNO-MAGNETIC SEPARATION-IMS*)

Esta técnica se basa en el uso de esferas inmuno-magnéticas cubiertas con anticuerpos específicos para capturar las células diana. Existen diferentes firmas, como *life technologies* que ofrecen micro-esferas de diferente tamaño, composición y recubrimiento de anticuerpos específicos para numerosos microorganismos. Los anticuerpos específicos, pueden estar unidos a las micro-esferas de diversas formas: directamente (captura directa), indirectamente a través de anticuerpos secundarios que poseen afinidad por la región fija del anticuerpo específico formando un doble recubrimiento (captura indirecta), o mediante la formación inicial del complejo célula-anticuerpo y posterior captura por las

micro-esferas (Figura 4-3). El primer paso de esta técnica consiste en la captura selectiva (mediante anticuerpos específicos) de las células diana presentes en una muestra. De esta forma, la técnica permite la remoción de otros microorganismos, restos vegetales y compuestos inhibidores presentes en los extractos de semillas, así como la subsecuente concentración de las células bacterianas. Las micro-esferas con las células diana atrapadas en su superficie, se retienen aplicando un campo magnético, lo que permite eliminar de la muestra otros microorganismos (Figura 4-4). Además, la IMS ofrece la posibilidad de suspender las micro-esferas en un volumen menor al de partida, y concentrar así las células capturadas.

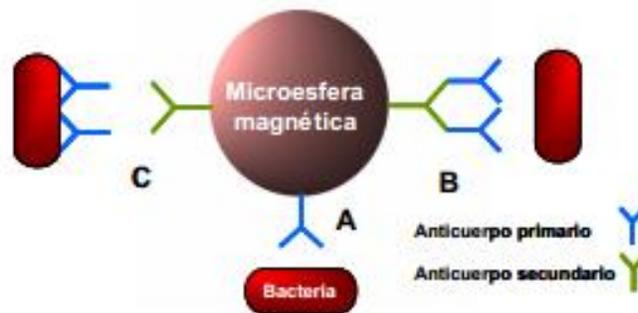


Figura 4-3. Diferentes modalidades de separación inmunomagnética. A: captura directa, con los anticuerpos específicos unidos directamente a las microesferas; B: captura indirecta, con los anticuerpos específicos unidos a las microesferas a través de un anticuerpo secundario; y C: unión de los anticuerpos específicos a las células diana y posterior unión del complejo a la microesfera. Imagen cedida por L. De León.

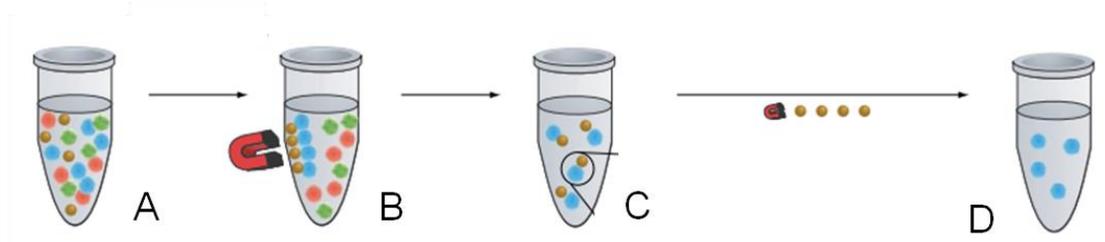


Figura 4-4. Esquema del procedimiento de separación inmuno-magnética. A: Muestra problema con las células diana, otros componentes y las micro-esferas ya unidas al anticuerpo específico. B: Durante una etapa de incubación, las células diana se unen a las micro-esferas que mediante la aplicación de un campo magnético permite su captura selectiva. C: Mediante lavados sucesivos se eliminan los otros componentes. D: Mediante la adición de un buffer de disociación y la subsecuente aplicación de un campo magnético, las micro-esferas son separadas de las células blanco. Fuente: www.invitrogen.com

Esta técnica puede ser combinada con el aislamiento (*IMS-plating*) o con métodos moleculares (*IMS-PCR*). Para la detección específica de Cmm, De León *et al.* (2008) desarrollaron un protocolo de *IMS-plating* obteniendo un nivel de sensibilidad de 10 ufc/ml en extractos de semillas infectados. La técnica consiste en sembrar la muestra obtenida en placas de medio no selectivo (YPGA) y detectar las colonias típicas de Cmm luego de 4 días de incubación. Por otra parte, la separación inmuno-magnética también puede ser combinada con PCR, aportando de esta manera un mayor nivel de especificidad a la técnica. Por ejemplo, la técnica IMS-PCR ha sido utilizada en la detección de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en semillas de sandía para mejorar la sensibilidad de la PCR convencional (Walcott y Gitaitis, 2000).

4.1.3 MÉTODOS MOLECULARES

4.1.3.1 MÉTODOS BASADOS EN PCR

En las últimas décadas, la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ha supuesto un avance considerable en el diagnóstico de enfermedades debido a su alta especificidad y sensibilidad. Sin embargo, su implementación como herramienta rutinaria para el análisis de material vegetal ha sido bastante lenta por parte de los laboratorios de diagnóstico. Esto se debe, en parte, a la necesidad de adquirir material, equipamiento y personal calificado para llevarlas a cabo (Alvarez, 2004). Es indudable que las técnicas basadas en PCR ofrecen numerosas ventajas como rapidez, sensibilidad, especificidad, fiabilidad y capacidad para procesar un gran número de muestras simultáneamente (Louws *et al.*, 1998).

Se han reportado varios métodos de detección basados en PCR aplicables a la detección de Cmm en semilla de tomate y trasplantes asintomáticos (Dreier *et al.*, 1995; Gitaitis *et al.*, 1991). En general, los *primers* diseñados están dirigidos a genes involucrados en la patogenicidad, presentes en la isla de patogenicidad o en los plásmidos circulares pCM1 y pCM2 (Kleitman *et al.*, 2008). Algunos trabajos indican que, por ejemplo, los pares de iniciadores CMM5-CMM6 (Dreier *et al.*, 1995) utilizados en versiones antiguas del protocolo de EPPO y dirigidos al gen *pat-1* no generan el producto de amplificación esperado con todas las cepas de Cmm (Hadas *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2008). En la actualidad, el sistema de *primers* de PCR convencional recomendado para la identificación de Cmm es PSA-8/PSA-R, una modificación de los *primers* PSA-4/PSA-R (Oepp/Eppo, 2013).

En la práctica, el límite de detección de Cmm por PCR es aproximadamente 10^3 ufc/ml (L. De León *et al.*, 2008). Las limitaciones propias de la PCR como, la pequeña cantidad de muestra (1-5 μ l) utilizada en cada reacción de amplificación o la presencia de inhibidores de la reacción, entre otros; limitan la sensibilidad de estos métodos. En este contexto, se han desarrollado diversas estrategias para superar estas desventajas y aumentar la sensibilidad de los métodos basados en PCR. Algunas de estas estrategias incluyen: dilución 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 (BIO-PCR). Aunque los protocolos existentes para la detección de Cmm establecen la metodología a seguir para la realización de los test de PCR (Oepp/Eppo, 2013; ISF, 2015), se recomienda que sean los propios laboratorios los que optimicen las condiciones de amplificación en cada caso, de acuerdo a las necesidades y capacidades disponibles.

BIO-PCR

Es una estrategia muy utilizada para multiplicar la bacteria y evitar el efecto de las sustancias inhibidoras presentes en las muestras vegetales (especialmente en semillas), 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). Por lo tanto, se trata de una combinación de métodos moleculares con el aislamiento del patógeno en medios semi-selectivos. 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 multiplicación 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).

Multiplex-PCR

La *multiplex*-PCR es una variante de la PCR que 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 la práctica, sería muy interesante para los laboratorios de análisis de semillas contar con protocolos optimizados basados en *multiplex* PCR para la detección simultánea de varios patógenos de semilla relevantes exigidos por los organismos de certificación. 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 ha sido ensayado con muestras de semillas. Quintero-Vásquez *et al.* (2013) desarrollaron un protocolo para detectar simultáneamente cuatro patógenos de tomate (*Cmm*, *Fusarium*, *Leveillula* y begomovirus) en plantas infectadas. Otro método de *multiplex* PCR fue optimizado por Zhang *et al.* (2009) para la amplificación simultánea de Cmm junto con el ADN de su hospedero *Solanum lycopersicum*.

4.1.3.2 PCR A TIEMPO REAL O PCR CUANTITATIVA (qPCR)

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. 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). La PCR en tiempo real se está convirtiendo en “*gold standard*” en el diagnóstico de fitopatógenos. Actualmente, debido a su gran especificidad y sensibilidad, la qPCR ha sido incorporada en los protocolos de diagnóstico de enfermedades de plantas, como *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* en tubérculos de papa (Schaad *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2000), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* en semillas de arroz (Liao *et al.*, 2003) y *Xylella fastidiosa* en uvas (Schaad *et al.*, 2002).

Existen varias estrategias utilizadas para la generación de fluorescencia en reacciones de qPCR. Las más conocidas son el uso de agentes intercalantes (*SYBR green I*) y las sondas de hidrólisis (*Taqman*[®]). Las sondas *Taqman*[®] consisten en un oligonucleótido de ADN marcado que hibrida con una región específica del amplicón, generado con *primers* específicos (Figura 4-5). 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 hidrólisis de la sonda, resulta en un aumento de la señal de fluorescencia durante cada evento de amplificación específica del ADN. Algunas ventajas de las sondas *Taqman*[®] frente al uso de agentes intercalantes no específicos como *SYBR Green I* son que la hibridación de la sonda al ADN molde le confiere una mayor especificidad a la reacción, y presenta la posibilidad de realizar reacciones de multiplex-PCR con sondas marcadas con diferentes fluoróforos (Valasek, 2005).

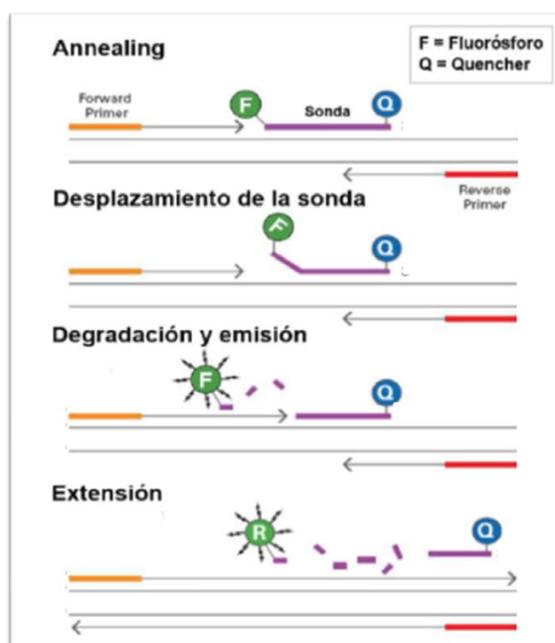


Figura 4-5. Esquema de la reacción de qPCR con sondas Taqman[®]. Fuente: (<http://www.eoligos.com/eoweb/products/eo-taqman.asp>)

Algunos autores ya han reportado la aplicación de esta tecnología para la detección de Cmm (Bach *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2012; Johnson and Walcott, 2012; Luo *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007), la mayoría de ellos basados en sondas *Taqman* (Tabla 4-2). El límite de detección reportado para la detección en cultivo puro fue de 10^3 ufc/ml (Luo *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007); sin embargo, estos autores no han optimizado su aplicación para la detección directa del patógeno en semilla o en plántulas asintomáticas. Sólo Zhao *et al.* (2007) reportaron una sensibilidad de detección de 10 semillas infectadas en 1.000 sanas, pero esta sensibilidad no es adecuada para análisis rutinarios de semillas. Luo *et al.* (2008) usaron

el colorante EMA (*DNA binding ethidium monoazide*) en combinación con qPCR 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. Por su parte, Johnson y Walcott (2012) desarrollaron un protocolo de *multiplex* qPCR para la detección simultánea de Cmm y el virus del mosaico del Pepino en semillas de tomate. En dicho trabajo, utilizan la estrategia de *magnetic capture hybridization* (MCH) que se basa en el uso de esferas magnéticas conjugadas a una sonda específica, capaz de unirse al ADN blanco. Esta estrategia la utilizan acoplada a PCR a tiempo real (MCH-qPCR) utilizando el sistema de *primers* diseñado por Bach *et al.* (2003) para la detección de Cmm (Johnson and Walcott, 2012). Otro de los sistemas reportados para la detección de Cmm por PCR a tiempo real es el desarrollado por Cho *et al.* (2012) el cual utiliza la tecnología de *SYBR-Green* en lugar de sondas *Taqman*. Los autores demostraron que este sistema es específico para la subespecie *michiganensis* ya que no amplifica a las otras subespecies de *C. michiganensis* ni a otras bacterias de referencia evaluadas como algunas del género *Xanthomonas* y *Pseudomonas* (Cho *et al.*, 2012). Actualmente, ninguno de los sistemas mencionados anteriormente fue incorporado a los protocolos de sanidad de semillas de tomate.

Recientemente, se han desarrollado dos nuevos sistemas de detección de Cmm basados en sondas *Taqman*: el sistema *Ptssk*, desarrollado por Berendsen *et al.* (2011) y el sistema *MVS21* publicado por primera vez en la versión de setiembre de 2015 del protocolo de ISF (ISF, 2015). El primero ha sido validado por GEVES (*Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences*) en Francia, con una colección de 139 cepas de Cmm y 66 no-Cmm, verificándose su especificidad, y encontrándose un 100% de correlación con los ensayos de patogenicidad (Jacques *et al.*, 2012). El segundo sistema es muy reciente y solo ha sido evaluado por los grupos de trabajo ISHI-Veg (*International Seed Health Initiative for Vegetables Crops*) antes de su publicación en el protocolo ISF (ISF, 2015).

Tabla 4-2. Resumen de los sistemas de qPCR diseñados para la detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Sistema de primers y sonda	Blanco de detección	Tamaño del producto	Referencia
FP RP Cmm probe	Región intergénica 16S-23S del ARNr	223 pb	Bach <i>et al.</i> (2003)
Cmm 141F Cmm 141R	Gen de la Ferredoxina Reductasa	141 pb	Cho <i>et al.</i> (2012)
Spm4F Spm2R Cmm probe	Región intergénica 16S-23S del ARNr	223 pb	Luo <i>et al.</i> (2008)
ITSYG-1 ITSYG-2 Cmm probe	Región intergénica 16S-23S del ARNr	270 pb	Zhao <i>et al.</i> (2007)
Ptssk_10 Ptssk_11 Ptssk_12	Putative Two-component System Sensor Kinase	132 pb	Berendsen <i>et al.</i> (2011)
MVS21_F MVS21_R MVS21_probe	(No hay información disponible)	83 pb	ISF (2015)

4.1.3.3 LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY (LAMP)

La amplificación isotérmica del ADN (LAMP) es una técnica relativamente nueva desarrollada por Notomi *et al.* (2000) que se realiza en condiciones isotérmicas, a 65°C. En la reacción LAMP se requiere de una ADN polimerasa particular, la ADN polimerasa *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*). A 65°C la doble hebra de ADN es inestable, permitiéndole a esta polimerasa invadir la doble hélice y desplazar las dos hebras a medida que polimeriza, sin necesidad de aumentar la temperatura para que ocurra la desnaturalización. Generalmente, se emplean 4 cebadores (FIP, BIP, F3 Y B3) capaces de reconocer 6 secuencias distintas del ADN diana, lo que proporciona alta especificidad a la técnica. La naturaleza isotérmica de esta técnica le aporta grandes ventajas como su rapidez, ya que la reacción se lleva a cabo en 20-30 minutos (no se requiere etapa de desnaturalización). Además, no requiere de un equipamiento de alto costo como sucede con la amplificación por PCR convencional. Por último, el resultado se puede observar a simple vista por turbidez, lo que lo hace adecuado para aplicaciones en campo mediante el uso de equipos especiales no instrumentales (Yasuhara-Bell *et al.*, 2013).

Actualmente, la tecnología LAMP está siendo aplicada para la detección de bacterias fitopatógenas como *Ralstonia solanacearum* (Kubota *et al.*, 2011), *Xylella fastidiosa* (Harper *et al.*, 2010) y *Erwinia amylovora* (Temple and Johnson, 2011). Recientemente ha sido utilizada para la detección de Cmm empleando 6 *primers* que dirigidos al gen *micA* (michiganina A) demostrando una gran especificidad de la técnica con todas las cepas testeadas (Yasuhara-Bell *et al.*, 2013).

4.1.4 BIOENSAYOS

Los bioensayos se basan en la inoculación de una variedad susceptible con un cultivo puro de la bacteria, para observar el desarrollo de síntomas provocados por el patógeno. En el caso de Cmm los métodos de inoculación pueden variar, aunque lo más común suele ser la inoculación en tallo de una suspensión bacteriana con previa provocación de herida sobre la superficie del pecíolo (*woodstick*). Los ensayos de patogenicidad son indispensables para confirmar la identidad de la mayoría de las bacterias fitopatógenas (Gleason *et al.*, 1993) y además son requeridos en los protocolos de diagnóstico para confirmar la patogenicidad de las cepas identificadas por otros métodos. Presentan la desventaja de que los síntomas suelen tardar hasta 21 días en aparecer, y además en países donde el patógeno es cuarentenario este tipo de ensayos requiere extremar las precauciones en los invernaderos donde se realizan. Recientemente, se ha propuesto la posibilidad de realizar los ensayos de patogenicidad *in vitro* donde se demostró que la infección con Cmm ocurre y la aparición de síntomas se puede observar a los 8 días después de la inoculación (Lelis *et al.*, 2014).

Existen muchos métodos disponibles para la identificación y diagnóstico de Cmm. Cada metodología presenta sus ventajas y limitaciones, por lo que se recomienda la combinación de varias estrategias y su adaptación de acuerdo a las necesidades y capacidades disponibles en cada lugar.

Los protocolos de evaluación fitosanitaria recomendados internacionalmente están dirigidos al aislamiento del patógeno en medio de cultivo semi-selectivo y posterior identificación de las colonias aisladas mediante PCR y test de patogenicidad. El aislamiento del patógeno es un requisito indispensable para dar un diagnóstico positivo de la enfermedad ya que asegura la presencia del patógeno viable en las semillas. Sin embargo, la microbiota asociada que habitualmente presentan las

muestras de semillas unido al lento crecimiento de Cmm puede dificultar el aislamiento de Cmm. Además, los medios utilizados no presentan una selectividad absoluta para Cmm, por lo que en este tipo de muestras el aislamiento del patógeno es complejo e insume mucho tiempo. Los resultados obtenidos por técnicas que no permiten este aislamiento deben ser considerados presuntivos (Oepp/Eppo, 2013).

En Uruguay, Cmm no figura como plaga cuarentenaria según las disposiciones establecidas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (DGSSAA-MGAP, 2010). Por lo tanto, actualmente no se realiza ningún control fitosanitario a las semillas de tomate que ingresan al país. La semilla de tomate que se utiliza en Uruguay es principalmente importada de diversos orígenes y es sometida únicamente a controles de germinación y pureza en INASE (Ing. Agr. Federico Boschi, com. pers). La posibilidad de aplicar sistemas de detección de Cmm eficientes a costos razonables contribuiría a mejorar la calidad de la semilla adquirida por los productores rurales, disminuyendo el impacto que tiene esta enfermedad para el sector productivo.

En base a esta situación, se propuso como uno de los objetivos de esta Tesis optimizar un protocolo de detección molecular de Cmm en muestras que contribuyen a la diseminación del patógeno (semillas y plántulas).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 CEPAS UTILIZADAS Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS

Se utilizó la cepa MAI 1001 (Salto, Uruguay, 2012) para llevar a cabo los experimentos de contaminación artificial de los extractos vegetales y la cepa 05-110.2 (Islas Canarias, España, 2005) para la infección artificial de las semillas de tomate. Además, también se utilizaron los aislados MAI 1004, 1013, 1030 y 1040 para la optimización de las condiciones de reacción de qPCR. Las cepas bacterianas se hicieron crecer en medio NBY, durante 72 horas a 28°C. Los inóculos de Cmm se prepararon a partir de colonias frescas en SF, se homogeneizó la suspensión y se ajustó su concentración por absorbancia a 595 nm hasta una DO de 0,15-0,17 (Espectrofotómetro UV-vis, *Jenway*) para obtener una concentración de 10^8 ufc/ml. La concentración de estas suspensiones se verificó mediante recuento en placa en medio NBY. En el caso de utilizar estas suspensiones como molde de reacción en qPCR, las mismas se sometieron a lisis celular (99°C durante 20 minutos), se centrifugó para eliminar los restos celulares y se utilizó el sobrenadante.

4.2.2 SEMILLAS Y PLANTAS UTILIZADAS

Las semillas utilizadas variaron según el experimento. En algunos casos se utilizaron semillas del cv. Repique (semillas de Uruguay) las cuales fueron aportadas por INIA Salto Grande (Ing. Agr. Matías González). También se utilizaron semillas de variedades protegidas provenientes de centros de producción en Tailandia y Chile, las cuales fueron aportadas por Semillas Fitó (Barcelona, España).

Para los ensayos de detección en planta se utilizaron las semillas producidas en Chile. Las mismas se pusieron a germinar en almácigueras de gran tamaño con sustrato para horticultura profesional (*Tref, Jiffy Products International, Holanda*) y se mantuvieron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas: temperatura de 25°C, fotoperíodo de 10 hs de luz y 14 hs en oscuridad, y humedad del 70-80%.

4.2.3 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos de semillas se prepararon según se indica en el protocolo de ISF (ISF, 2015; Anexo II). Se colocaron 2000 semillas (6,0 g aprox.) en una bolsa estéril y se agregaron 24 ml de *Seed Extraction*

Buffer (SEB), siguiendo la relación de 4 ml de SEB por g de semilla establecidos en el protocolo. En el caso de las plantas, se utilizó la relación de 5 ml de SEB por g de planta. El material vegetal se colocó en bolsas con filtro intermedio (*Bioreba*, Suiza) y se utilizó un triturador del tipo *Stomacher* (*Seward*, UK) para romper mediante acción mecánica el material vegetal. En ambos casos, los extractos se filtraron por centrifugación a baja velocidad (1000 rcf, 1 min) para retirar las partículas vegetales de mayor tamaño y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo para su análisis.

4.2.4 SISTEMAS DE QPCR PARA LA DETECCIÓN DE CMM

4.2.4.1 BLANCOS DE DETECCIÓN Y CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

En este trabajo, se utilizaron los dos sistemas de *primers* y sonda (*Ptssk* y *MVS21*) recomendados en el protocolo de ISF versión 4.3 y detallados en la Tabla 3-3. En primera instancia, se probaron estos sistemas en nuestras condiciones de laboratorio utilizando el equipo de qPCR de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química (*Rotor Gene 6000*, *Qiagen*). Se mantuvieron las condiciones indicadas en el protocolo ISF las cuales fueron: 5 min de incubación a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 30 s a 60°C. En la Tabla 4-3 se indican las condiciones de los reactivos utilizados para llevar a cabo las reacciones, cuyo volumen final se redujo a la mitad con respecto a lo establecido en el protocolo mencionado. En todas las reacciones se utilizaron como control positivo ADN genómico de Cmm (10 ng) y como blanco de reacción los reactivos de PCR sin ADN (*NTC*, *No Template Control*).

Tabla 4-3. Preparación de las mezclas de reacción de qPCR con los sistemas *Ptssk* y *MVS21*.

Sistemas utilizados		Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µl)
<i>Ptssk</i> ^a	<i>MVS21</i> ^a			
Máster mix		2x	1x	6,25
Agua miliQ		-	-	0,8
RZ_ <i>Ptssk</i> 10	<i>MVS21_F</i>	20 µM	0,24 µM	0,15
RZ_ <i>Ptssk</i> 11	<i>MVS21_R</i>	20 µM	0,24 µM	0,15
RZ_ <i>Ptssk</i> 12	<i>MVS21_probe</i>	20 µM	0,24 µM	0,15
Lisado bacteriano		-	-	5,0
Volumen total		-	-	12,5

^a las características de estos sistemas se detallan en la Tabla 3-3.

Para la optimización de la reacción de qPCR, se probaron dos kits comerciales: *Rotor-gene* y *Quanti-Tec* (ambos de *Qiagen*). Para llevar a cabo esta prueba se utilizaron las condiciones detalladas

anteriormente (Tabla 4-3) utilizando el sistema *Ptssk* (Berendsen *et al.*, 2011) y se utilizó como molde el lisado de una suspensión de Cmm previamente preparada (ver ítem 4.2.1) de los aislados MAI 1004, 1013, 1030 y 1040.

Además, en algunas de las reacciones también se incluyó un control interno de amplificación, mediante la adición de los *primers Wu* (Wu *et al.*, 2008) en la mezcla de reacción (*multiplex*-PCR). Este sistema fue diseñado específicamente para PCR a tiempo real e incluye dos sondas con especificidad para bacterias Gram positivas o negativas. El mismo fue incorporado como control interno de amplificación en las reacciones de qPCR de la versión 4.3 del protocolo ISF (ISF 2015; Anexo II) (Tabla 4-4).

Tabla 4-4. Características del sistema *Wu* utilizado como control interno de amplificación en qPCR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Modificaciones ^a	Tm ^b (°C)
Wu-F	CAACGCGAAGAACCTTACC	-	57,3
Wu-R	ACGTCATCCCCACCTTCC	-	58,4
Wu-p1	ACGACAACCATGCACCACCTG	5'HEX - 3'BHQ1	63,3
Wu-p2	ACGACAGCCATGCAGCACCT	5'HEX - 3'BHQ1	62,5

^a HEX: 6-carboxy-hexa-cloro-fluoresceína, BHQ1: *Black-Hole-Quencher-1*

^b Temperatura de *melting*

Esta amplificación se llevó a cabo en una reacción tipo *multiplex* en la que se programó el equipo de qPCR para que adquiriera fluorescencia en la etapa de extensión con 2 detectores: verde (470-510 nm) para el *reporter* FAM y amarillo (530-555 nm) para el *reporter* HEX. En la Tabla 4-5 se indican las nuevas condiciones de *multiplex*-qPCR utilizadas con los dos sistemas: *MVS21* y *Wu*.

Tabla 4-5. Preparación de la reacción de *multiplex*-qPCR con el sistema *MVS21* y el control interno de amplificación *Wu*.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µl)
Master mix	2x	1x	7,5
Agua miliQ	-	-	1,425
MVS21_F	10 µM	0,50 µM	0,75
MVS21_R	10 µM	0,50 µM	0,75
MVS21_probe	10 µM	0,25 µM	0,3
Wu_F	10 µM	0,20 µM	0,3
Wu_R	10 µM	0,20 µM	0,3
Wu_probe1	10 µM	0,20 µM	0,3
Wu_probe2	10 µM	0,20 µM	0,3
Lisado bacteriano	-	-	3,0
Volumen total	-	-	15

Estas condiciones fueron las utilizadas en algunos de los ensayos de este trabajo realizados durante una pasantía en el INIA (Madrid, España). El kit utilizado en este caso fue el *Sensi Fast LO-Rox (Bioline)*, y las reacciones se corrieron en el equipo *7500 Fast (Applied Biosystems)*. Las condiciones de ciclado fueron: 5 min de incubación a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 30 s a 60°C.

En este trabajo, cada vez que se usó el sistema de *MVS21* para la detección de Cmm en muestras vegetales con los datos indicados en la Tabla 4-5, se informan los resultados en los que la amplificación con el sistema *Wu* dio positiva.

4.2.4.2 ANÁLISIS DE DATOS POR QPCR

El análisis de los datos de qPCR se realizó mediante los *Softwares: Rotor-Gene 6000 Series* versión 1.7.75 y *7500 Fast System SDS*. Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. Este ciclo se denomina ciclo umbral (*Threshold cycle, C_t*) o punto de corte (*crossing point, C_p*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra (Costa, 2004). En este trabajo nos referimos al mismo como *C_q (Quantification cycle)* siguiendo las recomendaciones de la guía MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin *et al.*, 2009). Para obtener los valores de *C_q*, un umbral (*threshold*) adecuado fue fijado previamente, en el punto de inflexión de la curva de fluorescencia en función de los ciclos (escala lineal). Los programas informáticos utilizados incluyen un sistema automático de cálculo del valor umbral, aunque en este trabajo también se realizó un ajuste manual dentro de los parámetros recomendados en un rango de 0,02 a 0,15; teniendo en cuenta el ruido de fondo y los blancos de reacción. En la mayoría de las reacciones las muestras se analizaron por duplicado, y los resultados se expresan como el valor de *C_q* promedio \pm error estándar calculado con un intervalo de confianza del 95%. En el caso de las gráficas de fluorescencia en función de los ciclos, este promedio es representado bajo la forma de *Replicate View*. El límite de sensibilidad quedó definido como la dilución estándar de menor concentración que el equipo es capaz de detectar en todos los replicados. Se tomó como criterio que las muestras positivas son todas aquellas cuyos valores de *C_q* son menores a 35 ciclos.

En algunos casos, se realizaron las correspondientes curvas de calibración (*C_q* en función del logaritmo de la cantidad de ADN inicial), dando lugar a la ecuación $y = Mx + B$. Se determinó la linealidad de la

curva mediante regresión lineal y se utilizó la pendiente de la misma para determinar la eficiencia de la reacción según la ecuación (Dorak, 2006):

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Cuando trabajamos con diluciones seriadas en base diez, si la eficiencia es de 1 o 100%, la pendiente será -3,322 indicando que la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo. El rango dinámico se define como el rango en el que podemos realizar la cuantificación, es decir los valores comprendidos entre la dilución estándar de mayor concentración y la de menor concentración. También se calculó el coeficiente de correlación (r^2) que es una medida de la exactitud y precisión durante el pipeteo (Bustin *et al.*, 2009; Dorak, 2006).

4.2.4.3 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y EFICIENCIA DE LA REACCIÓN

Para evaluar la eficiencia de los sistemas *Ptssk* y *MVS21* y determinar su sensibilidad en nuestras condiciones, se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas al décimo de una muestra de ADN genómico de Cmm, en un rango de 20 ng a 0,2 pg de ADN por reacción. La cuantificación del ADN genómico de partida se realizó en un equipo *NanoDrop ND-100 (Nanodrop Technologies)*. Para este ensayo, se modificó el volumen final de la reacción reduciéndose el mismo a 10 μ l, ajustándose el volumen de los reactivos y utilizando 2 μ l de ADN por cada reacción. Además de determinar la sensibilidad de ambos sistemas, los mismos se compararon para evaluar diferencias en cuanto a la eficiencia de los mismos.

4.2.4.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ (SENSIBILIDAD EN EXTRACTOS DE SEMILLAS Y PLANTAS)

A partir de una suspensión de Cmm, se realizaron diluciones seriadas al décimo en SF, las cuales fueron utilizadas para inocular extractos de semilla (ES) y plantas (EP), y obtener concentraciones de 10^6 a 10^0 ufc/ml de cada extracto. Los extractos vegetales fueron preparados como se detalla en el ítem 4.2.3 y repartidos en tubos independientes para cada una de las concentraciones finales. Estos extractos conteniendo diferentes concentraciones de Cmm fueron analizados para evaluar si existe inhibición de la amplificación por algún componente del extracto utilizado para la detección por qPCR. En esta reacción se incluyeron como controles negativos ambos extractos sin inocular, además de un control positivo de ADN genómico y un blanco (NTC). La reacción de qPCR se llevó a cabo con el sistema *Ptssk* y con las condiciones de amplificación detalladas en la Tabla 4-3.

4.2.5 BIO-qPCR

La primera estrategia evaluada con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la detección de Cmm por qPCR, fue la denominada BIO-qPCR. Esta técnica implica una etapa de cultivo de la muestra en un medio sólido semi-selectivo para Cmm previo a la detección por qPCR. El protocolo general de BIO-qPCR implica la siembra por extensión de 100 µl de cada muestra en tres placas de medio semi-selectivo, las cuales se incuban en estufa a 28°C durante 72 horas (Figura 4-6). Posteriormente, se lavan dos de las tres placas de cada muestra con 1,5 ml de agua estéril cada una. Se rastrilla con ansa la superficie del agar para desprender las colonias en crecimiento (“*pin-point colonies*”) y el lavado de ambas placas se junta en un mismo tubo. Luego se realiza la lisis térmica durante 20 min a 99°C, y se centrifuga para eliminar los restos celulares, utilizando 3 o 5 µl del sobrenadante como molde de la reacción. La tercera placa de medio selectivo sembrado con cada muestra se deja incubando a 28°C para observar la presencia de colonias típicas de Cmm (6-10 días aproximadamente).

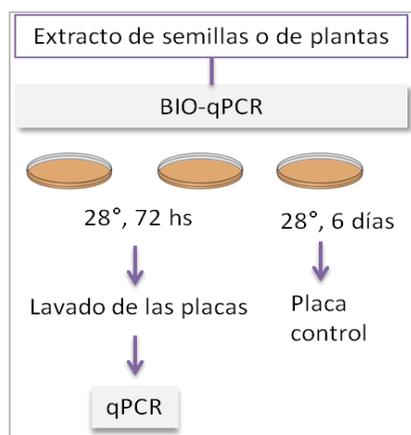


Figura 4-6. Esquema general de la BIO-qPCR llevada a cabo en este trabajo. Tres placas de medio semi-selectivo se siembran con el extracto y se incuban a 28°C para favorecer el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Luego se realiza la detección por qPCR y la visualización de las colonias en la placa control.

También se evaluó la concentración (10x) del extracto problema previo a la siembra en las placas de medio selectivo como estrategia para aumentar la sensibilidad de detección. De esta manera se aumenta 10 veces la concentración del patógeno en el extracto problema, lo que resulta interesante cuando la concentración del patógeno es baja. La concentración del extracto se realizó mediante

centrifugación a 10000 rcf durante 10 min, y la posterior re-suspensión del *pellet* en la décima parte del volumen inicial (10 ml).

4.2.5.1 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD SOBRE EXTRACTOS DE SEMILLA Y PLANTA POR BIO-qPCR

Se evaluó la sensibilidad de esta estrategia de BIO-qPCR mediante el análisis de extractos de semillas o plantas inoculados de manera artificial con diferentes concentraciones de Cmm. En este caso, los extractos conteniendo diferentes concentraciones de Cmm (de 10^6 a 10 ufc/ml) fueron analizados para evaluar la sensibilidad de la BIO-qPCR en el medio CMM1T. También se analizaron como controles negativos ambos extractos sin inocular, además del blanco y el control positivo de ADN. La reacción de qPCR se llevó a cabo con el sistema *Ptssk* con las condiciones detalladas en la Tabla 4-3.

4.2.5.2 ANÁLISIS DE LOTES DE SEMILLAS POR BIO-qPCR

En segunda instancia, la BIO-qPCR fue evaluada con material del que se tenían sospechas que pudiera estar infectado debido a su procedencia. Se analizaron 3 mini-lotes de 350 semillas de tomate (Lm-1, Lm-2 y Lm-3) provenientes de campos con antecedente de cancro bacteriano. El Lm-1 fue obtenido a partir de tomates infectados de una quinta de Salto, y los lotes Lm-2 y Lm-3 fueron aportadas por INASE (procedentes de quintas de la zona Sur). Se utilizó como control positivo un extracto de semillas inoculado con una suspensión de Cmm (10^5 ufc/ml) y como control negativo un extracto de semillas sano. Los extractos se obtuvieron como se detalla en el ítem 4.2.3. El experimento se llevó a cabo en el medio CMM1T, como se muestra en la Figura 4-6 y con las condiciones de qPCR indicadas en la Tabla 4-3 usando el sistema *Ptssk*.

4.2.6 EXTRACCIÓN DE ADN DE EXTRACTOS VEGETALES

Durante el desarrollo de este trabajo, y con el fin de mejorar la sensibilidad de la reacción de qPCR, se evaluó la detección de Cmm después de la extracción de ADN a partir de extractos vegetales procesados según el ítem 4.2.3. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante la utilización del *buffer TRIsure* (*Bioline*) a partir de 10 ml de extracto. Para comenzar la extracción, se centrifuga dicho extracto (7000 rcf, 5 min) para retener las células presentes, se descarta el sobrenadante y se comienza la extracción con el *pellet* obtenido. Según las indicaciones del fabricante y algunas modificaciones pertinentes, el protocolo de extracción de ADN es el siguiente:

1. **Homogeinización.** Agregar 1,2 ml de *TRIsure* y re-suspender el pellet con vórtex. Trasvasar a tubo *ependorf* de 2 ml y centrifugar a 10000 rcf por 5 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a un *ependorf* nuevo y descartar el *pellet*.
2. **Separación de fases.** Incubar las muestras por 5 min a temperatura ambiente. Agregar 250 µl de cloroformo y agitar vigorosamente con vórtex por 10-15 segundos. Incubar las muestras durante 3 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarlas a 12000 rcf durante 15 min a 4°C. Las muestras serán separadas en una fase inferior de color verde (fase orgánica), una interfase y una fase superior transparente (fase acuosa). Con ayuda de una pipeta e intentando no mezclar las diferentes fases, **retirar completamente** la fase acuosa (superior) que contiene el ARN, con cuidado de no retirar la interfase. Se continúa trabajando con la fase orgánica (inferior) y la interfase que contienen el ADN y las proteínas.
3. **Precipitación del ADN.** Agregar 350 µl de Etanol 100% (frío) y mezclar por inversión. Incubar las muestras por 3 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 rcf por 5 min a 4°C.
4. **Lavado del ADN.** Descartar el sobrenadante y lavar el pellet que contiene el ADN con 1ml de citrato de sodio 0.1M en 10% etanol y agitar suavemente por 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar las muestras a 12000 rcf por 5 min a 4°C. Repetir el paso de lavado con citrato de sodio al menos una vez más. Realizar un último lavado con 1,5 ml de etanol 75% (guardado a -20°C), invertir los tubos suavemente 5 ó 6 veces, dejar a temperatura ambiente 1 ó 2 minutos y luego centrifugar a 12 000 rcf por 5 min a 4°C.
5. **Re-suspensión del ADN.** Retirar el sobrenadante y dejar secar el pellet completamente. Re-suspender el pellet en 30 µl de agua *miliQ*.

4.2.7 SEPARACIÓN INMUNO-MAGNÉTICA (IMS)

Otra de las metodologías evaluadas fue la separación inmuno-magnética (*Inmuno Magnetic Separation*), con 2 variantes: *IMS-plating* e *IMS-qPCR*. En el primer caso, el método de separación es combinado con el aislamiento mediante la siembra en placa de medio *KingB (Conda-Pronadisa)*. En el segundo caso, se combina con la detección mediante qPCR utilizando el sistema *MVS21* con las condiciones detalladas en la Tabla 4-5.

En este trabajo, se utilizaron las *inmuno-magnetic beads* (IMBs) *Dynabeads M-280* (Dyna, Noruega) precubiertas con anticuerpo anti-conejo (Figura 4-7, A). Las mismas fueron cubiertas con un anticuerpo de conejo anti-Cmm Pab-PRI (*Plant Research International, B.V. Prime Diagnostics*, Holanda) para la captura específica de células de Cmm. Para ello, se siguió el protocolo previamente optimizado por De León *et al.* (2006) y siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar, las IMBs se lavan 3 veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) 10 mM pH 7,2. Para realizar los lavados las IMBs se colectan usando el imán MPC-s (Figura 4-7, B) y finalmente se re-suspenden en PBS a una concentración de 10^8 IMBs/ml. Luego de esto, se agregan 2,0 μ l del anticuerpo anti-Cmm Pab-PRI y se incuba en posición horizontal con agitación suave durante 16 horas a temperatura ambiente. Luego se realizan tres lavados sucesivos con PBS conteniendo 0,1% de sero-albúmina bovina (BSA) y 0,05% de *Tween20* para remover cualquier anticuerpo no adherido a las IMBs. Los lavados se realizan colocando los tubos en el imán MPC-s durante 2 minutos y quitando el sobrenadante (el último lavado se prolonga durante 30 min). Finalmente, las IMBs se re-suspenden en PBS para obtener una concentración de 10^8 IMBs/ml y se guardan a 4 °C.

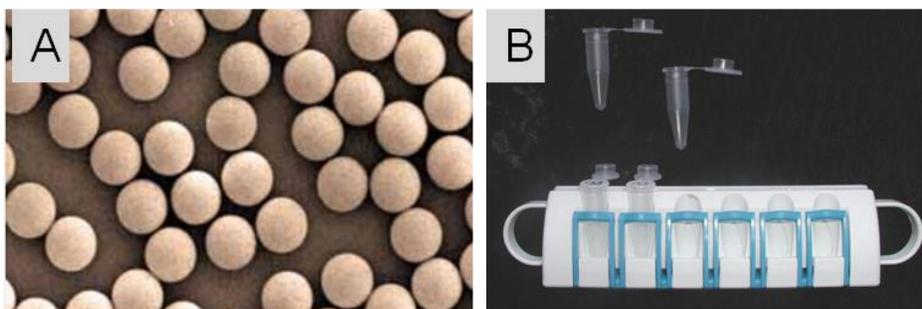


Figura 4-7. A. Imagen ampliada de las *Dynabeads* (Dyna, Noruega), y B. Imán utilizado (MPC-s) *magnetic particle concentrator* para la captura de las *immunobeads* (IMBs).

Una vez obtenidas las IMBs con el anticuerpo anti-Cmm, las mismas fueron utilizadas para capturar las células de Cmm en los extractos problema, en este caso de semillas o plantas. Se llevó a cabo el protocolo desarrollado por De León *et al.* (2006) partiendo de 1 ml del extracto a los cuales se agregan 10 μ l de las IMBs anti-Cmm previamente preparadas. Este extracto conteniendo las esferas magnéticas, se incuba en posición horizontal con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se realizan tres lavados sucesivos con PBS conteniendo 0,1% de sero-albúmina bovina (BSA) y 0,05% de

Tween20, tal como se mencionó anteriormente. De esta manera, se eliminan todas las partículas no adheridas a las esferas magnéticas cubiertas con el anticuerpo anti-Cmm. Por último, las muestras se re-suspendieron en 110 μ l de PBS; de los que 100 μ l fueron utilizados para plaquear en medio *KingB* (IMS-*plating*) y el resto se utilizó como molde en la reacción de qPCR (IMS-qPCR).

4.2.8 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS DE DETECCIÓN DE CMM EN LOTES DE SEMILLA DE TOMATE

Se evaluaron las distintas metodologías previamente mencionadas con el objetivo de optimizar un protocolo de detección de Cmm en muestras de semillas. Para evaluar la sensibilidad de estos métodos, se utilizó como estrategia experimental el agregado de semillas infectadas artificialmente a muestras de semilla libres de patógeno, intentando reproducir las condiciones naturales de infección de los lotes.

4.2.8.1 INFECCIÓN ARTIFICIAL DE LAS SEMILLAS DE TOMATE

A partir de una suspensión de 10^9 ufc/ml de Cmm se realizaron diluciones seriadas al décimo hasta 10^5 ufc/ml, obteniéndose 5 concentraciones de inóculo de Cmm diferentes. Por otra parte, se colocaron 200 semillas de tomate en placas de petri para cada una de las concentraciones deseadas. La infección de las semillas se realizó mediante el agregado de 3 ml de cada inóculo manteniéndose en agitación orbital suave a 36°C durante 2 horas. Luego, se disminuyó lentamente la temperatura hasta llegar a 25°C, donde se las mantuvo hasta su desecación completa. Las semillas se colocaron en tubos bien sellados y se guardaron a 4°C hasta su uso. Para verificar el nivel de contaminación de las semillas, se disgregaron semillas individuales en SEB, y se realizaron diluciones seriadas al décimo para el conteo de colonias en placas de NBY. Los recuentos se realizaron a la semana y a los 6 meses luego de la infección, utilizando 10 semillas cada vez. Estas semillas fueron conservadas a 4°C en condiciones de baja humedad para ser utilizadas luego como inóculo en la infección de lotes de semillas sanas.

4.2.8.2 ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD EN LOTES DE SEMILLA INFECTADOS

Para evaluar la sensibilidad de los métodos de detección, se utilizó una semilla infectada de manera artificial con diferentes concentraciones de Cmm (10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/semilla). Las mismas fueron utilizadas para infectar lotes de 2000 semillas sanas y evaluar así el límite de sensibilidad de las distintas metodologías (Figura 4-8). A cada uno de los lotes obtenidos de esta manera los llamamos L1, L2, L3 y

L4, cada uno de ellos infectados con una semilla con 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/semilla, respectivamente. Estos lotes fueron procesados según se indica en el ítem 4.2.3 y los extractos obtenidos fueron analizados por las distintas metodologías: qPCR directa, BIO-qPCR, IMS-qPCR e IMS-plating. Este ensayo fue repetido en diversas ocasiones, con algunos cambios en las metodologías y en las semillas utilizadas. Las condiciones utilizadas para la reacción de qPCR fueron las indicadas en la Tabla 4-5.

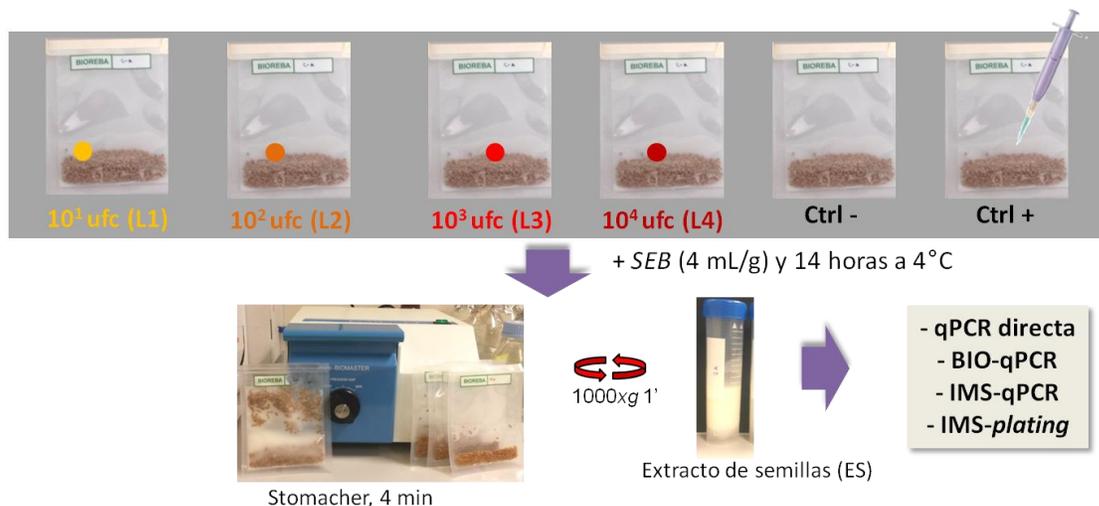


Figura 4-8. Esquema general para la infección de lotes de semillas, procesamiento y obtención de las muestras para la evaluación de la sensibilidad de las distintas metodologías. Lotes de 2000 semillas sanas son infectados con una semilla contaminada de diferentes concentraciones de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (10^1 - 10^4 ufc/semilla), se usa un lote sano como control negativo (ctrl-) y otro inoculado con una suspensión de Cmm como control positivo (ctrl+).

4.2.9 DETECCIÓN DE CMM EN PLANTAS DE TOMATE ASINTOMÁTICAS

También se planteó desarrollar un protocolo de detección de Cmm en plantas de tomate. Esto podría ser útil en la primera etapa de multiplicación del cultivo, llevada a cabo en viveros. En este contexto, se adaptaron los procedimientos previamente descritos para evaluar la detección de Cmm en extractos de planta. Además también se planteó evaluar si las semillas previamente infectadas de manera artificial eran capaces de transmitir efectivamente al patógeno y provocar enfermedad en la planta. Para llevar a cabo los experimentos de esta parte, las semillas infectadas con diferentes niveles de Cmm y semillas sanas (como controles) se pusieron a germinar y se mantuvieron en cámara de crecimiento, como se indica en el ítem 4.2.2.

4.2.9.1 ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD EN PLANTAS ASINTOMÁTICAS

Para evaluar la sensibilidad de los métodos, se utilizaron plantines de 4 semanas crecidos a partir de semillas infectadas con 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , y 10^5 ufc/semilla. Como control negativo se utilizaron plantas crecidas a partir de semillas sanas (libres de Cmm). La estrategia experimental, implicó armar *pools* de 5 plantas cada uno, a los que llamamos P1, P2, P3, P4 y P5 según los niveles de infección de su semillas con 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , y 10^5 ufc/semilla respectivamente (Figura 4-9). Para preparar los extractos de planta se siguieron las indicaciones del *item* 4.2.3. Las metodologías evaluadas fueron: qPCR directa, IMS-qPCR, IMS-plating y BIO-qPCR (CMM1T).

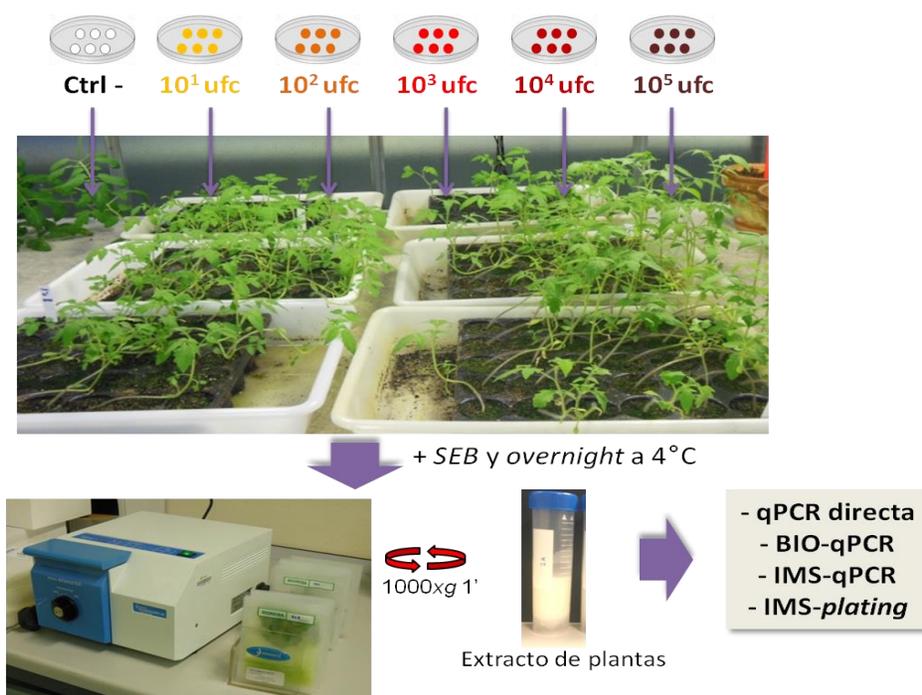


Figura 4-9. Esquema general de la estrategia utilizada para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas provenientes de semillas contaminadas. Las semillas contaminadas con distintos niveles de infección (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , y 10^5 ufc/semilla) y un control de semillas sanas se pusieron a germinar y luego de 4 semanas, se realizó el procesamiento de las muestras.

Además, se llevó a cabo otro experimento, donde se evaluó la posibilidad de realizar la detección sólo en los cotiledones de la planta ya que los mismos pueden utilizarse como muestra para la detección de Cmm, con la ventaja de tratarse de un método no destructivo. De esta manera, para cada *pool* de

plantas y un control negativo, se analizaron por separado los cotiledones (a las cuales se denominó C1, C2, C3, C4 y C5, respectivamente) y la parte aérea de la planta (P1, P2, P3, P4, y P5). La metodología evaluada en este caso fue la BIO-qPCR, la cual se llevó a cabo en SCM (para parte aérea) y CMM1T (para cotiledones).

Todas las reacciones de qPCR de esta parte se llevaron a cabo con el sistema *MVS21*, con las condiciones detalladas en la Tabla 4-5.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE qPCR

4.3.1.1 EVALUACIÓN DE KITS COMERCIALES DE qPCR

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de dos kits comerciales (*Rotor-gene* y *Quanti-Tec*), nos permitieron seleccionar el kit *Rotor-gene* para ensayos posteriores. Todas las muestras de Cmm analizadas presentaron valores de C_q más bajos para este kit, utilizando el sistema *Ptssk*. A pesar de no haber realizado una comparación exhaustiva a través de la construcción de una curva de calibración para cada kit, estos resultados sugieren una mayor sensibilidad de detección para el kit *Rotor-gene* ya que para una misma cantidad de molde se logra superar el umbral de fluorescencia en un menor número de ciclos de amplificación (Figura 4-10).

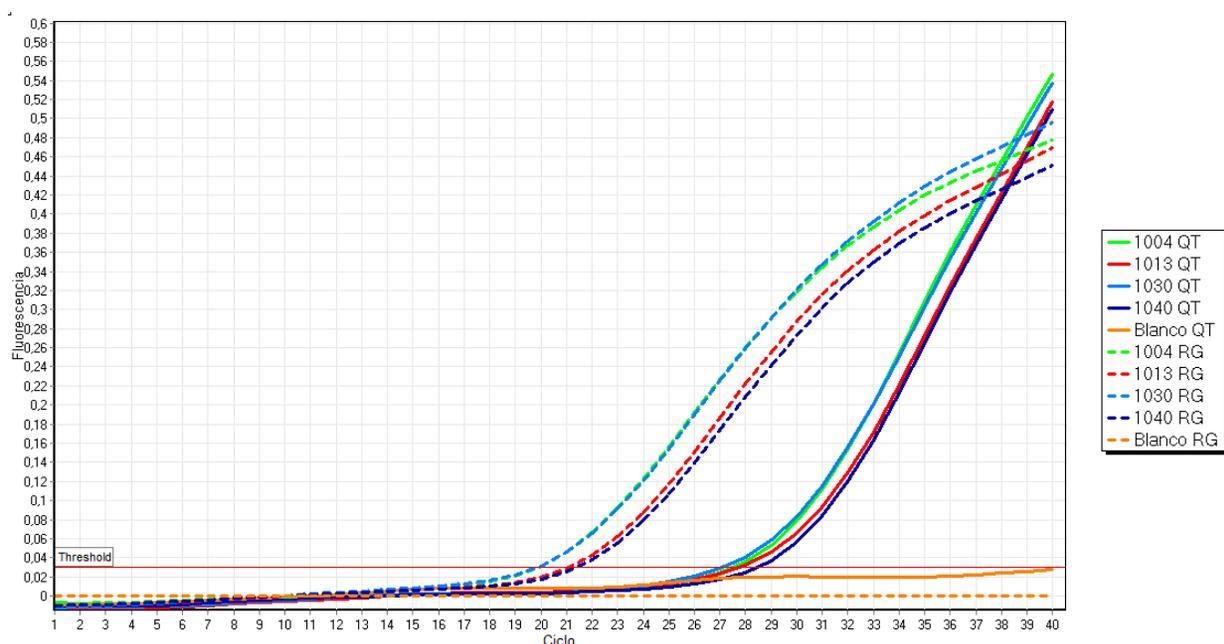


Figura 4-10. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para la evaluación de kits de qPCR con el sistema *Ptssk*. Las muestras analizadas con la *master mix Rotor-gene* (RG) se muestran en punteado y en línea continua las de *Quanti-Tec* (QT). El valor umbral fue fijado en 0,03. Los valores de C_q se detallan en el Anexo III (Tabla A-1).

4.3.1.2 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REACCIÓN DE LOS SISTEMAS *PTSSK* Y *MVS21*

Se determinó la sensibilidad y la eficiencia de estos sistemas mediante la construcción de una curva de calibración a partir de diluciones de ADN genómico de Cmm. La sensibilidad de detección fue de 2,0 pg de ADN tanto con el sistema *Ptssk* como *MVS21* (Figura 4-11). Las eficiencias de amplificación obtenidas a partir de los valores de la pendiente de cada curva de calibración fueron del 100% para *Ptssk* y 104% para *MVS21* (Figura 4-12), siendo el rango lineal en ambos casos de 2,0 pg a 20 ng de ADN. El coeficiente de regresión lineal (r^2) para ambas curvas fue de 0,99770 para *Ptssk* y 0,99041 para *MVS21*, lo que demuestra un muy buen ajuste lineal de los datos en ambos casos. Estos resultados nos permiten concluir que ambos sistemas podrían ser utilizados de igual manera para la detección y cuantificación de Cmm. Estas curvas se repitieron en varias ocasiones mostrando resultados similares.

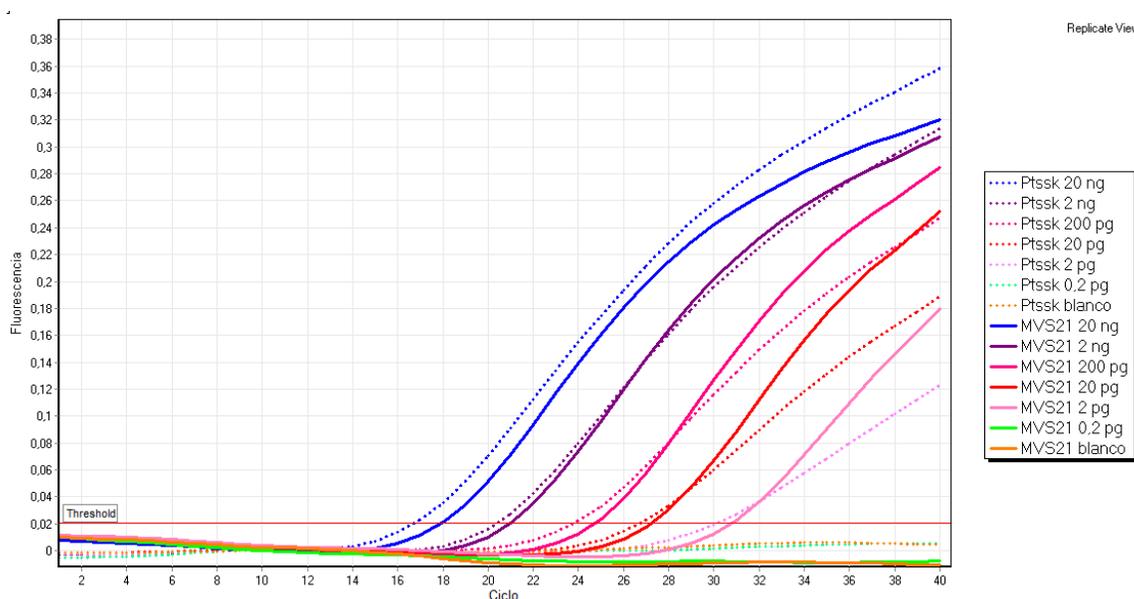


Figura 4-11. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con el sistema *Ptssk* (línea punteada) y *MVS21* (línea continua). Se muestra el resultado promedio de duplicados (*Replicate View*). En el margen derecho se indica el color correspondiente a la cantidad de ADN en cada reacción y el blanco sin ADN. El umbral fue fijado en 0,02. Los valores de C_q se detallan en el Anexo III (Tabla A-2).

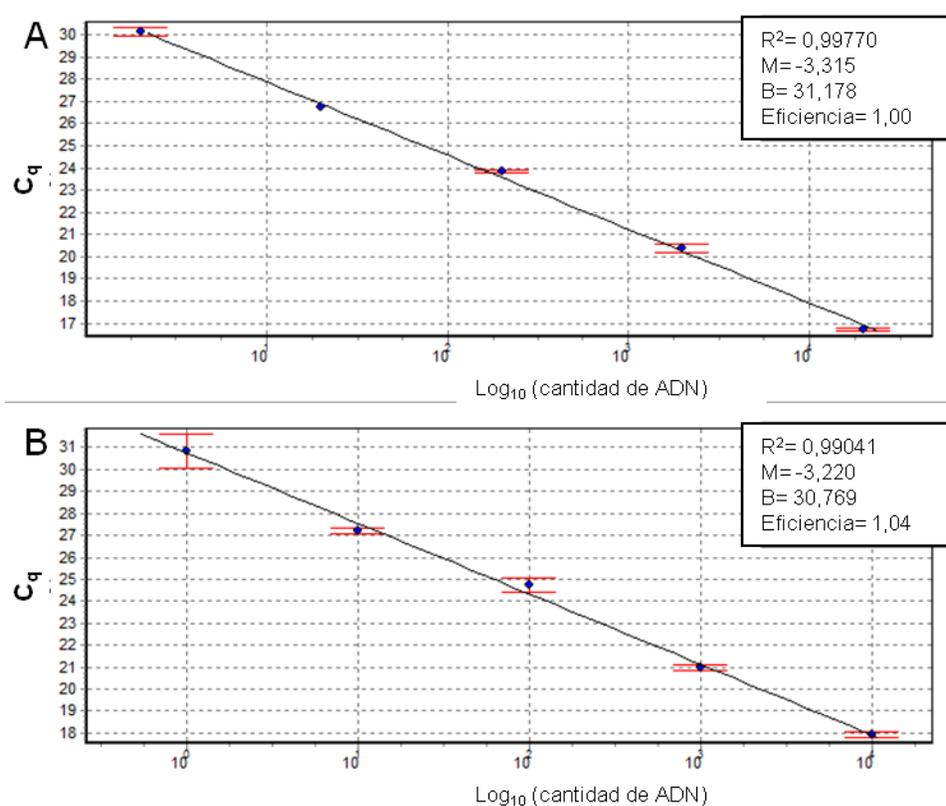


Figura 4-12 Curvas de calibración de las reacciones de qPCR con los sistemas *Ptssk* (A) y *MVS21* (B). Cada punto azul representa el valor de C_q promedio (de duplicados) y su desviación estándar (barras rojas). En el margen superior derecho de cada curva se indican los parámetros de eficiencia.

4.3.1.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ

En una etapa posterior, se procedió a evaluar la detección de Cmm en muestras vegetales donde la bacteria puede estar presente, en este caso semillas o plantas de tomate. Para evaluar el efecto de la matriz sobre la *performance* de la reacción, se analizaron extractos de semillas (ES) y de plantas (EP) inoculados con distintas concentraciones de Cmm y se los comparó con suspensiones de igual concentración, pero en SF (Figura 4-13).

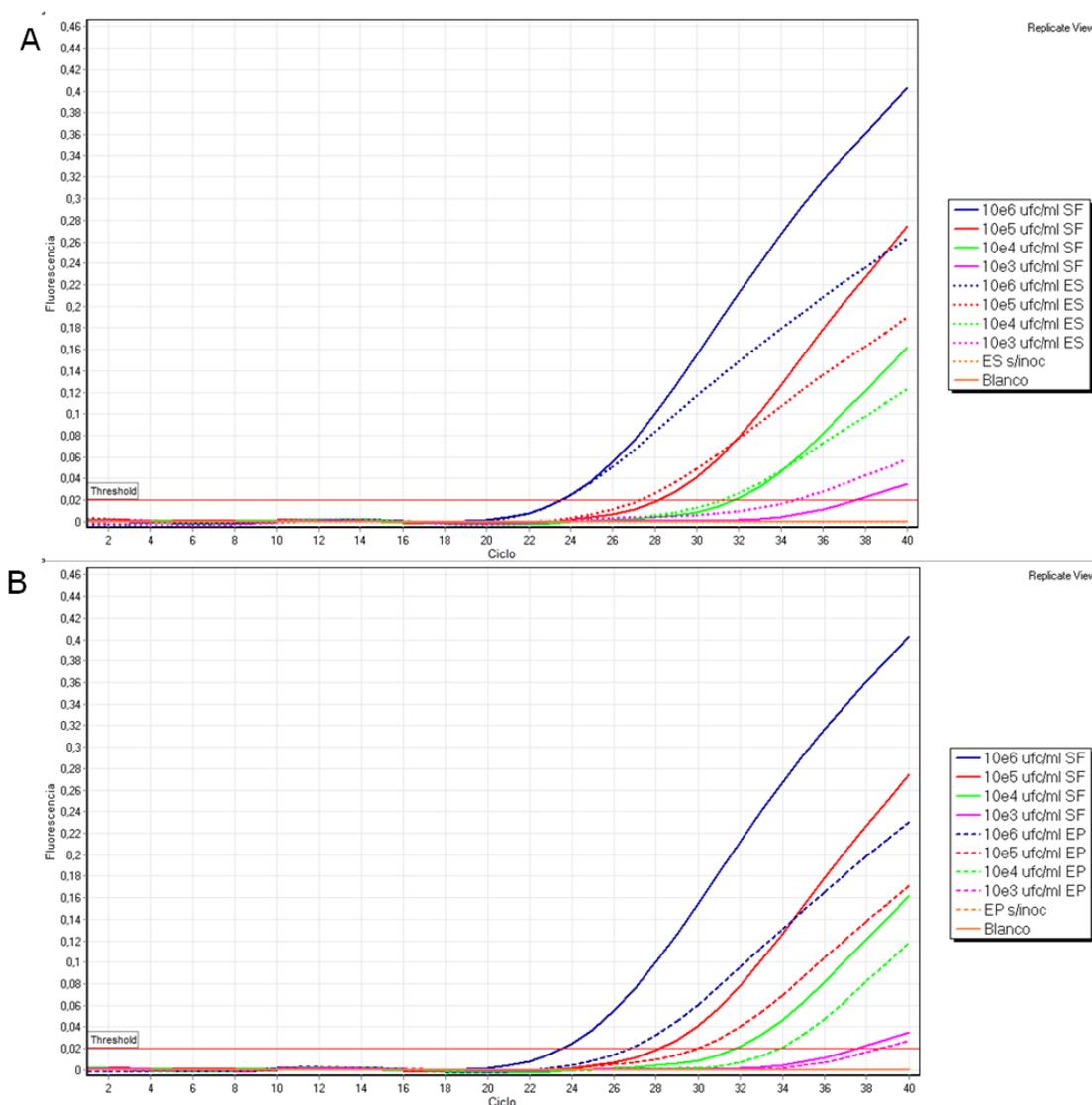


Figura 4-13. Gráficos de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para evaluar el efecto matriz en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en extractos de semillas (A) y extractos de planta (B) utilizando el sistema *Ptssk*. Se muestra el resultado promedio de duplicados (*Replicate View*). En el margen derecho se indica el color que corresponde a cada concentración de Cmm en su matriz. Las líneas punteadas corresponden a los extractos de semillas (ES) o plantas (EP) y la línea continua corresponde a una suspensión de Cmm de la misma concentración, pero en suero fisiológico (SF). El umbral fue fijado en 0,02. Los valores de C_q se detallan en el Anexo III (Tabla A-3).

A partir de estos resultados se concluye que el límite de sensibilidad tanto en ES como en EP fue de $1,0 \times 10^4$ ufc/ml siendo del mismo orden que en SF. Este resultado indica que no parece haber inhibición en la reacción. Sin embargo, en la Figura 4-13 (A) aunque los resultados hayan sido muy similares, se

observan algunas diferencias que sugieren cierto grado de inhibición por efecto de la matriz, como por ejemplo, las formas de las curvas de amplificación en ES. Además, los lotes de semillas pueden ser muy distintos en relación a los inhibidores potencialmente presentes, por lo cual los resultados podrían variar dependiendo del lote utilizado. Por su parte, en el extracto de planta se observa un efecto de inhibición en comparación con las suspensiones en SF, con variaciones de los valores de C_q entre 1,7 y 3,2 dependiendo de la concentración analizada (Figura 4-13, B; Anexo III).

4.3.2 DETECCIÓN DE CMM MEDIANTE BIO-qPCR

Para evitar el efecto de inhibidores potencialmente presentes en estas muestras y aumentar la sensibilidad de detección, se ensayó la estrategia de BIO-qPCR la cual involucra una etapa de cultivo del extracto en un medio sólido semi-selectivo, previo a la reacción de qPCR. La inclusión de esta etapa tiene la desventaja de perder la posibilidad de cuantificar al patógeno en la muestra original. Sin embargo, en este trabajo, nos enfocamos a desarrollar un método de detección de Cmm de gran sensibilidad y confiabilidad que permita determinar la presencia o ausencia de Cmm en muestras vegetales.

4.3.2.1 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD SOBRE EXTRACTOS DE SEMILLA Y PLANTA

La primera manera de evaluar la estrategia de BIO-qPCR fue mediante el análisis de extractos preparados a partir de semillas y plantas de tomate, inoculados artificialmente con distintas concentraciones del patógeno (en un rango de 10 a 10^6 ufc/ml de extracto). Los resultados muestran que la estrategia de BIO-qPCR funciona y con un buen nivel de sensibilidad tanto cuando la muestra proviene de plantas como de semillas. Los extractos de 10^3 ufc/ml y concentraciones inferiores que no fueron detectados por qPCR sin cultivo previo (Figura 4-13), sí son detectables mediante esta estrategia y con bajos valores de C_q (Figura 4-14). Aunque no se muestran en la figura, los extractos con concentraciones superiores también fueron detectados en la BIO-qPCR. El límite de detección de esta técnica es de 10 ufc/ml, tanto en extracto de plantas como de semillas de tomate. Los controles negativos realizados a partir de los propios extractos sin inocular no amplificaron por este método, lo que valida los resultados positivos obtenidos para los extractos inoculados.

Luego de 6 días de incubación en el medio CMM1T se observaron las placas control, confirmándose los resultados reportados en la BIO-qPCR (Figuras 4-15). Se obtuvo una muy buena recuperación del

patógeno en cultivo ya que los recuentos obtenidos se corresponden con las concentraciones de cada extracto. Los resultados del recuento en placa de colonias típicas de Cmm fueron respectivamente, para las concentraciones de 10, 100 y 1000 ufc/ml: de 1, 8 y 54 colonias en ES y 1, 7 y 97 colonias en EP. Por otra parte, se observó que el medio semi-selectivo utilizado (CMM1T) logró inhibir a otros microorganismos saprófitos presentes en estos extractos de semilla y de plantas. Sólo se observaron unas pocas colonias de otros microorganismos en algunas de las placas, pero el medio permitió distinguir las colonias de Cmm (Figura 4-15). Este experimento fue repetido en dos oportunidades obteniéndose resultados similares.

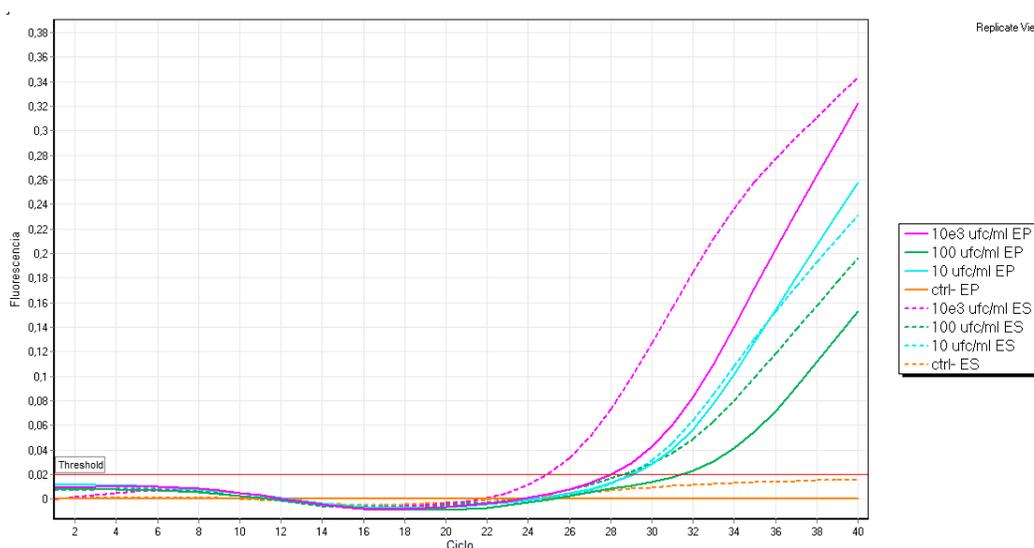


Figura 4-14. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos obtenido a partir de la BIO-qPCR para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en extractos de semilla (ES, línea punteada) y de plantas de tomate (EP, línea continua) inoculados. Se muestra el resultado promedio de duplicados (*Replicate View*). La amplificación por qPCR se realizó utilizando el sistema *Ptssk* luego de una etapa de cultivo del extracto en medio CMM1T. En el margen derecho se indica la concentración de Cmm original en cada extracto. El umbral fue fijado en 0,02. Los valores de C_q se detallan en el Anexo III (Tabla A-4).

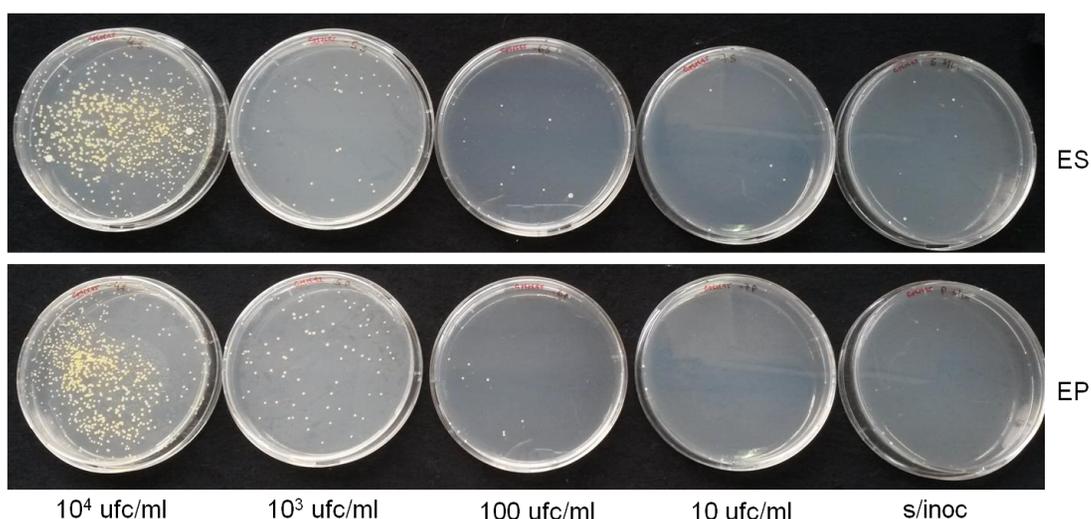


Figura 4-15. Foto de las placas control de la BIO-qPCR luego de 6 días de incubación en CMM1T a 28°C. En el margen inferior se indica la concentración de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y el control sin inocular de cada extracto: de semillas (ES, arriba) y de plantas (EP, abajo).

4.3.2.2 ANÁLISIS DE LOTES DE SEMILLAS POR BIO-QPCR

Otra forma de evaluar este método fue analizar lotes de semillas posiblemente infectado de forma natural con Cmm. Se analizaron tres lotes de semillas de tomate de diferente origen (Lm-1, Lm-2 y Lm-3). Como control positivo se incluyó un lote de semillas inoculado artificialmente con Cmm (10⁵ ufc/ml). Los resultados de la BIO-qPCR mostraron amplificación únicamente para el lote Lm-1, obteniéndose un valor de C_q promedio de 23,4. Esto indicaría que el Lm-1 sí estaba infectado con Cmm, mientras que los lotes Lm-2 y Lm-3 no lo estarían. Tal como era de esperar, en las placas control de la BIO-qPCR luego de 6 días de incubación se observaron colonias de Cmm en el Lm-1, al igual que en control positivo. En la placa correspondiente a Lm-1 se contaron 386 colonias que equivalen a una concentración de 3,9 x 10³ ufc/ml en el extracto original (resultado estimado). Por otra parte, no se observaron colonias de Cmm en las placas control de los lotes Lm-2 ni Lm-3 (Figura 4-16). Si bien podemos decir que el Lm-1 está infectado con Cmm, no podemos decir que los lotes Lm-2 y Lm-3 se encuentran libre de patógeno ya que el material de partida fue muy escaso (solo 350 semillas), no cumpliendo con las exigencias requeridas para el tamaño de muestras a los efectos de dar un resultado confiable representativo de todo el lote (tamaño de muestra recomendado 10000 semillas).

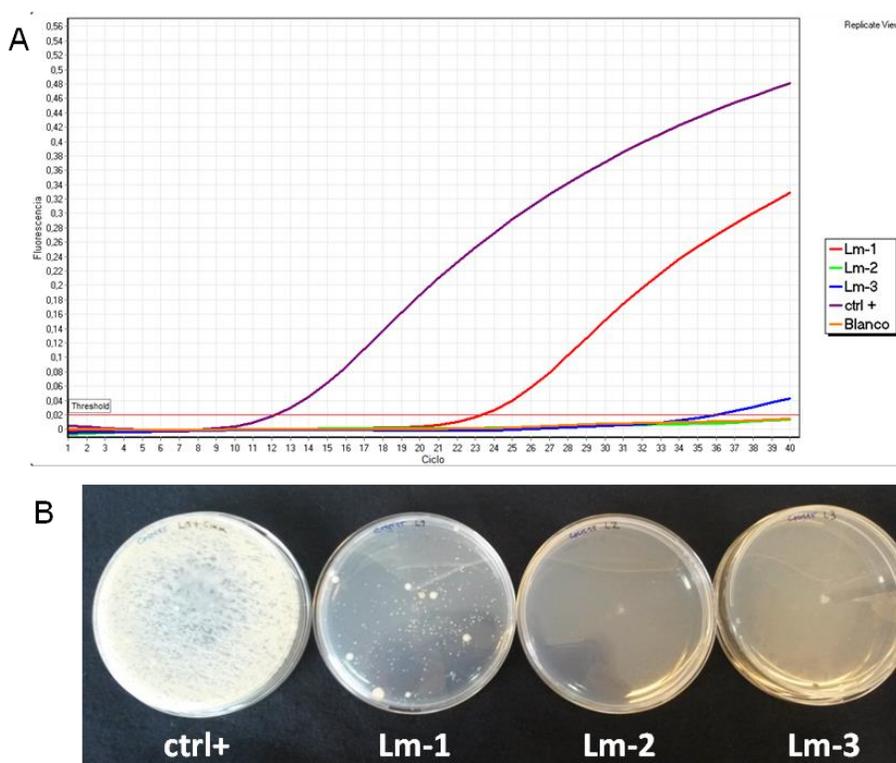


Figura 4-16. A. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos obtenido a partir de la BIO-qPCR de lotes de semillas sin inocular (Lm-1, Lm-2 y Lm-3) y un control positivo inoculado (ctrl+). Se muestra el resultado promedio de duplicados (*Replicate View*). En el margen derecho se indica el lote correspondiente a cada curva. El umbral fue fijado en 0,02 y los valores de C_q se detallan en el Anexo III (Tabla A-5). B. Foto de las placas control de la BIO-qPCR luego de 6 días de incubación en CMM1T a 28°C. En el margen inferior se indica el lote correspondiente y el control positivo (ctrl+) del extracto inoculado.

4.3.3 DETECCIÓN DE CMM EN LOTES CON SEMILLAS CONTAMINADAS DE MANERA ARTIFICIAL

Se evaluó la sensibilidad en la detección de Cmm en lotes de semillas de tomate siguiendo la metodología descrita en la Figura 4-8, intentando aproximarse a las condiciones reales, donde en los lotes evaluados hay una baja proporción de semillas contaminadas. La relevancia de llevar a cabo esta estrategia, radica en que en el caso de Cmm una baja tasa de infección de las semillas (1 semilla contaminada en 10000) es suficiente para iniciar brotes severos de la enfermedad en condiciones favorables (Gleason *et al.*, 1993). En los protocolos de diagnóstico por su parte, se recomienda analizar los lotes en sub-muestras de 2000 semillas, lo que se considera un tamaño adecuado para los análisis de rutina (ISF, 2015).

4.3.3.1 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE INFECCIÓN DE LAS SEMILLAS DE TOMATE

Se obtuvieron semillas de tomate infectadas artificialmente con concentraciones de 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 ufc por semilla a partir de los inóculos iniciales de 10^5 a 10^9 ufc/ml, respectivamente. Este nivel de contaminación fue determinado mediante recuento en medio NBY, a partir de 10 semillas analizadas de manera individual para cada nivel de infección. En la Figura 4-17, se muestra el promedio del recuento obtenido (Log_{10} ufc/semilla) para cada nivel de inoculación, una semana y seis meses después de llevar a cabo la infección. Los recuentos muestran unos niveles de infección estables a lo largo del tiempo, indicando que la viabilidad del patógeno no se vio afectada durante el periodo de evaluación.

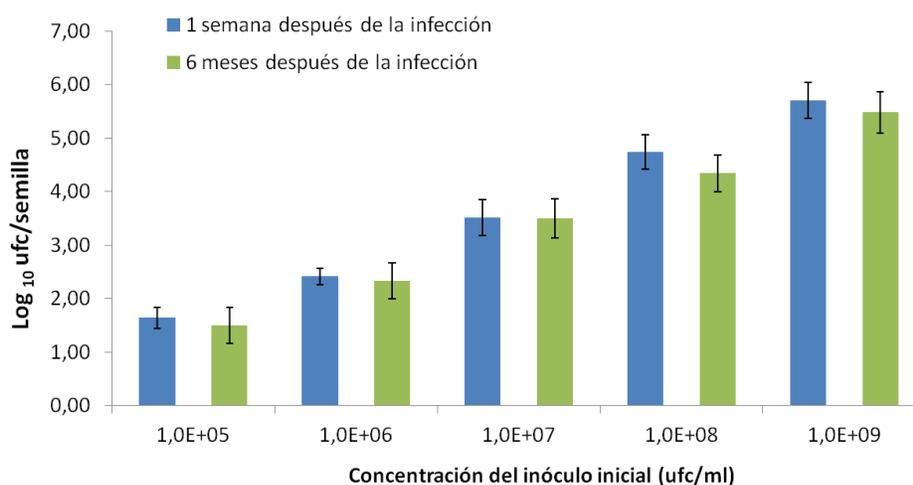


Figura 4-17. Determinación por recuento en placa en medio NBY del nivel de infección de las semillas de tomate infectadas de manera artificial con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), una semana y seis meses luego de la infección. Se indica en el eje horizontal la concentración del inóculo utilizada para infectar y en el eje vertical la concentración de Cmm por semilla. Las barras indican la desviación estándar del valor promedio obtenido de 10 semillas.

4.3.3.2 COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DE CMM EN MUESTRAS DE SEMILLA

Se procedió a evaluar y comparar las distintas metodologías mediante el abordaje experimental indicado en la Figura 4-8. Los lotes de semillas se generaron a partir de 2000 semillas sanas mediante el agregado de 1 semilla contaminada con distintos niveles de Cmm (10^1 - 10^4 ufc/semilla), nombrándose a cada uno de ellos L1, L2, L3 y L4, respectivamente. En esta instancia se procedió a evaluar y comparar la sensibilidad de cuatro metodologías: qPCR directa, BIO-qPCR (en SCM), IMS-qPCR, e IMS-*plating*; tal y

como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados de las técnicas que incluyen una etapa de qPCR se resumen en la Tabla 4-6.

Tabla 4-6. Valores de detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por qPCR (C_q promedio \pm intervalo de confianza del 95%) en lotes de 2000 semillas sanas inoculados con una semilla infectada con diferentes niveles de bacteria (L1, L2, L3, L4) y los controles, negativo (ctrl-) y positivo (ctrl+).

Muestra	qPCR directa (ADN)	BIO-qPCR (SCM)	IMS-qPCR	IMS-plating
Ctrl -	-	-	-	-
L1	-	-	-	-
L2	32,2 \pm 2,0	-	-	-
L3	32,1 \pm 0,1	30,4 \pm 0,4	-	+
L4	30,9 \pm 0,1	26,5 \pm 1,2	32,4 \pm 0,6	+
Ctrl +	25,1 \pm 0,1	19,5 \pm 0,9	27,8 \pm 0,6	+

El umbral fue fijado en 0,02. (-) valores de C_q no detectados.

Mediante IMS-qPCR solo fue posible detectar la bacteria en los lotes con el mayor nivel de infección (L4). Por su parte, el método de IMS-plating permitió detectar colonias de Cmm en los lotes L4 y L3, contándose 59 y 3 colonias de Cmm respectivamente (590 y 30 ufc/ml). Según el volumen de SEB agregado a estas muestras, la concentración de Cmm en cada uno de estos extractos sería de 700 y 70 ufc/ml respectivamente (teniendo en cuenta que estos lotes fueron inoculados con una semilla infectada con 10^4 y 10^3 ufc respectivamente). Por lo tanto, podemos concluir que la eficiencia de separación inmuno-magnética fue muy buena ya que se obtuvieron resultados del mismo orden que el esperado. En la Figura 4-18, se muestra la placa de medio *KingB* con 4 días de incubación donde pueden observarse las colonias de Cmm obtenidas a partir de la IMS-plating del L4.

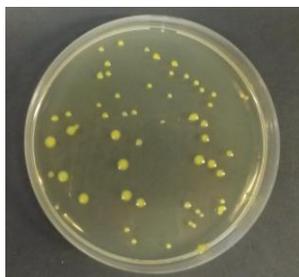


Figura 4-18. Foto de la placa de KingB (4 días de incubación) correspondiente al IMS-plating del L4. Se contaron 59 colonias de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

La mayor sensibilidad para la detección de Cmm fue obtenida mediante qPCR directa con extracción de ADN (*TRIsure*) donde se detectó el patógeno en las 3 muestras con mayores niveles de infección (L2, L3 y

L4). Sin embargo, los valores de C_q entre los lotes no dan resultados proporcionales de acuerdo al nivel de infección del lote, lo que podría deberse a la presencia de inhibidores de amplificación. Además, este método de qPCR directa no fue reproducible utilizando otras semillas donde los resultados fueron muy variables (ver Tabla 4-7).

La BIO-qPCR presentó buena sensibilidad ya que fue posible la detección de Cmm en los lotes L3 y L4. Además, a los 6 días de incubación se observaron las placas control y pudieron verse colonias de Cmm en estos dos lotes. Con esta técnica se logran valores de C_q inferiores a los obtenidos en los mismos lotes (L3 y L4) mediante qPCR directa e IMS-qPCR. Esto se aprecia bien al observar las muestras que dieron positivas con las 3 metodologías (L4 y el propio control positivo), donde los valores más bajos de C_q fueron detectados mediante BIO-qPCR. Además, esta técnica permite el aislamiento del patógeno en placa, luego de 6 días de incubación en el medio semi-selectivo, requisito generalmente exigido para informar resultados positivos de diagnóstico fitosanitario.

4.3.3.3. OTRA VARIABLE DE BIO-QPCR: MEDIOS SEMI-SELECTIVOS

Para optimizar las variables de la BIO-qPCR se procedió a evaluar los medios selectivos para llevar a cabo la etapa de enriquecimiento de la misma. Se seleccionaron los dos medios semi-selectivos recomendados en el protocolo ISF (2015): CMM1T y SCM.

Al igual que en el ensayo anterior, en ambos medios semi-selectivos el límite de sensibilidad fue el lote L3, es decir de 1 semilla contaminada con 10^3 ufc en 2000 semillas. Para esta muestra, los valores de C_q promedio fueron de $24,4 \pm 0,1$ y $32,3 \pm 0,1$ para CMM1T y SCM, respectivamente. Al observar las placas luego de 6 días de incubación se observa que el medio SCM es más selectivo con respecto al CMM1T (Figura 4-19). Mientras que en el medio SCM no se observa crecimiento de microbiota asociada a las semillas para las muestras L1 y L2, sí se observa crecimiento abundante de saprófitos en el medio CMM1T. En el lote L3 se pudieron contar 19 colonias de Cmm en SCM; y en CMM1T, se distinguen las colonias de Cmm pero que crecen sobre el manto de otros microorganismos saprófitos presentes en la semilla.

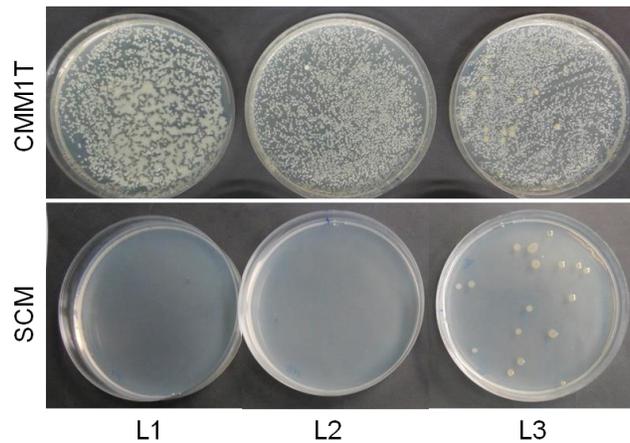


Figura 4-19. Placas control con 6 días de incubación a 28°C en CMM1T (arriba) y SCM (abajo). En el margen inferior se indica el lote al que corresponden las placas.

4.3.4 ENSAYO COMPARATIVO CON SEMILLAS DE DIFERENTE ORIGEN

Finalmente, las metodologías previamente evaluadas, se analizaron con lotes de semillas de diferentes orígenes para contemplar diferencias asociadas a la microbiota y otras variables de cada lote de semilla (Figura 4-20). En este experimento, se incluyó una nueva variante que consistió en realizar el cultivo en medio líquido como etapa previa a la amplificación por qPCR. También se evaluó la alternativa de concentrar el extracto de semilla previo a la BIO-qPCR (10x).

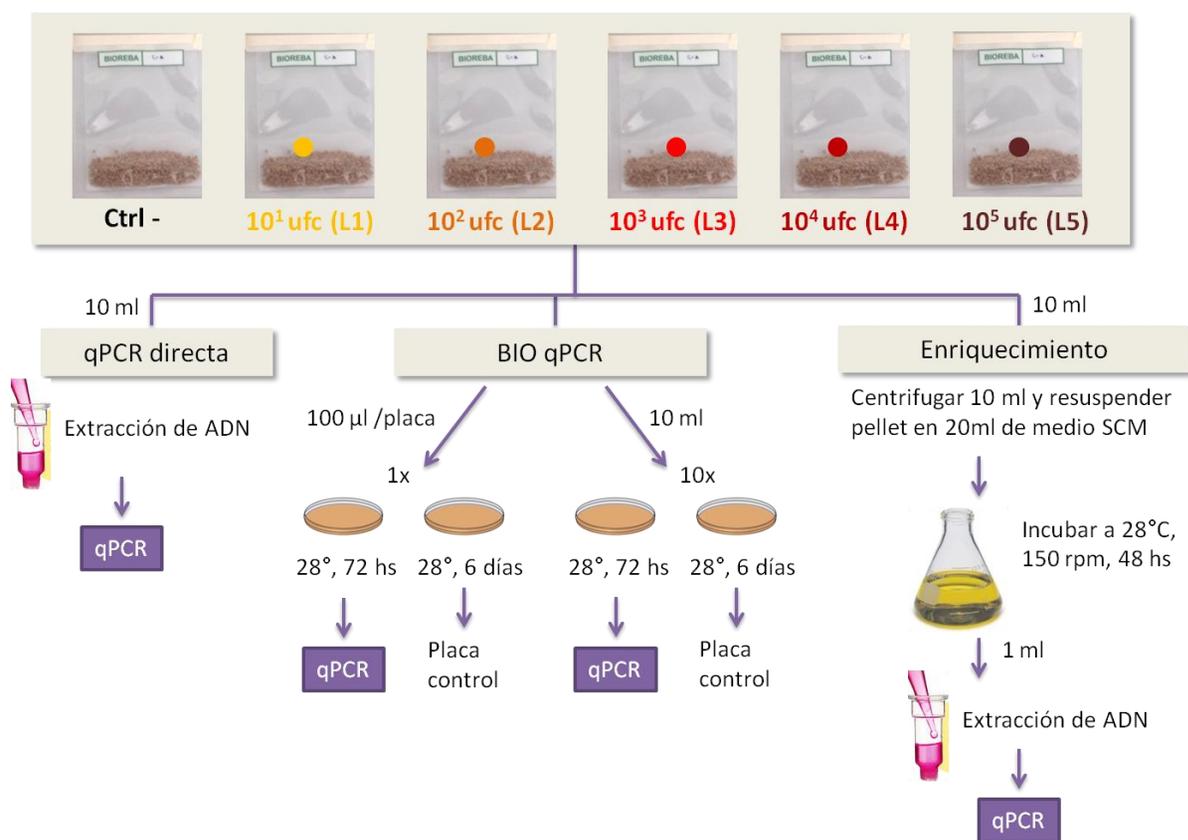


Figura 4-20. Esquema de las metodologías utilizadas para evaluar la sensibilidad de detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en lotes de semillas con diferentes niveles de infección. Se evaluaron las metodologías de qPCR directa, BIO-qPCR (1x y 10x) en medio SCM y BIO-qPCR en medio líquido SCM. El sistema utilizado en todas las reacciones de qPCR fue el MVS21.

Se utilizaron 3 lotes de semillas de diferente origen: Chile, Tailandia y Uruguay, como se indica en el ítem 4.2.2. La cantidad de extracto obtenido para cada muestra es una limitante a la hora de evaluar varias metodologías, ya que se recupera un 70-80% aproximadamente luego del procesamiento de la misma. Además, tampoco fue posible analizar todos los lotes con diferentes niveles de infección con las semillas de Uruguay debido a la poca cantidad de muestra disponible. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 4-7.

Tabla 4-7. Valores de detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por qPCR (C_q promedio \pm intervalo de confianza del 95%) en lotes de 2000 semillas sanas inoculados con una semilla infectada con diferentes niveles de bacteria (L1, L2, L3, L4, L5) y el control negativo sin infectar (Ctrl-).

Origen	Lote	qPCR directa (ADN)	BIO-qPCR 1x (SCM)	BIO-qPCR 10x (SCM)	Enriquecimiento en SCM, 48 hs
Chile	Ctrl -	-	-	-	-
	L1	31,6 \pm 0,5	-	-	-
	L2	29,3 \pm 0,3	-	-	-
	L3	25,5 \pm 0,7	-	32,5 \pm 0,3	-
	L4	22,2 \pm 0,5	32,6 \pm 0,8	29,0 \pm 0,1	33,2 \pm 0,1
	L5	24,1 \pm 2,9	27,2 \pm 0,2	22,4 \pm 0,2	30,0 \pm 0,4
Tailandia	Ctrl -	-	-	-	Nd
	L1	-	-	33,2 \pm 0,1	Nd
	L2	-	-	28,4 \pm 0,2	Nd
	L3	-	31,3 \pm 0,4	24,1 \pm 0,1	Nd
	L4	22,5 \pm 0,3	28,5 \pm 0,6	21,0 \pm 0,4	Nd
Uruguay	Ctrl -	-	-	-	Nd
	L3	33,9 \pm 0,5	34,6 \pm 0,4	26,4 \pm 0,1	Nd

El umbral fue fijado en 0,02. (-) valores de C_q no detectados. Nd: no determinado

El método de qPCR directa con extracción de ADN parece tener buena sensibilidad en las semillas de Chile ya que es posible la detección de Cmm hasta en el L1 (lote de 2000 semillas sanas y 1 semilla con 10 ufc). Sin embargo, a la vista de los datos obtenidos para esta técnica con los lotes de Tailandia y Uruguay (Tabla 4-7), parece aconsejable realizar ajustes en el método de extracción para lograr mejorar la reproducibilidad del método y que pueda ser utilizada como método rutinario de diagnóstico. Además, el sistema *Wu* utilizado como control interno de amplificación, no amplifica en los lotes L1 y L2 de las semillas de Tailandia, lo que podría indicar que los inhibidores no son extraídos eficientemente con el procedimiento realizado.

En cuanto al método de enriquecimiento en medio SCM, los resultados mostraron sensibilidad similar a la BIO-qPCR en placa (1x), logrando detectar los lotes L4 y L5 en la semilla de Chile. Si bien el tiempo de incubación es menor al requerido para la BIO-qPCR en placa (72 hs), se debe tener en cuenta que este método abarca además una etapa de extracción de ADN del cultivo previo a la qPCR. Para las semillas de Tailandia y Uruguay, el procedimiento de BIO-qPCR en placa, fue capaz de detectar hasta el lote L3 (1 semilla contaminada con 10^3 ufc en 2000 semillas sanas). El mismo nivel de sensibilidad fue obtenido mediante esta metodología en experimentos anteriores (Tabla 4-6). No sucedió lo mismo con las

semillas de Chile donde el límite de detección fue el lote L4, tal como se mencionó anteriormente. Sin embargo, al concentrar el extracto 10 veces (BIO-qPCR 10x), la sensibilidad mejoró notoriamente, detectándose valores de C_q más bajos para un mismo nivel de infección con los distintos tipos de semillas. Incluso, con las semillas de Tailandia fue posible la detección en el lote con el menor nivel de infección (L1), es decir que la sensibilidad en este caso es de 1 semilla infectada con 10 ufc en un lote de 2000 semillas. Puede concluirse a partir de estos resultados que el límite de sensibilidad es variable según el origen de la semilla utilizada. Este aumento de sensibilidad por concentración del extracto previo a la siembra sólo fue verificado cuando se utilizó el medio SCM. En otro experimento donde esta variable fue evaluada en el medio CMM1T no se observaron diferencias de sensibilidad de detección por qPCR.

La observación de las placas control permitió verificar los resultados de BIO-qPCR, ya que se contaron colonias de Cmm en todas las placas con resultados positivos (Tabla 4-7, Figura 4-21). Además, se observó la proporción esperada en el número de colonias obtenidas para los diferentes lotes y para las placas sembradas luego de la etapa de concentración del extracto (10x).

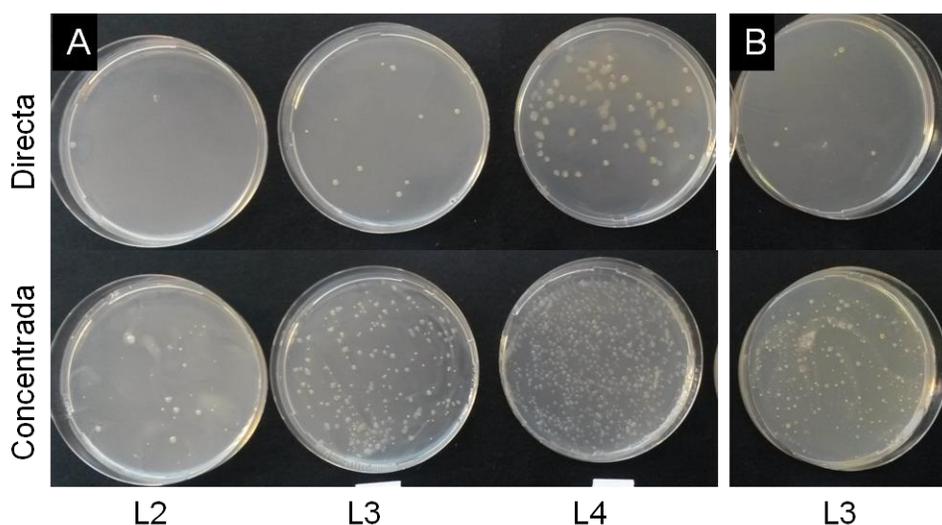


Figura 4-21. Placas control en medio SCM luego de 6 días de incubación a 28°C de la BIO-qPCR con semillas de Tailandia (A) y de Uruguay (B) con diferentes niveles de infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Las placas de arriba corresponden a la siembra del extracto de semilla directo y las del abajo a la siembra del extracto concentrado 10 veces. En el margen inferior se indica el lote al que corresponden las placas.

4.3.5 DETECCIÓN DE CMM EN PLANTAS DE TOMATE

Como otra estrategia preventiva para el control de la enfermedad, en este trabajo se realizó una primera aproximación para desarrollar un protocolo de detección aplicable a la detección del patógeno en plantas de tomate asintomáticas. Las metodologías fueron evaluadas en plantas asintomáticas generadas a partir de las propias semillas infectadas utilizadas en el apartado anterior (ver Figura 4-9).

4.3.5.1 TRASMISIÓN DE CMM DE LA SEMILLA A LA PLANTA

En primer lugar, se verificó la transmisión de la bacteria de estas semillas infectadas artificialmente a la planta. A las 8 semanas de crecimiento, se observaron síntomas típicos de cancro en todas las plantas generadas a partir de semillas infectadas con 10^2 o más ufc/semilla (Figura 4-22) siendo, en este trabajo, la dosis mínima necesaria para la infección. A partir de estas plantas se realizaron aislamientos por estría en medio *KingB*, logrando verificar la presencia de Cmm en todas estas muestras.

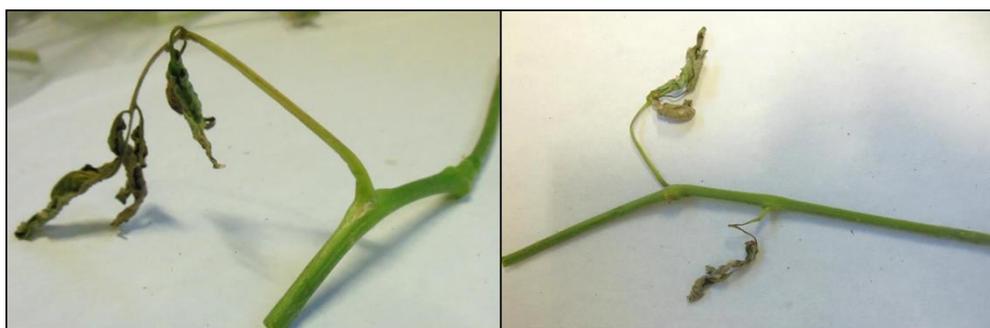


Figura 4-22. Síntomas típicos de cancro bacteriano en una planta de tomate de 8 semanas generada a partir de una semilla artificialmente inoculada con un nivel de infección de 10^2 ufc/semilla de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

4.3.5.2 DETECCIÓN DE CMM EN PLANTAS ASINTOMÁTICAS.

Se realizó la comparación y evaluación de la sensibilidad de las distintas metodologías (ya evaluadas en semillas) para la detección de Cmm a partir de plantas asintomáticas. Este ensayo se llevó a cabo como se indica en la Figura 4-9, utilizando toda la parte aérea de las plantas luego de 4 semanas de crecimiento. Las metodologías evaluadas fueron: qPCR directa (con extracción de ADN), IMS-qPCR, *IMS-plating*, BIO-qPCR en CMM1T (con placa control en CMM1T y SCM).

Como primer resultado, la metodología de *IMS-plating* no detectó la bacteria en ninguno de los extractos de plantas evaluados, ya que se observó crecimiento de saprófitos en las placas sembradas siendo imposible distinguir colonias de Cmm. Posiblemente esto se deba a la baja especificidad del anticuerpo utilizado, que permitió la unión de otros microorganismos presentes en el extracto de planta. Por otra parte, los resultados de qPCR no nos permitieron detectar diferencias en cuanto a sensibilidad entre las tres metodologías ya que en todas, la sensibilidad fue la muestra P4, es decir el *pool* de plantas provenientes de semillas infectadas con 10^4 ufc/semilla. Sin embargo, hay grandes diferencias en cuanto a los valores de C_q registrados en esta muestra, los cuales fueron de 14,7; 23,2 y 29,6 para la BIO-qPCR, qPCR directa e IMS-qPCR, respectivamente (el umbral fue fijado en 0,15). Nuevamente, la BIO-qPCR es la metodología donde se observan los valores más bajos de C_q .

En un segundo experimento se analizaron los cotiledones y la parte aérea de la planta por separado, con el objetivo de evaluar la posibilidad de poner a punto un método de detección Cmm utilizando un muestreo no destructivo. Este experimento fue realizado sólo mediante BIO-qPCR, debido a los resultados obtenidos previamente. Esta vez, en la parte aérea de la planta se detectó Cmm hasta en la muestra P2, es decir, el *pool* de plantas provenientes de semillas infectadas con 10^2 ufc/semilla (Figura 4-23, A). Sin embargo, la muestra P3 no fue detectada, lo que puede deberse a la variabilidad en dos aspectos: el nivel de infección de la semilla y, la trasmisión y multiplicación de la bacteria en la planta. En las placas control de SCM no se observan saprófitos y fue posible distinguir manto de Cmm en las muestras P2, P4 y P5. Por su parte, en cotiledones sólo fue posible la detección de Cmm en plantas provenientes de semillas infectadas con 10^4 y 10^5 ufc (C4 y C5). A pesar de observarse una amplificación tardía (C_q entre 30,5 y 31,5) de las muestras C1, C2 y C3, las mismas se consideraron negativas ya que amplifican junto con el control de la planta sana (Figura 4-23, B). Sin embargo, las muestras C4 y C5 consideradas positivas presentan una diferencia de C_q con el control negativo de 16,0 y 16,3 respectivamente (ver Anexo III, Tabla A-6). Además, en las placas control de CMM1T observadas a los 7 días de incubación, se observó el crecimiento de un manto de otros microorganismos y no fue posible la distinción de colonias de Cmm.

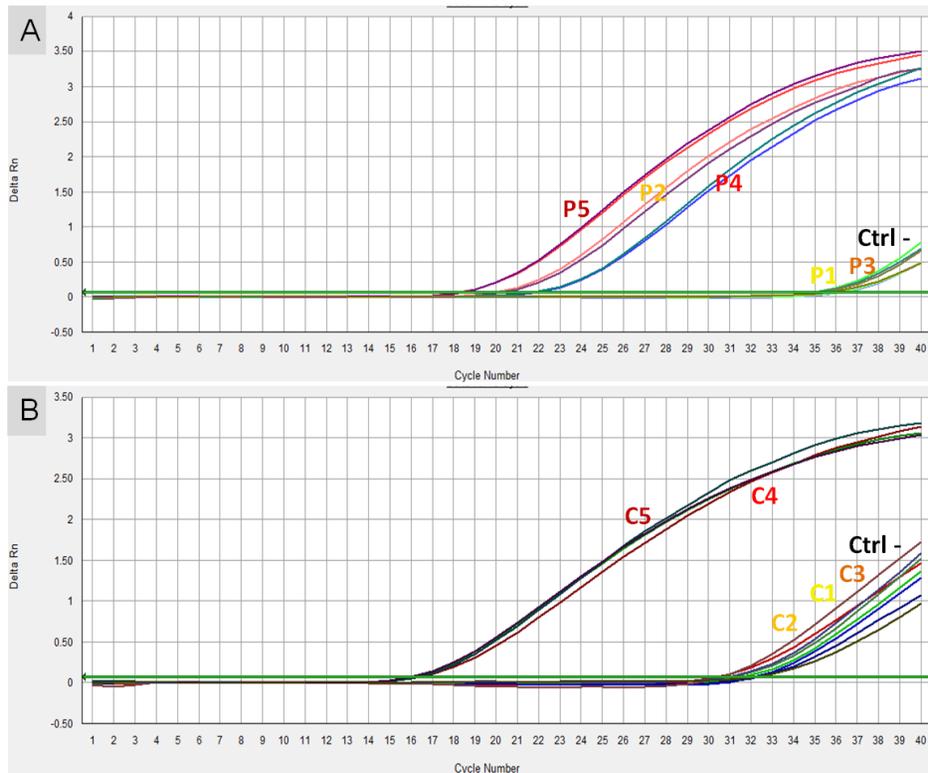


Figura 4-23. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) mediante BIO-qPCR en plántulas de tomate obtenidas de semillas infectadas artificialmente con distintas concentraciones del patógeno. Se muestra el resultado de los duplicados. Se analizaron *pools* de 5 plantas de: (A) parte aérea (P1, P2, P3, P4 y P5) y (B) cotiledones (C1, C2, C3, C4, C5). Sobre de cada curva se indica el *pool* correspondiente según el nivel de infección de la semilla desde 1 (10 ufc/semilla) hasta 5 (10⁴ ufc/semilla) y los controles de plantas sanas (Ctrl -). El umbral fue fijado en 0,07 y los valores de C_q se detallan en el Anexo III (Tabla A-6).

4.4 DISCUSIÓN

La detección de microorganismos fitopatógenos en material de propagación y reservorios naturales como el suelo, resulta de vital importancia para garantizar las condiciones fitosanitarias de los cultivos (Oepp/Eppo, 2013). En el caso de Cmm, las semillas son la principal fuente de diseminación de la enfermedad y la existencia de muy bajos niveles de infección son suficientes como para iniciar una epidemia importante (Gleason *et al.*, 1993). De manera similar la detección en plantas asintomáticas, sirve para realizar un diagnóstico a nivel de viveros, ya que los síntomas de la enfermedad generalmente no se expresan en plantas jóvenes y resulta fundamental evitar que el patógeno llegue al cultivo. Por lo tanto, el desarrollo de métodos de detección aplicables a estos dos tipos de muestras tiene una gran importancia para el control preventivo de esta enfermedad.

En este trabajo, la técnica de PCR a tiempo real (qPCR) fue seleccionada para el desarrollo de un método de detección de Cmm en muestras de semillas y plantas de tomate. Debido a sus indudables ventajas, como la mayor eficiencia, sensibilidad, rapidez y el menor riesgo de contaminación cruzada, la qPCR ha adquirido recientemente gran relevancia en el diagnóstico de enfermedades (Costa, 2004). Esta tecnología ha sido incorporada con éxito a los protocolos de control fitosanitario de varios patógenos, incluyendo *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* en tubérculos de papa (Schaad *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2000). A su vez, el uso de sondas de hidrólisis (ej. *Taqman*) permite la adaptación de reacciones de tipo *multiplex*-qPCR mediante la utilización de distintos fluoróforos para cada blanco de amplificación. En este trabajo, esta posibilidad permitió la inclusión de un control interno de amplificación (el sistema *Wu*, Tabla 4-5) diseñado para evitar la ocurrencia de falsos negativos, lo cual es esencial en aplicaciones de diagnóstico. Además, otra variante de *multiplex*-qPCR que podría ser explorada es la posibilidad de detectar varios patógenos de semilla simultáneamente, lo cual resulta muy ventajoso para reducir costos y tiempos de análisis (Johnson y Walcott, 2012).

En este trabajo, se evaluaron los dos sistemas de cebadores y sonda para qPCR recomendados en la última versión del protocolo de la ISF para identificación de Cmm (*Ptssk* y *MVS21*). Tal como era de esperar, los resultados obtenidos demostraron una muy buena eficiencia y sensibilidad de estos sistemas para la detección de Cmm, por lo cual se confirma que ambos son adecuados para su utilización como herramientas de análisis.

Se determinó un límite de sensibilidad de detección de Cmm mediante qPCR de 10^4 ufc/ml en suspensiones celulares del patógeno. Este resultado es similar al obtenido por otros autores (Luo *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007). Cuando se evaluó la sensibilidad en extractos de semillas se obtuvo el mismo límite de sensibilidad, indicando que el efecto matriz de estas muestras no parece ser importante. Sin embargo, en el caso de la detección en plantas, se obtuvieron valores de C_q mayores que para suspensiones en SF, lo que sugiere un mayor efecto de inhibición en este tipo de muestras. Un aspecto a considerar es que el efecto matriz puede ser muy variable según el lote de semillas utilizado y la forma de obtención del extracto, por lo que las metodologías evaluadas en este trabajo tendientes a prevenir y minimizar esta interferencia, son siempre convenientes.

En este trabajo se han evaluado diferentes estrategias destinadas a aumentar la sensibilidad de las técnicas basadas en qPCR para la detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* entre las que se encuentran: BIO-qPCR, IMS-qPCR y qPCR directa. Se comenzó evaluando la estrategia de BIO-qPCR ya que presenta grandes ventajas: permite utilizar un volumen mayor de la muestra original, aumenta la cantidad de células blanco debido a la multiplicación durante la etapa de cultivo, 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 (Schaad *et al.*, 1999). Las principales desventajas de esta estrategia son que aumentan los tiempos de análisis y que se pierde la posibilidad de determinar la concentración original del patógeno en la muestra. Al agregar una etapa de cultivo previo a la amplificación se pierde la posibilidad de relacionar el valor de C_q obtenido con la cantidad de patógeno en la muestra original. Sin embargo, en este trabajo, el tipo de respuesta que se pretende brindar es un diagnóstico basado en la ausencia o presencia del patógeno, independientemente de su concentración. El uso de la qPCR con el objetivo de detectar un blanco determinado, en lugar de para su cuantificación, es referido como PCR cualitativa, y es muy utilizado en diagnóstico molecular (Bustin *et al.*, 2009). Esto es aplicable a patógenos como Cmm, ya que bajos niveles de infección son suficiente para iniciar una epidemia en condiciones favorables (Gleason *et al.*, 1993).

Los resultados obtenidos mediante qPCR directa mostraron buenos límites de sensibilidad permitiendo la detección de una semilla infectada con 10 ufc en un lote de 2000 semillas sanas. Una de las ventajas que ofrece esta técnica es que permite obtener resultados en un día. Sin embargo, esta metodología no presentó buena reproducibilidad, ya que se obtuvieron resultados muy variables dependiendo del experimento y las semillas utilizadas (Tabla 4-7). En base a estos resultados, convendría continuar

evaluando diferentes métodos de extracción o un mayor número de lotes de semilla a los efectos de validar esta metodología. La separación inmuno-magnética también mostró buenos niveles de sensibilidad permitiendo la detección de una semilla infectada con 10^4 ufc en 2000 semillas, tanto cuando es combinada con qPCR como cuando se realiza el inmuno-aislamiento (Tabla 4-6). Este método presenta la ventaja de contar con el aislamiento del patógeno en un tiempo de 4 días, bastante más rápido que lo que se requiere en los medios semi-selectivos. Debido a esto, el inmuno-aislamiento de Cmm desarrollado por de Leon *et al.* (2006) es una de las técnicas sugeridas como alternativas para la detección de Cmm en semillas, aunque no hay protocolos validados (Oepp/Eppo, 2013). La IMS-qPCR es la técnica más rápida y sencilla en cuanto a aspectos prácticos, aunque no fue la que tuvo el mejor límite de sensibilidad en los lotes de semillas evaluados (Tabla 4-6). En este trabajo se describe por primera vez el método de separación inmuno-magnética seguido de detección por qPCR para la detección de Cmm en semillas y plantas de tomate.

La BIO-qPCR presentó los mejores niveles de sensibilidad, y los resultados se mantuvieron similares en las repeticiones, demostrando la reproducibilidad de esta técnica. La evaluación de sensibilidad mostró que es capaz de detectar hasta 10 ufc/ml de extracto tanto de semillas como de plantas. Si se compara con la sensibilidad de detección en extractos vegetales inoculados con Cmm, la adopción de esta estrategia permitió aumentar en 3 órdenes la sensibilidad. Una ventaja de esta técnica es que permite el aislamiento del patógeno a los 6 días de crecimiento de la muestra en medio semi-selectivo, requisito exigido en los protocolos de diagnóstico fitosanitario como control para el informe de muestras positivas.

La etapa de enriquecimiento que implica la BIO-qPCR es fundamental para el éxito del método. Es necesario contar con un medio de buena selectividad, donde el crecimiento de Cmm se vea favorecido frente a otros microorganismos presentes en las muestras vegetales. En este trabajo se evaluaron dos medios semi-selectivos recomendados en el protocolo ISF (Anexo II), observándose algunas diferencias entre ellos. En general, el medio SCM muestra mayor selectividad que el medio CMM1T, aunque el crecimiento de Cmm es más lento y el aspecto de las colonias es más mucoso, lo que dificulta la identificación cuando se encuentran presentes otros saprófitos. El medio CMM1T es menos restrictivo que el medio SCM, por lo que es común el desarrollo de otros microorganismos diferentes a Cmm.

Una de las desventajas que presenta la estrategia de BIO-qPCR utilizada es que el volumen de la muestra utilizado es muy bajo (aprox. el 1% del total). La concentración del extracto (diez veces) previo al enriquecimiento incrementa la probabilidad de detección cuando el patógeno se encuentra a bajas concentraciones. Sin embargo, la concentración de la muestra también lleva asociada el incremento de otros microorganismos asociados que podrían interferir en el proceso de detección. En este trabajo se observó que después de concentrar el extracto, la efectividad en la detección depende principalmente de dos factores: la carga y tipo de microorganismos asociados a cada muestra y el medio selectivo utilizado. Cuando se utilizó el medio SCM se observó un aumento en la sensibilidad de la técnica en 1 nivel de infección (Tabla 4-7). Por su parte, la alternativa de realizar el cultivo en medio líquido como estrategia para mejorar los tiempos de análisis, no presentó mejora en la sensibilidad del método (Tabla 4-7).

Más allá de las diferencias observadas mediante cada metodología, la sensibilidad de detección en todos los casos fue de una semilla infectada en un lote de 2000 semillas sanas. En este trabajo se evaluó la estrategia de contaminar lotes de semillas con distinto nivel de infección, con el objetivo de brindar una aproximación a una situación real, y aportar valores más informativos sobre la sensibilidad de las diferentes metodologías. Está reportado que las semillas infectadas de manera natural presentan un nivel de infección entre 10^3 - 10^4 ufc/semilla (Hadas *et al.*, 2005), sin embargo este dato depende de muchos factores por lo que puede resultar muy variable. Los resultados de los análisis de control fitosanitario en lotes de semillas están condicionados por dos elementos: por un lado si la muestra seleccionada contiene alguna semilla contaminada y por otro, si la técnica utilizada es capaz de detectar dicha contaminación (De León *et al.*, 2011).

La estrategia experimental adoptada en este trabajo, implicó la utilización de semillas de tomate infectadas de manera artificial. El método de inoculación utilizado, no representa una situación real, ya que de forma natural el patógeno también puede alcanzar los tejidos internos de la semilla. Sin embargo, de esta manera se logró obtener semilla infectada con niveles bastante homogéneos de contaminación, importante para determinar de forma más precisa de la sensibilidad de los métodos de detección evaluados. También, se verificó la transmisión de la bacteria de estas semillas infectadas de manera artificial a la planta, hasta en semillas infectadas con 10^2 o más ufc/semilla. Este resultado también valida la estrategia utilizada y resalta la importancia de contar con métodos capaces detectar niveles bajos de infección en muestras de semillas.

Los protocolos de análisis de semillas adoptan el tamaño de muestra estándar de 10000 semillas recomendado por ISTA (*International Seed Testing Association*), aunque puede ser dividida en submuestras de 2000 semillas, facilitando así el manejo de las mismas. Por este motivo, en este trabajo se utilizaron lotes de 2000 semillas (ISF, 2015). Una de las primeras variables a tener en cuenta para los análisis es la representatividad de las muestras con respecto al tamaño total del lote. En cuanto a esto, existen algunas limitaciones prácticas; por ejemplo, los lotes de semillas deben provenir todas del mismo campo o sitio de producción, aunque en la práctica muchas veces se procede a la mezcla de diferentes lotes donde la distribución de las semillas infectadas está lejos de ser uniforme. En ocasiones esta práctica dificulta las labores de análisis haciendo más difícil la detección de los patógenos contenidos en ese material vegetal (De León *et al.*, 2011).

Cada método de detección tiene sus propias ventajas y desventajas. Los métodos serológicos son rápidos, pero pueden dar lugar a falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otros microorganismos presentes comúnmente en las muestras vegetales (Jacques *et al.*, 2012). Por su parte los métodos moleculares (como PCR) pueden dar lugar a falsos negativos por la presencia de inhibidores de PCR presentes en las muestras (L. De León *et al.*, 2008). La eficacia del método depende en gran medida de la calidad de la muestra problema (por ejemplo, microorganismos asociados), y la elección del mismo también va a depender del tiempo que se requiera para obtener el resultado. Además, algunos métodos son válidos para realizar la identificación del patógeno, pero no para detectarlo en muestras complejas debido a la necesidad de detectar bajos niveles de contaminación (Sen *et al.*, 2015). Los protocolos de detección recomendados por EPPO e ISF, utilizan los sistemas de detección por qPCR como herramientas de identificación de Cmm (Oepp/Eppe, 2013; ISF, 2015). Tienen como requisito el aislamiento del patógeno a partir de las muestras de semillas, pero dado que las muestras de semillas pueden estar muy contaminadas por otros microorganismos saprófitos, el aislamiento puede resultar muy dificultoso y laborioso. En este trabajo, se optimizó un protocolo de detección, como herramienta de diagnóstico más que de identificación. Justamente este enfoque es el que nos lleva a la necesidad de contar con métodos de buena sensibilidad capaces de detectar bajas concentraciones del patógeno en las muestras problema.

En este trabajo, también se realizó la evaluación de las diferentes metodologías para su aplicación a la detección de Cmm en plantas de tomate asintomáticas. Este es un tema bastante menos estudiado en bibliografía, ya que en el caso de Cmm, las semillas son el principal blanco de diagnóstico. Burokiené

(2006) optimizó un protocolo de BIO-PCR para la detección temprana de Cmm en plántulas de tomate, donde el límite de detección de la técnica fue de 10^2 ufc/ml. En esta Tesis, los resultados de detección de Cmm en planta nos permitieron extrapolar la utilidad de las metodologías utilizadas en muestras de semillas: IMS-qPCR, qPCR directa y BIO-qPCR. Mediante estas metodologías fue posible la detección de Cmm *in planta* hasta en plantas provenientes de semillas infectadas con 10^2 ufc. A su vez, también se detectó Cmm en muestras de cotiledones, lo que podría resultar en una buena estrategia de muestreo para análisis en viveros ya que no se realiza la destrucción de la planta.

En suma, en este trabajo se confirmó que distintas metodologías basadas en PCR a tiempo real pueden ser utilizadas en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas y plantas de tomate. Los resultados obtenidos pueden servir como base para el desarrollo de nuevos métodos de detección de este importante patógeno en muestras que contribuyen a su diseminación.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

El cancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) ha adquirido en los últimos años gran importancia en nuestro país, siendo un riesgo importante para el sistema productivo. Esta Tesis estuvo enfocada a generar conocimiento sobre este patógeno que contribuya al establecimiento de estrategias efectivas de control. A continuación se resumen las principales conclusiones de este trabajo.

Se generó una colección de cepas de Cmm provenientes de diversas zonas y años de producción de Uruguay. Se realizó un relevamiento tanto en la zona Sur como Norte del país, pudiendo aislar el patógeno a partir de muestras de plantas sintomáticas. Esta colección se encuentra incluida dentro de la colección MAI (Microorganismos de Interés Agrícola e Industrial) que se conserva en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química. Además, todas las cepas están caracterizadas en base a la presencia de genes específicos de la subespecie y también fue verificada su patogenicidad en plantas de tomate susceptibles.

La técnica *Multilocus Sequence Analysis and Typing* resultó una potente herramienta para discriminar entre las diferentes cepas de Cmm presentes en Uruguay. Cada cepa quedó caracterizada por un secuenciotipo dado por los alelos asignados a cada uno de los 5 *loci* analizados (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk* y *recA*). A su vez, la técnica permitió la comparación con otras cepas procedentes de diversas partes del mundo estableciendo las relaciones entre las mismas.

La mayoría de las cepas identificadas por su secuenciotipo fueron encontradas en ambas zonas de producción de tomate de Uruguay (Sur y Norte), determinándose que no hay relación con el origen geográfico ni temporal de los aislamientos.

Se encontró una importante diversidad genética entre las cepas aisladas en Uruguay. Esto puede atribuirse a la ocurrencia de sucesivas introducciones del patógeno a nuestro país a través del comercio internacional de semillas, como consecuencia directa de la importación. La mayoría de los aislamientos

uruguayos fueron identificados como nuevos secuenciotipos, ya que no habían sido identificados previamente en otros estudios.

Dado que el control preventivo es la mejor estrategia para lograr un control efectivo de esta enfermedad, en este trabajo se evaluaron varios métodos para la detección del patógeno en muestras de semillas y plantas asintomáticas con el fin de aportar herramientas que puedan ser aplicables al control fitosanitario de material de propagación. La técnica seleccionada para llevar a cabo la detección de Cmm, fue la PCR a tiempo real (qPCR), la cual ha demostrado ser una herramienta confiable, sensible y específica para este fin.

Los sistemas de qPCR actualmente recomendados como métodos de identificación de Cmm en los protocolos internacionales de análisis de semillas (*Ptssk* y *MVS21*), mostraron su potencial como herramientas de detección de Cmm. Sin embargo, el sistema de *Luo et al.* (2008) no resulta adecuado para este fin ya que la sonda no hibrida de manera adecuada con todas las cepas de Cmm, dando lugar a baja especificidad en la reacción. Este es el primer trabajo donde estos sistemas de qPCR se evalúan como herramientas para la detección directa de Cmm en muestras vegetales, ya que los trabajos previos los utilizan para la identificación del patógeno luego de su aislamiento en cultivo.

La combinación de estos sistemas de qPCR con otras técnicas como la separación inmuno-magnética, BIO-qPCR, o extracción de ADN mostraron muy buenos niveles de sensibilidad para la detección del patógeno en muestras vegetales. En particular, las técnicas de BIO-qPCR y qPCR con extracción de ADN fueron capaces de detectar lotes de 2000 semillas sanas conteniendo 1 semilla infectada con $10 \cdot 10^3$ ufc de Cmm, con variaciones dependiendo del lote utilizado. Por su parte, la técnica de IMS-qPCR fue capaz de detectar lotes de 2000 semillas sanas con 1 semilla infectada con 10^4 ufc de Cmm. Los resultados obtenidos en esta tesis permiten sugerir estos métodos como alternativas a tener en cuenta para el análisis de semillas de tomate en Uruguay.

Finalmente, las evaluaciones de las metodologías de qPCR realizadas en muestras de plantas asintomáticas permitieron demostrar la aplicabilidad de estas técnicas sobre otro tipo de muestra que contribuye a la diseminación del patógeno. Estos resultados preliminares sirven como punto de partida para diseñar un protocolo de detección de Cmm a nivel de viveros.

5.2 PERSPECTIVAS

Actualmente, gran parte de la semilla de tomate que se utiliza en el país es importada y es sometida únicamente a controles de germinación y pureza (INASE). Por otra parte, en INIA se han desarrollado variedades nacionales de tomate para industria y se está trabajando en el desarrollo cultivares nacionales de tomate de mesa mejor adaptados al ambiente productivo local. Estos avances generan el desafío de proporcionar semilla de calidad de los cultivares nacionales liberados. En INASE se ha comenzado a trabajar en la certificación de semilla y en el registro de variedades para los distintos rubros hortícolas. La implementación de un sistema nacional de certificación de semilla de tomate en el corto plazo está enmarcada dentro del Plan Estratégico Quinquenal de esta institución. Dado que la semilla es el principal vehículo de diseminación de Cmm, es de interés poder implementar un sistema de control que permita determinar la presencia del patógeno en lotes de semilla, así como en bloques de producción de semilla híbrida nacional.

Una perspectiva que surge de este trabajo, es la implementación de un protocolo de detección para la detección de Cmm en semillas habiendo validado su uso sobre lotes de semilla nacional de forma de asegurar su adecuación para el control fitosanitario de semillas. Una vez validados los protocolos podrán ser transferidas a INASE para su aplicación a la evaluación de la calidad fitosanitaria de semilla y la posibilidad de certificación de los lotes. La posibilidad de aplicar sistemas de detección de Cmm eficientes a costos razonables contribuirá a mejorar la calidad de la semilla adquirida por los productores rurales, disminuyendo el impacto que tiene esta enfermedad para el sector hortícola nacional. INASE cuenta actualmente con el equipamiento necesario y personal especializado para llevar a cabo esta transferencia y los resultados de este trabajo podrán ser tomados como base para la implementación de un protocolo de detección de Cmm.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la detección de Cmm en plantas asintomáticas continuarán siendo evaluados, ya que la detección de Cmm en viveros también resulta útil como estrategia preventiva para el control de la enfermedad. Sin embargo, quedan pendientes varios aspectos a profundizar respecto a este tema, como el muestreo a realizar, sobre qué parte de la planta realizar la detección, etc. Como perspectiva en este tema, en primer lugar, se plantea estudiar la distribución y localización de la bacteria en plantas jóvenes obtenidas a partir de semillas infectadas. Este aspecto podría llevarse a cabo mediante varias formas, por ejemplo, mediante cuantificación por qPCR de la

bacteria en distintos tejidos de la planta (cotiledones, tallo, hojas). Otra alternativa es estudiar la localización mediante la utilización de células de la bacteria marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP) o mediante inmuno-fluorescencia (IF). Esta información podrá ser utilizada para definir la mejor estrategia de muestreo teniendo en cuenta el tejido a analizar, la edad de las plantas, el nivel de sensibilidad de la técnica, etc. Los métodos desarrollados también podrán ser transferidos a laboratorios privados interesados en implementar estas herramientas como servicio para viveros y productores.

En cuanto a las cepas de Cmm identificadas en Uruguay, se realizará un estudio comparativo de las mismas para evaluar si existen diferencias en su nivel de agresividad, sobrevivencia en restos vegetales, y otras características fenotípicas de relevancia para el manejo de la enfermedad. Finalmente, se espera continuar con el relevamiento de cepas de Cmm a partir de brotes de cancro bacteriano en las distintas zonas de producción del país. Estos nuevos aislados podrán ser incorporados a la colección ya existente y caracterizados utilizando las herramientas optimizadas en esta tesis. La tipificación de nuevos aislados mediante la técnica MLSA-MLST puede ser de utilidad para realizar futuros estudios epidemiológicos enfocados a determinar el origen de infección de los nuevos brotes, así como la eventual introducción de nuevas variantes del patógeno en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G.N.** (2005) Plant Pathology 5th edition., University of Florida. Elsevier Academic Press.
- Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., et al.** (2010) PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology* **100**, 208–15.
- Alvarez, A.M.** (2004) Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 339–66.
- Bach, H.-J., Jessen, I., Schloter, M. and Munch, J.C.** (2003) A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *J. Microbiol. Methods* **52**, 85–91.
- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., et al.** (2008) Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol.* **146**, 1797–809.
- Banchero, L., Arboleya, J., Campelo, E., González, P., Maeso, D. y Paullier, J.** (2008) Normas para la producción integrada de Tomate a campo (Zona Sur). Consultado 10 de mayo de 2016. Disponible en http://www.inia.org.uy/online/site/base_npi.php?bus=Tomate+&base=76. Fecha de acceso: 20 de mayo de 2016
- Barda, O., Shalev, O., Alster, S., Buxdorf, K., Gafni, A., Levy, M. and Pathology, P.** (2015) *Pseudozyma aphidis* Induces Salicylic-Acid-Independent Resistance to *Clavibacter michiganensis* in Tomato Plants. *Am. Phytopathol. Soc.*, 621–626.
- Baysal, Ö., Mercati, F., İkten, H., Yıldız, R.Ç., Carimi, F., Aysan, Y. and Teixeira da Silva, J. a.** (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **75**, 113–119.
- Berendsen, S.M.H., Koenraadt, H., Woudt, B. and Oosterhof, J.** (2011) The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *APS-IPPC Meet.*
- 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.
- Burokienė, D.** (2006) Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensi* in tomato seedlings. *Agron. Res.* **4**, 151–154.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., et al.** (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622.

- Chalupowicz, L., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K., Sessa, G. and Barash, I.** (2010) Sequential Expression of Bacterial Virulence and Plant Defense Genes During Infection of Tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **100**, 252–261.
- Chalupowicz, L., Zellermann, E., Fluegel, M., et al.** (2012) Colonization and Movement of GFP-Labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* During Tomato Infection. *Phytopathology* **102**, 23–31.
- Cho, M.S., Lee, J.H., Her, N.H., Kim, C., Seol, Y.-J., Hahn, J.H., Baeg, J.H., Kim, H.G. and Park, D.S.** (2012) A quantitative and direct PCR assay for the subspecies-specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* based on a ferredoxin reductase gene. *J. Microbiol.* **50**, 496–501.
- Cook, J. and Baker, K.** (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens., St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Costa, J.** (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**, 299–305.
- Croce, V.** (2012) *Desarrollo de nuevos métodos moleculares para la detección de la bacteria fitopatogena Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis causante del cancro bacteriano en tomate.* Tesis Lic en Bioquímica, Universidad de la República
- Croce, V., Pianzola, M.J., Durand, K., Gonzalez-Arcos, M., Jacques, M.A. and Siri, M.I.** (2016) Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *Eur. J. Plant Pathol.* **144**, 1–13.
- De Boer, M., Van Der Sluis, I., Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M.** (1999) Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 201–210.
- De León, L., Rodríguez, A., Llop, P., López, M.M. and Siverio, F.** (2009) Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathol.* **58**, 862–871.
- De León, L., Rodríguez, A., López, M.M. and Siverio, F.** (2008) Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 776–786.
- De León, L., Siverio, F., López, M. and Rodríguez, A.** (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Dis.* **95**, 1328–1338.
- 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.

- De Leon, L., Siverio, F. and Rodriguez, A.** (2006) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods* **67**, 141–149.
- Dorak, M.T.** (2006) Real-time PCR, *Taylor and Francis Group*.
- Dreier, J., Bempohl, A. and Eichenlaub, R.** (1995) Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **85**, 462–468.
- Dreier, J., Meletzus, D. and Eichenlaub, R.** (1997) Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **10**, 195–206.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health)** (2014). Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* EFSA Journal 2014; 12(6):3721, 29 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3721. Disponible en: www.efsa.europa.eu/efsajournal. Fecha de acceso: 20 de mayo de 2016
- Elenkov** (1965) Die Selektion von tomaten auf resistenz gegen die bakterienwelke. *Int Z Landwirtschaft*, 594–597.
- Emmatty, D.A. and John, C.A.** (1973) Comparison of yield loss to bacterial canker of tomato in a resistant and a susceptible variety. *Plant Dis.* **57**, 787–788.
- FAOSTAT** (2015) Datos disponibles en http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/S. Fecha de acceso 13 de abril de 2016.
- Fatmi, M. and Schaad, N.** (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 Pathol.* **51**, 149–154.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P. and Spratt, B.G.** (2004) eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J. Bacteriol.* **186**, 1518–1530.
- Flügel, M., Becker, A., Gartemann, K.-H. and Eichenlaub, R.** (2012) Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *J. Biotechnol.* **160**, 42–54.
- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., et al.** (2008) The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* **190**, 2138–49.
- Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. and Burger, A.** (2003) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.* **106**, 179–191.

- Gitaitis, R., Beaver, R. and Voloudakis, A.** (1991) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis.* **75**, 834–838.
- Gleason, M., Gitaitis, R. and Ricker, M.** (1993) Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Dis.* **77**, 1069–1076.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O.** (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**, 307–21.
- Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefen, T. and Manulis, S.** (2005) Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol.* **54**, 643–649.
- Harper, S.J., Ward, L.I. and Clover, G.R.G.** (2010) Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* **100**, 1282–8.
- Hausbeck, M.K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R. and Fulbright, D.W.** (2000) Effect of Bactericides on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomatoes in the Greenhouse and on Disease Development and Crop Yield in the Field. *Phytopathology* **90**, 38–44.
- Hillis, D.M. and Bull, J.J.** (1993) An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Syst. Biol.* **42**, 182–192.
- Ialacci, G.M., Bella, P., Licciardello, G., Strano, C.P., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., La Rosa, R. and Catara, V.** (2015) Clonal populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* are responsible for the outbreaks of bacterial canker in greenhouse tomatoes in Italy. *Plant Pathol.*
- ISF** (2015). “Method for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato Seed”. Disponible en <http://www.worldseed.org/our-work/phytosanitary-matters/seed-health/ishi-veg/>. Fecha de acceso: 11 de mayo de 2016
- Jacques, M.-A., Durand, K., Orgeur, G., et al.** (2012) Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 8388–402.
- Jaramillo, J.N., Rodriguez, V.P., Guzman A., M., Zapata, M. and Rengifo M., T.** (2007) *Manual Técnico: Buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas*. FAO. 316 p.
- Johnson, K.L. and Walcott, R.R.** (2012) Progress Towards a Real-time PCR Assay for the Simultaneous Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Pepino mosaic virus* in Tomato Seed. *J. Phytopathol.* **160**, 353–363.

- Kawaguchi, A. and Tanina, K.** (2014) Genetic groups of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identified by DNA fingerprinting and the effects of inoculation methods on disease development. *Eur. J. Plant Pathol.* **140**, 399–406.
- Kawaguchi, A., Tanina, K. and Inoue, K.** (2010) Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathol.* **59**, 76–83.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., et al.** (2008) Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**, 463–475.
- Koenraad, H., Vliet, A. van, Neijndorff, N. and Woudt, B.** (2009) Improvement of semi-selective media for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in seeds of tomato. *Phytopathology* **99**, S66.
- Kubota, R., LaBarre, P., Singleton, J., Beddoe, A., Weigl, B.H., Alvarez, A.M. and Jenkins, D.M.** (2011) Non-Instrumented Nucleic Acid Amplification (NINA) for Rapid Detection of *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2. *Biol. Eng. Trans.* **4**, 69–80.
- Kuriyama, T. and Kuniyasu, K.** (1974) Studies on the breeding of disease resistant tomato by interspecific hybridization, 3: On the breeding of a new tomato line resistant to bacterial canker caused by *Corynebacterium michiganense*. *Bull. Veg. Ornam. Crop. Res. Station. Ser. A.*
- Lane, D.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., eds), pp. 115–175. New York: John Wiley and Sons.
- Lasa, C.I., Abiko, K., Tezuka, N., Inaba, T. and García, S.** (1981) Algunas enfermedades que afectan actualmente los cultivos de hortalizas en Uruguay. *Investig. Agronómicas* **2**, 97–100.
- Lee, I.M., Bartoszyk, I.M., Gundersen-Rindal, D.E. and Davis, R.E.** (1997) Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16s rRNA gene sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2631–6.
- Lelis, F.M.V., Czajkowski, R., Souza, R.M. de, Ribeiro, D.H. and Van der Wolf, J.M.** (2014) Studies on the colonization of axenically grown tomato plants by a GFP-tagged strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Eur. J. Plant Pathol.* **139**, 53–66.
- Liao, X., Zhu, S., Zhao, W., Luo, K. and Qi, Y.** (2003) Detection and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by real-time fluorescent PCR. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **43**, 626–34.
- Louws, F.J., Bell, J., Medina-Mora, C.M., Smart, C.D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. a, Hausbeck, M.K., Bruijn, F.J. de and Fulbright, D.W.** (1998) rep-PCR-Mediated Genomic Fingerprinting: A Rapid and Effective Method to Identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* **88**, 862–8.
- Luo, L.X., Walters, C., Bolkan, H., Liu, X.L. and 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 Pathol.* **57**, 332–337.

- Maeso, D. and Walasek, W.** (2012) Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Agrociencia Uruguay* **16**, 134–142.
- Maeso, D., Fernández, A. y Walasek, W.** (2015b) Evaluación de productos a base de *Bacillus subtilis*, inductores de resistencia y otros aplicados a follaje para el control del cancro bacteriano del tomate, temporada 2014-2015. Serie Actividades de Difusión N° 756, INIA Las Brujas.
- Maeso, D., Walasek, W. y Fernández A.** (2015a) Evaluación de desinfectantes para prevenir la transmisión de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate mediante tijeras de poda. Serie Actividades de Difusión N° 756, INIA Las Brujas.
- Maiden, M., Bygraves, J., Feil, E., et al.** (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3140–3145.
- MGAP/DIEA.** 2015. Anuario estadístico agropecuario 2015. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/>. Fecha de acceso: 13 de abril de 2016
- MGAP/DIGESSAA.** 2016. Consulta de productos fitosanitarios. Disponible en <https://www.mgap.gub.uy/profit/pantalla.aspx>. Fecha de acceso: 29 de junio de 2016.
- MGAP/DIGESSAA.** 2010. Listado de plagas cuarentenarias para Uruguay. Disponible en <http://www.pv.fagro.edu.uy/> Fecha de acceso: 25 de abril de 2016
- Milijašević-Marčić, S., Gartemann, K.-H., Frohwitter, J., Eichenlaub, R., Todorović, B., Rekanović, E. and Potočnik, I.** (2012) Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *Eur. J. Plant Pathol.* **134**, 697–711.
- Nazari, F., Niknam, G.R., Ghasemi, a., Taghavi, S.M., Momeni, H. and Torabi, S.** (2007) An Investigation on Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in North and North West of Iran. *J. Phytopathol.* **155**, 563–569.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T.** (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, E63.
- Nunney, L., Elfekih, S. and Stouthamer, R.** (2012) The importance of multilocus sequence typing: cautionary tales from the bacterium *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **102**, 456–60.
- Oepp/Eppo** (2013) PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *OEPP/EPPO Bull.* **43**, 46–67.
- Olivier, V., Baloché, A. and Drouin, A.** (2010) Internal methods comparison study and inter-laboratory study on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds1. *Bull. OEPP/EPPO*, 248–256.
- Ozdemir, Z.** (2005) Development of a Multiplex PCR Assay for Current Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Plant Pathol. J.* **4**, 133–137.

- Pastrik, K.H. and Rainey, F.A.** (1999) Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by Polymerase chain reaction- based techniques. *J. Phytopathol.* **147**, 687–693.
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E. and Crandall, K. a** (2013) Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* **16**, 38–53.
- Quesada-Ocampo, L.M., Landers, N.A., Lebeis, A.C., Fulbright, D.W. and Hausbeck, M.K.** (2012) Genetic Structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Populations in Michigan Commercial Tomato Fields. *Plant Dis.* **96**, 788–796.
- Quintero-Vásquez, G.A., Bazán-Tejeda, M.L., Martínez-Peñafiel, E., Kameyama-Kawabe, L. and Bermúdez-Cruz, R.M.** (2013) Multiplex PCR to detect four different tomato-infecting pathogens. *Folia Microbiol. (Praha).* **58**, 269–76.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R.** (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496–7.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 3, CSHL Press.
- Schaad, N., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D.** (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Dis.* **83**, 1095–1100.
- Schaad, N., Jones, J.B. and Chun, W.** (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J.** (1995) A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* **85**, 243–248.
- Schaad, N.W., Opgenorth, D. and Gauth, P.** (2002) Real-Time Polymerase Chain Reaction for One-Hour On-Site Diagnosis of Pierce's Disease of Grape in Early Season Asymptomatic Vines. *Phytopathology* **92**, 721–8.
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., Wolf, J., Visser, R.G.F. and Heusden, a. W.** (2012) Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica* **190**, 309–317.
- Sen, Y., Wolf, J. van der, Visser, R.G.F. and Heusden, a. W. van** (2015) Bacterial Canker of Tomato: Current Knowledge of Detection, Management, resistance and Interactions. *Plant Dis.* **99**, 4–13.
- Sharabani, G., Manulis-Sasson, S., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Chalupowicz, L. and Shtienberg, D.** (2013) The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathol.* **62**, 578–586.
- Soylu, S., Baysal, Ö. and Soyly, E.M.** (2003) Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Sci.* **165**, 1069–1075.

- Tamura, K.** (2011) MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distances, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
- Tancos, M.A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S. and Smart, C.D.** (2013) Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6948–6957.
- Tancos, M.A., Lange, H.W. and Smart, C.D.** (2015) Characterizing the Genetic Diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Population in New York. *Phytopathology* **105**, 169–179.
- Temple, T.N. and Johnson, K.B.** (2011) Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of *Erwinia amylovora* on Pear and Apple Fruit Flowers. *Plant Dis.* **95**, 423–430.
- Umesha, S.** (2006) Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Prot.* **25**, 375–381.
- Valasek, M.A.** (2005) The power of real-time PCR. *AJP Adv. Physiol. Educ.* **29**, 151–159.
- Van Heusden, a. W., Koornneef, M., Voorrips, R.E., Brüggemann, W., Pet, G., Vrielink-van Ginkel, R., Chen, X. and Lindhout, P.** (1999) Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor. Appl. Genet.* **99**, 1068–1074.
- Veena, M.S. and Vuurde, J.W.L. van** (2002) Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato. *J. Microbiol. Methods* **49**, 11–7.
- Vega, E., Ureta, T. and Campos, G.** (2001) Aumento de la incidencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal de la enfermedad cancro bacteriano del tomate, en el cultivo de tomate de la última temporada. *Simiente* **71**, 33–73.
- Walcott, R.R. and Gitaitis, R.** (2000) Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* **84**, 470–477.
- Waters, C. and Bolkan, H.** (1992) An improved selective medium and method of extraction for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Phytopathology* **82**, 1072.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. and Stead, D.E.** (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2853–2858.
- Wu, Y.D., Chen, L.H., Wu, X.J., Shang, S.Q., Lou, J.T., Du, L.Z. and Zhao, Z.Y.** (2008) Gram stain-specific-probe-based real-time PCR for diagnosis and discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2613–2619.
- Xu, X., Miller, S. a, Baysal-Gurel, F., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R. and Rajashekara, G.** (2010) Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3978–88.

- Yasuhara-Bell, J., Kubota, R., Jenkins, D.M. and Alvarez, A.M.** (2013) Loop-mediated amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* micA gene is highly specific. *Phytopathology* **103**, 1220–1226.
- Zaluga, J., Stragier, P., Vaerenbergh, J. Van, Maes, M. and Vos, P. De** (2013) Multilocus variable-number-tandem-repeats analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. *BMC Microbiol.* **13**, 126.
- Zhang, Y., Yang, W., Li, Y., Liu, D. and 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**, 140–145.
- Zhao, W., Chen, H., Zhu, S., Xia, M. and Tan, T.** (2007) One-step detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato seeds using a taqman probe. *J. Plant Pathol.* **89**, 349–351.

Anexo I

En este apartado se adjunta el artículo “*Multilocus Sequence Typing reveals high variability among Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strains affecting tomato crops in Uruguay*” publicado en la revista *European Journal of Plant Pathology* en enero de 2016. A continuación del artículo se encuentra el material suplementario referido en el mismo.



Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay

Valentina Croce · María Julia Pianzola · Karine Durand ·
Matías González-Arcos · Marie-Agnès Jacques · María Inés Siri

Accepted: 17 August 2015 / Published online: 28 September 2015
© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2015

Abstract Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* (Cmm) has been a threat to tomato production in Uruguay for several years. In this study, 39 Cmm strains were collected from several outbreaks and production areas in Uruguay, and were identified by molecular assays and pathogenicity tests on a susceptible cultivar of tomato. In addition, a TaqMan assay targeting a putative two-component system sensor kinase gene demonstrated good specificity with all strains tested and gave no false negative results. The first epidemiological study of Cmm in this country was carried out in order to elucidate the origin of outbreaks and sources of infection and dissemination of the pathogen. Strains from Uruguay showed high genetic diversity based on a Multi Locus Sequence Typing analysis of five housekeeping genes. This approach revealed 36 sequence types (STs) within a worldwide collection of

108 Cmm strains. Ten STs correspond to strains solely isolated in Uruguay, including eight novel STs for the subspecies *michiganensis*. This high diversity reflects the introduction of new strains from different origins that most probably results from seed importation. This study provides relevant information about the distribution and origin of strains causing bacterial canker in Uruguay and will pave the way for the establishment of preventive measures to control the disease.

Keywords Bacterial canker · Epidemiology · Genetic diversity · Seed transmission

Abbreviations

Cmm *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
ST Sequence Type
CC Clonal complex

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10658-015-0738-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

V. Croce · M. J. Pianzola · M. I. Siri (✉)
Laboratorio de Microbiología Molecular, Cátedra de
Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de
Química, Universidad de la República, CP 11800 Montevideo,
Uruguay
e-mail: msiri@fq.edu.uy

K. Durand · M.-A. Jacques
INRA, UMR1345 IRHS Institut de Recherches en Horticulture et
Semences, F-49071 Beaucouzé, France

M. González-Arcos
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Salto
Grande, Salto, Uruguay

Introduction

Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) is the most important bacterial disease of tomato (*Solanum lycopersicum*) constituting a worldwide threat to the tomato production (Gleason et al. 1993). Since its first description in Michigan, USA in 1909 (Smith 1910), this disease has been characterized by sporadic occurrence causing severe outbreaks in many countries (Strider 1969). The disease is widely distributed and has been reported in the five continents (EFSA 2014).

Recently, outbreaks were reported mostly from Europe and Asia, but also from Latin America and Africa (De León et al. 2011). In Uruguay, tomato bacterial canker was first reported by Lasa et al. (1981) and since then it has emerged sporadically in several fields and greenhouses in the country, although not being formally reported. In recent years, severe outbreaks of the disease occurred in Uruguay, causing substantial economic losses to growers in the two major tomato production areas in the country (Northern and Southern).

Cmm penetrates a plant through wounds or natural openings, reaches the xylem, and develops a massive systemic infection causing the wilting of the whole plant and its death. Once the disease is established in the crop it is very difficult to control and cultural practices, such as eradication of infected plants and disinfection of materials, are recommended (De León et al. 2011; EFSA 2014). Cmm can survive on plant debris in soil for 2–3 years (Fatmi and Schaad 2002) being a second source of inoculum. Although sources of resistance to bacterial canker have been reported (Sen et al. 2012; van Heusden et al. 1999), there is no resistant tomato cultivar available nowadays (Sen et al. 2015). Other control methods, such as chemical (De León et al. 2008) and biological treatments (Umesha 2006) have been investigated, but no successful control of the disease in tomato has been found yet. Currently, prevention is the most efficient control of bacterial canker, based on the use of healthy seeds and seedlings (De León et al. 2011; EFSA 2014).

At present, this bacterium is a quarantine organism in the European Union, listed as an A2 quarantine pest (EPPO 2013). In Uruguay, most tomato seeds are imported each year from several companies that have their production centers in different countries (i.e. USA, France, Thailand, Italy, China) and phytosanitary certificates are only required for quarantine pathogens. However, no sanitary measures are applied for other pathogens of agricultural importance, as is the case for bacterial canker (DGSA-MGAP 2009). Several nurseries import seed lots, producing millions of tomato seedlings that are planted in Uruguayan fields. Thus, information regarding the introduction and subsequent spread of bacterial canker is needed. Generally, it is assumed that most outbreaks are caused by infected seeds or seedlings distributed by local nurseries, but the real origin of the disease outbreaks remains unknown.

Characterizing the population structure and genetic diversity of plant pathogens is required to determine possible inoculum sources and design effective disease

management strategies. A number of methods have been developed for the identification and characterization of Cmm (Quesada-Ocampo et al. 2012). Previous studies have shown that among DNA-based typing procedures, Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Kleitman et al. 2008), repetitive sequence based PCR (rep-PCR) (Kawaguchi et al. 2010) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)-PCR fingerprints (Baysal et al. 2011) are suitable for epidemiological studies of Cmm. However, these techniques are time-consuming and the reproducibility of the results among laboratories is low. Multi Locus Sequence Analysis and Typing (MLSA and MLST) developed by Maiden et al. (1998) has proven to be quick, efficient and reproducible approaches for determination of genetic diversity of Cmm strains (Milijašević-Marčić et al. 2012; Jacques et al. 2012). While MLSA relies on the comparison of partial DNA sequences of each gene or of concatenated sequences among strains, MLST is based on the analysis of the combination of alleles at each locus, defining a sequence type (ST). Thus, MLSA provides a framework for species definition and MLST is used to type strains at an infraspecific level. A few MLST schemes have been developed for several pathogens (Almeida et al. 2010; Maiden et al. 1998; Nunney et al. 2012). This technique allows for the unambiguous characterization of isolates from infectious agents using sequences of internal fragments of several housekeeping genes.

Despite severe outbreaks documented in Uruguay in the last years, characterization and diversity studies of Cmm isolates are lacking. There is no data relating to the origin, dissemination and genetic diversity of Cmm strains in Uruguay. Genetic pathogen mapping is an useful tool to follow the flow of new inoculum sources in a country (Baysal et al. 2011). Therefore, the aims of this study were: i) to generate a local collection of Cmm isolates, ii) to characterize the population of Cmm in Uruguay by MLSA and MLST, iii) to compare its genetic variability with other Cmm strains isolated in other countries, and iv) to determine the main inoculum sources for bacterial canker in Uruguay.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Samples of infected tomato plants were collected from several fields and greenhouses of the two major tomato-

growing areas in Uruguay in 2010–2012. Strains were isolated from stems of tomato plants showing disease symptoms in Nutrient Broth Yeast (NBY) agar medium (per liter: nutrient broth 8 g, yeast extract 2 g, potassium phosphate dibasic 2 g, potassium phosphate monobasic 0.5 g, pH 7.2 and agar 15 g) with previous disinfection of the material with hypochlorite at 1 %. Bacteria were grown on NBY at 28 °C for 48–72 h, and conserved at –80 °C in 10 % glycerol for long-term storage. A total of 39 isolates from Uruguay were used in this study (Table 1). Isolates from 1997 to 2008 and some of 2012 were provided by the Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Uruguay.

Pathogenicity tests

All strains were inoculated on tomato seedlings *S. lycopersicum* cv. Elpida. The stems of 4 week-old plants were inoculated at the first true leaf with a toothpick that had been dipped in a fresh colony. Plants were incubated in a growth chamber at 28 °C and symptoms were recorded during 22 days. Four plants were inoculated per strain and water was used as the mock control.

PCR-based assays for identification of Cmm

Total DNA from the 39 Cmm strains was extracted according to Sambrook and Russell (2001). The quantity of extracted DNA was measured by Nanodrop ND-100 (Nanodrop Technologies) and final DNA concentrations were adjusted to 10 ng μl^{-1} (by dilution) and stored at –20 °C before use.

For identification of the strains, the pair of primers PSA 4/R targeting the Intergenic Spacer region (Patrik and Rainey 1999) and the universal Eub 27 F/1492R targeting the 16S rRNA were used (Giovannoni 1991) (Table 2). Amplification of the 16S rRNA gene was performed using 25 μl reaction mixtures containing 1X Taq buffer, 2 mM of MgCl_2 , 200 μM of each dNTP, 0.4 μM of each primer, 0.4 U of Taq polymerase (Invitrogen), and 20 ng of DNA template. The amplification program included an initial denaturation at 94 °C for 3 min; 30 cycles of denaturation (94 °C, 60 s), annealing (55 °C, 60 s), and extension (72 °C, 60 s); and a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were checked by electrophoresis in 1.5 % agarose in 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) and afterwards stained using ethidium bromide. The 16S rRNA products were sequenced with reverse and forward primers

Table 1 List of isolates of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from Uruguay used in this study

Isolate	Origin of isolation		ST
	Location	Year	
1001	Salto	2012	3
1002	Salto	2012	5
1003	Salto	2012	3
1004	Salto	2012	3
1005	Salto	2012	3
1006	Salto	2012	5
1007	Salto	2012	5
1008	Salto	2012	5
1009	Salto	2012	6
1010	Salto	2012	3
1011	Salto	2012	3
1012	Salto	2012	3
1013	Salto	2012	4
1014	Salto	2012	3
1015	Salto	2012	3
1016	Salto	2012	4
1017 ^a	San José	2012	5
1018 ^a	San José	2012	10
1019 ^a	Montevideo	2012	5
1020 ^a	Montevideo	2012	1
1022 ^a	Artigas	1997	7
1023 ^a	Artigas	1997	8
1024 ^a	Artigas	1997	6
1025 ^a	Montevideo	2005	2
1026 ^a	Canelones	1999	9
1027 ^a	Canelones	2008	5
1028	Salto	2011	1
1029	Salto	2011	2
1030	Montevideo	2010	6
1031	Montevideo	2010	2
1032	Montevideo	2010	5
1033	Montevideo	2010	9
1034	Montevideo	2010	2
1035	Montevideo	2010	5
1036	Montevideo	2010	4
1037	Montevideo	2010	6
1038	Montevideo	2010	2
1039	Montevideo	2010	2
1040	Montevideo	2010	2

^a Isolates provided by Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP-Uruguay)

by Macrogen Services (Seoul, Korea), and compared in GenBank by the Blastn tool. The PCRs for the amplification of the ITS (PSA 4/R) were followed according to Pastrik and Rainey (1999) and products were processed as explained above.

PCR reactions for detection of pathogenicity genes: *pat1*, *celA*, *ppaA*, *chpC*, *tomA* (Kleitman et al. 2008, Table 2), were carried out by the following conditions: initial denaturation step (94 °C, 5 min); 35 cycles of denaturation (94 °C, 30 s), annealing (58 °C, 30 s), and extension (72 °C, 30 s); and a final extension (72 °C, 5 min). PCRs were performed in a final volume of 20 µl containing 1X GoTaq buffer (Promega), 250 µM of each dNTP, 0.25 µM of each primer, 0.4 U of GoTaq polymerase, and 20 ng of DNA template. The PCR products were checked as explained above.

Identification of Cmm strains isolated in Uruguay was done by qPCR using two different sets of primers and probe. The first one targets the putative two-component system sensor kinase (Ptssk) (Berendsen et al. 2011), and is recommended by the International Seed Federation (ISF) (“Method for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato seed” available online at www.worldseed.org). The reaction was carried out in a final volume of 10 µl containing 2X Master mix (Quanti-Tec, Qiagen), 0.12 µM of each primer and the probe, and 20 ng of DNA template. The run was performed in a Rotor-Gene 6000 real-time rotary analyzer (Corbett Research) with 5 min incubation at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. The second test targets the Intergenic Spacer Region (ITS) and reactions were done as described in Luo et al. (2008).

Multi Locus Sequence Analysis (MLSA)

In order to get a better insight into population structure of isolates, further characterization of the collection by MLSA was conducted using five housekeeping genes: *atpD* (*ATP synthase β chain*), *dnaK* (*70 kDa heat shock protein*), *gyrB* (*DNA gyrase β subunit*), *ppk* (*polyphosphate kinase*) and *recA* (*recombinase A*) (Table 2). PCR amplifications were performed as described in Jacques et al. 2012. PCR products were sequenced in both directions using primers described in Table 2 and Sanger technology by Genoscreen (Lille, France).

Sequences were assembled, edited and aligned using Geneious Pro 4.8.5 software (Biomatters) to obtain high

quality sequences. In order to compare the genetic variability of the strains from Uruguay with other Cmm strains isolated in other countries, the corresponding partial sequences of 89 strains from the B-collection of Jacques et al. 2012 were used. This collection includes strains from all subspecies of *C. michiganensis*: *michiganensis* (69 strains), *insidiosus* (3 strains), *sepedonicus* (3 strains), *tessellarius* (3 strains) and *nebraskensis* (4 strains), 6 *Clavibacter*-like strains and *Rathayibacter iranicus* as outgroup used to root phylogenetic trees. New multiple alignments for each gene were generated by ClustalW in BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.4.1 software (Hall 1999). Nucleotide alignments were translated to amino acid sequences to gain a codon based alignment (Hall 1999). Sequences were concatenated using Geneious software, following the alphabetic order of the genes and ending in a large sequence of 3009 bp (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk*, and *recA*).

Phylogenies of each loci and concatenated sequences were inferred by maximum likelihood (ML). Best evolution models for each alignment (five loci and the concatenated) were inferred by ModelTest 3.7 in PAUP4 (Swofford 2002) using the hierarchical Likelihood Ratio Tests (hLRT) as well as the Akaike Information Criterion (AIC). Bootstrap analyses were done with 1000 replicates. Trees were generated with PhyML (Guindon et al. 2010). To test if topology of the tree based on the concatenated data set was congruent with the trees produced for each loci, the Shimodaira-Hasegawa test (Shimodaira and Hasegawa 1999) was implemented in DNAML program from PHYLIP package (Felsenstein 2005). Sequence diversity and neutrality estimates and statistics were calculated using the program DnaSP v5 (Rozas et al. 2003).

Multi Locus Sequence Typing (MLST)

MLST was carried out by the allele based method as described by Jacques et al. (2012). Each unique sequence of a locus was assigned an allele number, and each different combination of allele's numbers defined the Sequence Type (ST) in the concatenated data. For this purpose, sequence data was entered in an MLST database to acquire a ST profile (<http://pubmlst.org/analysis/>). The relatedness among STs was displayed using the Based Upon Related Sequences Types (eBURST V3) approach (Feil et al. 2004). The program infers patterns of evolutionary descent among

Table 2 List of primers and probes used in this study

Aim	Primer	Target	Product size	5'–3' sequence	Reference	
identification	PSA-4	ITS	270 pb	TCATTGGTCAATCTGTCTCCC	Patrik and Rainey 1999	
	PSA-R	ITS	223 pb	TACTGAGATGTTCACTTCCCC		
	Spm4F	ITS	223 pb	TCAGGCGTCTGTTCTGGC	Luo et al. 2008	
	Spm2R			CCCACCACCATCCACAAC		
	CMM probe			Fam-CCTTCTGGGTGCTGCTGGTTTC-Tamra		
	27 F	ARNr 16S	1465 pb	HTACCTTGTTACGACTT	Giovannoni 1991	
	1492R			GTTTGATCMTGGCTCAG		
	RZ_ptssk 10	<i>Ptssk</i>	132 bp	GGGGCCGAAAGGTGCTGGTG	Berendsen et al. 2011	
	RZ_ptssk 11			CGTCGCCCCCGCGCTG		
	RZ_ptssk 12			Fam-TGGTCTGCTCCTCGGCG-BHQ1		
	detection of pathogenicity genes	CMM5 (P5)	<i>pat-1</i> (pCM2)	614 pb	GCGAATAAGCCCATATCAA	Dreier et al. 1995
		CMM6 (P6)			CGTCAGGAGGTCGCTAATA	
PFC3		CB domain <i>celA</i> (pCM1)	580 pb	GGTACGAAAGTTCGAGACGAC	Kleitman et al. 2008	
PFC5				TGTAGCGGTGAGTCGTGGTGA		
ppaA-F		<i>ppaA</i> (PAI)	587 pb	CATGATATTGGTGGGAAAG	Kleitman et al. 2008	
ppaA-R				CCCCGTCTTTGCAAGACC		
chpC-F		<i>chpC</i> (PAI)	638 pb	GCTCTGGGGCTAATGGCCG	Kleitman et al. 2008	
chpC-R				GTCAAGTTGTGGAAGATGCTG		
tomA-F		<i>tomA</i> (PAI)	528 pb	CGAACTCGACCAGGTTCTCG	Kleitman et al. 2008	
tomA-R				GGTCTCACGATCGGATCC		
MLSA	atpDF	<i>atpD</i>	697 pb	CGGTCTACAACGCCCTCAAGA	Jacques et al. 2012	
	atpDR			TGCCGTGAAGCGGAAGATGTTG		
	dnaKF	<i>dnaK</i>	704 pb	GCTCGTCAGTAGGAATCG	Jacques et al. 2012	
	dnaKR			CTTGGCGATCTGCTCGAGAC		
	gyrBF	<i>gyrB</i>	909 pb	GGGGTCGGCAGCTCCGTCGTGAAC	Jacques et al. 2012	
	gyrBR			TGGCAGTCCTTGAGCTTGCCAG		
	ppkF	<i>ppk</i>	604 pb	GAGAACCTCATCCAGGCCCT	Jacques et al. 2012	
	ppkR			CGAGCTTGACAGTGGGTCTTGAG		
	recAF	<i>recA</i>	724 pb	GACCGGCTCGCACAGATCGACCG	Jacques et al. 2012	
	recAR			GCCATCTTGTCTTGGACGACCTTG		

isolates using a simple model of clonal expansion and diversification (Pérez-Losada et al. 2013).

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences reported here have been deposited in the GenBank database with the following accession numbers: KP789619–KP789657, KP828202–KP828240, KP828241–KP828279, KP828280–KP828318, KP828319–KP828357 for *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk*, and *recA* genes, respectively.

Results

Characteristics of Cmm strains from Uruguay

The survey of tomato growing regions in Uruguay during the period 2010–2012 performed in this study and the input of additional isolates from previous outbreaks allow us to generate the first local collection of Cmm strains affecting tomato crops in Uruguay (Table 1). Preliminary identification was performed by comparison of 16S rRNA sequences using the Blast tool in GenBank. All strains showed 99–100 % identity with the Cmm reference strain NCPPB 382 (AM711867) and were pathogenic on tomato, causing typical bacterial canker symptoms. In the pathogenicity test that was performed, the plantlets showed wilt symptoms 14 days post-inoculation (dpi), and the whole plants were completely wilted 21 dpi (Fig. 1).

Most strains generated products of the expected size by amplification with specific primers targeting the pathogenicity genes *pat1*, *celA*, *ppaA*, *tomA* and *chpC*;

Fig. 1 Disease symptoms in tomato plantlets inoculated with a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strain isolated in Uruguay: **a** whole plants showing wilting symptoms 14 dpi and **b** unilateral wilting of the leaves, a typical bacterial canker symptom

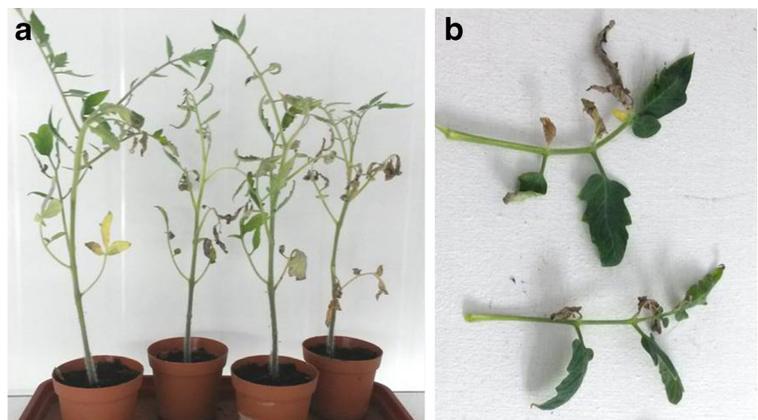


Fig. 2 Maximum likelihood (ML) tree based on concatenation of partial sequences of *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk* and *recA* genes for **a** *Clavibacter michiganensis* strains isolated in Uruguay (called MAI and marked with a grey point) and from a worldwide collection (Jacques et al. 2012) and **b** the subspecies *michiganensis*. Only bootstrap values higher than 50 % are displayed at each node in red. Strains from different locations in Uruguay are distinguished by different colors (Salto green, Artigas blue, Montevideo red, Canelones yellow and San José pink)

and with the ITS primers PSA4-R. The only exception was strain MAI1029, for which *celA* gene was not amplified. Several methods used regularly for the identification of Cmm led to false negatives or false positives (Sen et al. 2015). In this study we used a Taqman assay based on the Ptssk system, for which previous studies have demonstrated a 100 % specificity within a worldwide collection (Jacques et al. 2012). All strains reacted positively in this qPCR reaction, supporting the good specificity of these primers. An additional Taqman system designed by Luo et al. (2008) was also assayed in this study. However, this method did not reveal good specificity within the probe for several strains, which showed atypical curves in the fluorescence plot (Supplemental material, Figure S1).

Multi Locus Sequence Analysis and Typing

The phylogenetic tree based on the data set of concatenated sequences presented a phylogenetic history strongly supported by high bootstrap values (98), and clearly differentiated Cmm from the four other subspecies and from the saprophytes within *C. michiganensis* (Fig. 2a). Similar results were found using the Neighbor Joining algorithm (data not shown). It is important to note that strains from Uruguay were grouped in a cluster

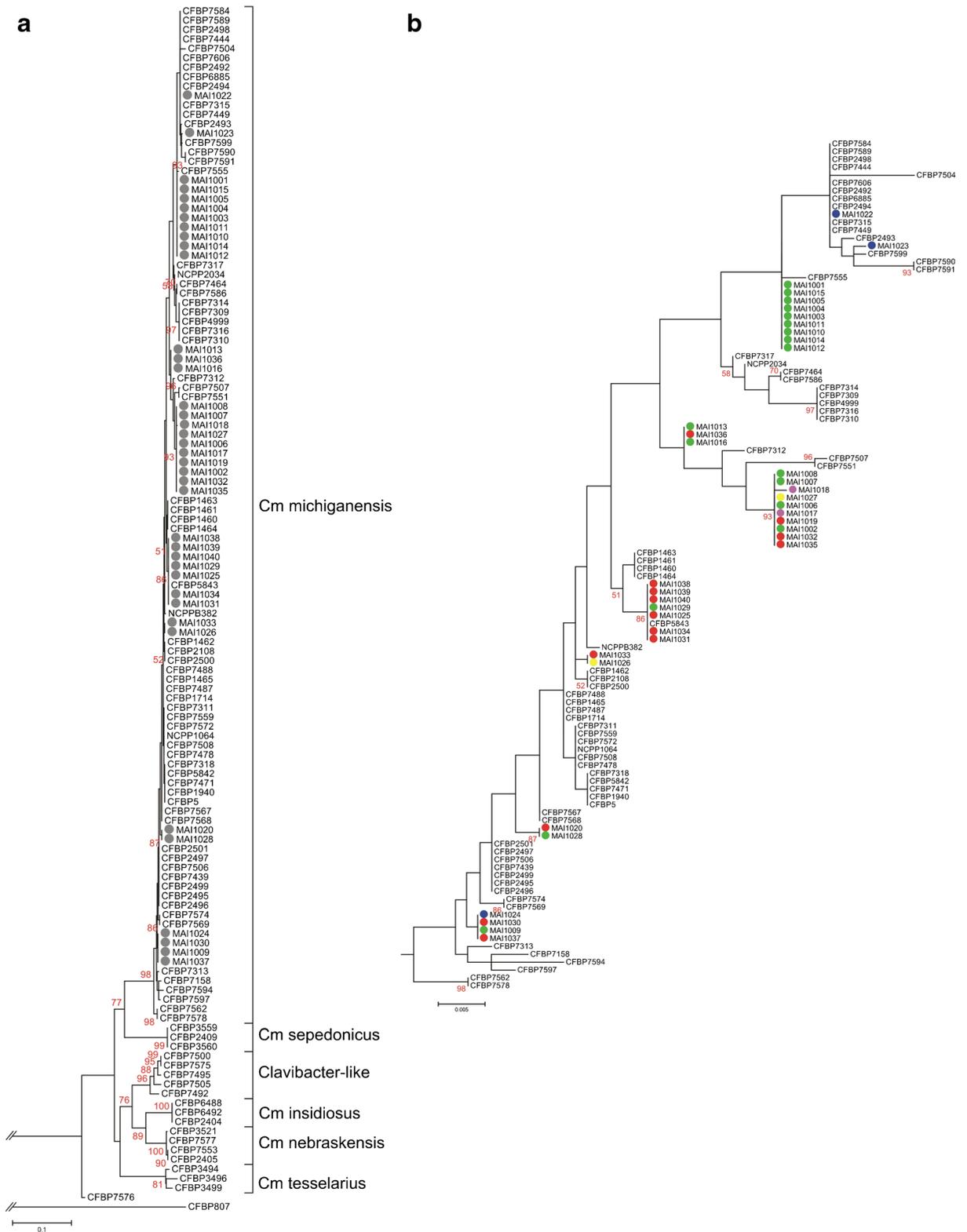


Table 3 P-values determined by the Shimodaira-Hasegawa test of tree topologies run on each of the maximum likelihood trees based on the five loci and the data set of concatenated sequences

Locus	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>ppk</i>	<i>recA</i>
<i>atpD</i>		0.003	0.001	0.000	0.000
<i>dnaK</i>	0.000		0.000	0.000	0.000
<i>gyrB</i>	0.000	0.002		0.000	0.001
<i>Ppk</i>	0.000	0.001	0.000		0.000
<i>recA</i>	0.000	0.002	0.003	0.000	
concat ^a	0.289	0.294	0.350	0.380	0.253

^aData set of five concatenated genes

with Cmm strains originating from various origins. These results provide additional confirmation of the identity of the strains. Phylogenetic trees built for each of the five loci with ML algorithm are shown in Figure S2. The Shimodaira-Hasegawa test showed that all trees were significantly incongruent with each other (P values lower than 0.05) but were not significantly different from the tree based on the concatenated data set (Table 3). Hence, the tree based on the data set of concatenated sequences did not contradict the information brought by each gene.

The set of 108 Cmm isolates (the 69 strains from Jacques et al. (2012) and the 39 strains isolated in

Uruguay) was selected to perform further population structure analysis within the subspecies *michiganensis*. The statistics, diversity estimates and neutrality tests for each alignment (for each loci and the concatenated data set) are presented in Table 4 and the corresponding subtree in Fig. 2b. The genetic diversity was low, as indicated by the level of polymorphism in the analyzed loci (55 polymorphic sites in 3009 total sites). The percentage of polymorphic sites was between 1 and 2 % for *atpD*, *dnaK*, *recA* and *gyrB* genes. The *ppk* locus showed the highest variability (4.2 %), having 24 polymorphic sites in 564 total sites. Between eight and 11 haplotypes were detected for each gene, and a total of 36 haplotypes for the data set of concatenated sequences. Tajima's D and further neutrality tests indicated that all genes presented no significant deviations from neutrality (Table 4). We adopted an approach called eBURST to represent the relatedness between the 108 Cmm strains (Fig. 3). This approach divides an MLST data set into groups of related isolates and clonal complexes, predicts the founding genotype of each clonal complex (CC), and computes the bootstrap support for the assignment (Feil et al. 2004). In this study, 4 CCs (single-locus variants) were identified, linking 2, 5 or 6 STs (Fig. 3). Altogether, these 4 CCs clustered 54 strains representing 50 % of the Cmm strains. In these CCs, strains isolated in different

Table 4 Sequence variation at the five loci among the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains

Locus	No. of sites	%GC	Diversity estimates						Neutrality tests ^g		
			S ^a	% S ^b	Hap ^c	Hd ^d	π^e	θw^f	Tajima's D	Fu&Li's D	Fu's F
<i>atpD</i>	561	67.9	9	1.604	10	0.777	0.00423	0.00305	0.94899	1.31376	0.011
<i>dnaK</i>	576	69.2	7	1.215	9	0.7	0.00243	0.00231	0.12156	0.30438	-1.439
<i>gyrB</i>	735	66	8	1.088	8	0.693	0.00133	0.00207	-0.86324	-1.19403	-2.070
<i>ppk</i>	564	68.8	24	4.255	11	0.816	0.01159	0.0081	1.26614	-0.95282	5.455
<i>recA</i>	573	70	7	1.222	9	0.597	0.00201	0.00266	-0.58491	-0.37806	-2.256
Concat ^h	3009	68.2	55	1.828	36	0.958	0.00413	0.00354	0.52945	-0.46761	-2.906

^aNumber of polymorphic sites

^bPercentage of polymorphic sites

^cNumber of haplotypes

^dHaplotype diversity

^eNucleotide diversity

^fWatterson's theta estimator per gene from sequence

^gData represent the results of neutrality tests performed using the method of Tajima (Tajima 1989) and Fu and Li (1993) (Tajima's D, Fu and Li's D, and Fu's F), and associated P values (not significant, P 0.1)

^hData set of five concatenated genes

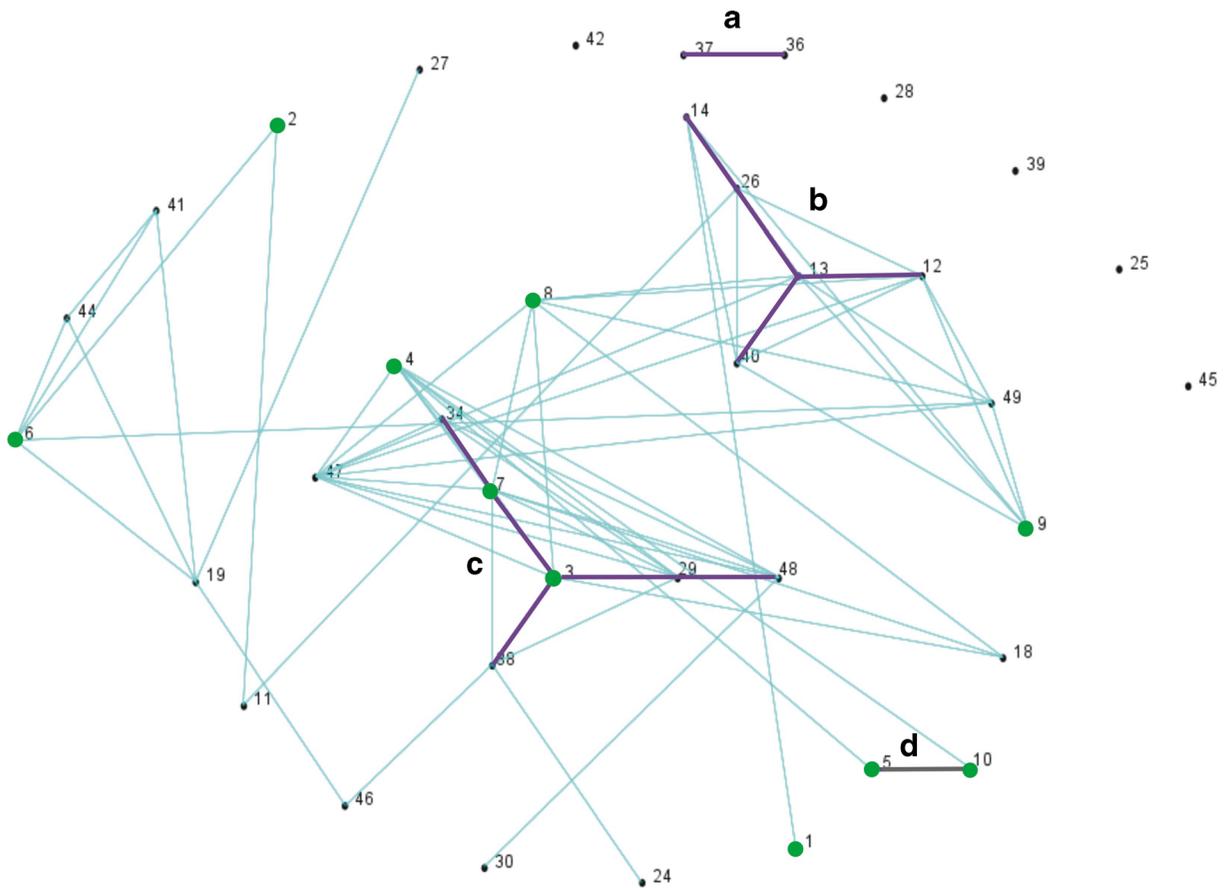


Fig. 3 e-Burst diagram for 108 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains based on alleles of five housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk* and *recA* genes). Each point represents a sequence type and their relatedness is represented by thick purple

lines (clonal complexes, single-locus variation) and sky-blue lines (double-locus variation). Sequence types representing strains from Uruguay are marked with a green point

countries, even different continents, over a long period of time, were grouped. Concerning the analysis of double-locus variants (DLV), 103 strains were linked, representing the 95 % of Cmm strains. All other STs were singletons. Two out of four CCs (A and B) were previously identified by Jacques et al. (2012). In this study we found two additional CCs (C and D) due to the new STs assigned to Uruguayan strains (Fig. 3).

Diversity among Uruguayan isolates

MLST could resolve the 39 Uruguayan isolates into 10 STs, showing high diversity within the Cmm population affecting tomato crops in the country (Table 1; Fig. 4). Most STs and the corresponding CCs were not related to the geographical origin of strains or the year of isolation (Table 1, Fig. 3). This suggests that different sources of inoculum were involved in bacterial canker outbreaks in

Uruguay. Strains isolated from a same place fell in separated STs and CCs indicating that inoculum sources might have been diverse in these places. This was the case for strains isolated in Salto (in 2011 and 2012) where STs 1 to 6 were assigned. Strains assigned to ST3 were exclusively isolated in Salto (2012), although they were collected in different farms suggesting a common origin of infection or dissemination for these farms. In the other hand, some STs were not restricted to a particular region; they are present all over the country. For i.e strains assigned to ST5 were isolated from Salto, San José, Canelones and Montevideo (Fig. 4).

Comparing the genetic diversity of Cmm isolates from Uruguay with a worldwide collection

Thirty one out of the 39 strains from Uruguay presented novel haplotypes compared to the 89 strains of the

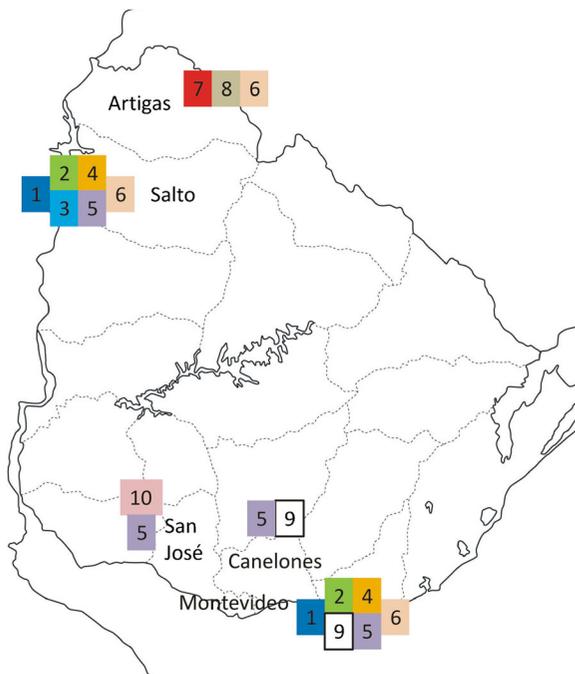


Fig. 4 Geographical distribution of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Uruguay as determined by Multilocus Sequence Typing. Numbers represented the assigned sequenced types

worldwide B-collection of Jacques et al. 2012. The analysis assigned these 31 strains into 8 STs, which were not established previously (Table S1, Fig. 2b). On the other hand, 8 strains isolated in Uruguay were grouped together with strains from various origins. The most noticeable case is strain MAI1022 (Artigas, 1997) that has the same ST (ST 7) than strains from different countries (Algeria, France, The Netherlands, Belgium and USA) (Table S1; Fig. 2b). This result strongly reflects Cmm seed transmission and hence, the global dissemination of the pathogen through seeds. In another case, a group of strains from Uruguay also shares the same ST with strain CFBP 5843 (Brazil, 1994), which suggests the possibility of material exchange between these neighboring countries or maybe the same source of inoculum.

Discussion

Despite the fact that bacterial canker has been a problem in Uruguay since the early 80s, this is the first report on the genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the country. The first collection

of Cmm strains from Uruguay that affected tomato crops in recent years was generated and characterized. Several identification tests previously designed for Cmm and the presence of pathogenicity determinants were checked, as well as pathogenicity on tomato.

The development of reliable methods to detect Cmm in seeds (or seedlings) is an important issue to consider, as tomato infected seeds act as source of primary inoculum (Gleason et al. 1993). In particular, the Ptssk system (Berendsen et al. 2011) seems to be the most reliable tool for identification of Cmm. In our experiments, some of the strains isolated in Uruguay had a mismatch of one base in the CMM probe designed by Luo et al. (2008) (Supplemental material, Figure S1). This mismatch led to low amplification efficiencies in the qPCR reactions, explaining the atypical curves obtained for these strains.

In this report, we wanted to decipher how diverse are Cmm isolates recovered in Uruguay and the relationships of these strains to previously characterized strains from a worldwide collection. These elements will be useful to identify the origin of outbreaks in Uruguay. MLST has proven to be a powerful tool for documenting the genetic variability of bacterial isolates. Moreover, it provides an unambiguous “barcode” that identifies any given culture to the level of sequence type (Nunney et al. 2012). Using MLST, phylogenetic relationships of large sets of strains can be analyzed with high reproducibility between laboratories, as demonstrated in this study. The use of housekeeping genes has been adopted for bacterial population studies as they are believed to evolve neutrally. These genes are under stabilizing selection and are present in all strains of a relevant genus/species to be analyzed (Quesada-Ocampo et al. 2012). Still, putative pathogenicity genes are much more conserved than housekeeping genes having a few or no polymorphic sites in the sequenced regions of genes (Tancos et al. 2015). A previous study showed that *gyrB* and *recA* genes provided robust phylogenies to identify infraspecies sequence variation among the *Clavibacter* genus (Jacques et al. 2012). The present study is focused on the diversity among the subspecies *michiganensis*, so the more polymorphic a gene is, the more informative it is for our purpose. Hence, five housekeeping genes were chosen to compare our collection with strains from diverse origins. In this case, *ppk* was the most polymorphic gene of this MLST scheme, with 4.3 % of variable sites (Table 4).

Based on this MLST scheme, 108 strains belonging to the subspecies *michiganensis* were divided in 36 STs. In this context, 10 STs were identified for the 39 isolates from Uruguay, indicating that the Cmm population used in this study has high genetic diversity. Moreover, 8 of these were novel STs expanding the knowledge about the diversity among the subspecies *michiganensis*. Cmm population structure analyses made in other countries have shown diverse results depending on the amount of strains analyzed and the method used to type them. First, high homogeneity was found in Canary Islands where only one cluster was found for 54 strains using RAPD, BOX-PCR and AFLP; suggesting that Cmm was introduced to Canary Islands from a unique origin (De León et al. 2009). Then, high diversity was found in Japan dividing 43 strains into 22 groups by ISSR-PCR and rep-PCR (Kawaguchi and Tanina 2014). Furthermore, an MLSA scheme made in New York clusters 51 isolates into 21 haplotypes, by using five housekeeping genes (*kdpA*, *sdhA*, *dnaA*, *ligA* and *gyrB*) and three putative pathogenicity genes (*celA*, *tomA* and *nagA*) (Tancos et al. 2015). These results as well as the ones obtained in this study, indicate multiple origins of infection for the development of bacterial canker in those geographical places.

A further advantage of MLSA/MLST is that new isolates can be easily grouped into an existing framework of strains. In Uruguay, further isolations remain to be done, and hence the approach reported in this work acquires great relevance to continue determining the origin of new outbreaks of bacterial canker in the country. Interest in knowing the origin of outbreaks has emerged due to real-life problems experienced by growers in the two major production areas, as economic losses caused by this bacterium increase in each growing season. Having the opportunity to use MLSA to identify strains could help growers by demonstrating if the same or a different strain of this pathogen is established on their fields/greenhouses. Depending on the results, growers can know whether the outbreak was caused by improper sanitation measures or by an introduction of the pathogen through infected seeds.

It is well known that contaminated seeds are the primary source of inoculum for most Cmm outbreaks (De León et al. 2011). In Uruguay, many tomato varieties from different countries are introduced each year as a consequence of importation of seeds. From 2010 to 2012 many lots came from Thailand, Peru, Italy, China, Argentina, Denmark, USA, Japan or the Netherlands.

We observed high genetic diversity among the strains from Uruguay (Table 1) and hence, introduction and subsequent transmission of the pathogen by seeds is suggested. Probably, the pathogen was transmitted from several of those seed lots and multiplied in nurseries, providing latently infected tomato plants to growers.

There is another possibility regarding the sources of inoculum, the existence of dominant strains surviving in soil or plant debris, being recovered in consecutive years in the same location. This fact was reported in Israel, where two genotypes were repeatedly isolated for several years in the Besor region (Kleitman et al. 2008). We did not find this type of results in our study for the two places where isolations were made in consecutive years (Montevideo and Salto). Despite, isolates from Montevideo collected in 2005 and 2010 were grouped together; the exact location of these strains is not available. In consequence, we cannot conclude for this particular situation. Surprisingly, strains collected in one location (Trapezón) in Salto two following seasons (2011 and 2012) belonged to different STs each year (Table 1). This finding suggests that each year new inoculum is brought to the greenhouse.

Another relevant issue is the geographical distribution of haplotypes over the country. As observed in Fig. 4, most STs were found in the two main tomato growing areas of the country (Southern and Northern). In particular, ST5 was isolated in all locations sampled except Artigas. In addition, some STs seem to be exclusive of one specific location, for instance ST3 was only found in Salto. It is important to notice that both regions have different crop cycles because temperatures in the North are always higher than in the South. In the latter area, tomato is a season crop, so it is harvested from summer to beginning of autumn. The northern region is the major producer of counter season crops to sell during winter and spring, and most part is produced in greenhouses. Hence, it remains to be elucidated if some STs are better adapted to a particular region given by its climate conditions, crop systems, etc.

Phylogenetic trees are not suitable to represent recent evolutionary events, as they attempt to reconstruct relationships in the absence of a realistic model of the way in which bacterial clones emerge and diversify to form clonal complexes (Feil et al. 2004). For this reason, we have used the e-Burst algorithm, which revealed some differences with the one showed in the previous report (Jacques et al. 2012). The discovery of ST3 in this work, allowed the identification of the CC “C”, with ST3

being the ancestral haplotype from which other strains arise. The other strains involved in this CC (those assigned to STs 7, 34, 38, 29 and 48) were not linked altogether in the previous report (Jacques et al. 2012). Furthermore, CC “D” corresponding solely to strains from Uruguay was also identified in this work. Strains forming clonal complexes from different geographical regions and periods of time, illustrates the efficacy of seed transmission and powerful survival strategies.

This study also confirms the great potential of MLST to reveal the origin and spread of bacterial canker. A unique MLST scheme should be adopted for Cmm strains in order to compare strains from worldwide origins in future studies. In conclusion, the main source of bacterial canker infections in Uruguay consisted in infected seeds as a result of importation from different countries. We suggest that a traceability system should be applied to seeds in order to search for origin of outbreaks and follow the spread of possible sources of contamination.

Acknowledgments This work was supported by CSIC I + D Grupos N° 652 and MSc. scholarship provided to V. Croce by the National Research Council in Uruguay (ANII).

We thank Enrique Verdier from DGSA-MGAP and Elisa Silvera and María José Montelongo from Agronomy Faculty for providing Cmm strains isolated in Uruguay; Ana Arruabarrena for helping in the isolations of strains from Salto; Sophie Bonneau for her useful advices to build the trees; Eliana Richard for technical support in figure editing; Federico Boschi and Diego Maeso for useful discussions; and Maria Inés Lapaz and Analía Sanabria for critically reviewing the manuscript.

References

- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., et al. (2010). PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, *100*(3), 208–215.
- Baysal, Ö., Mercati, F., İkten, H., Yıldız, R. Ç., Carimi, F., Aysan, Y., & Teixeira da Silva, J. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *75*(3), 113–119.
- Berendsen, S. M. H., Koenraadt, H., Woudt, B., & Oosterhof, J. (2011). The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Presented at the American Phytopathological Society - International Plant Protection Convention Meeting, Honolulu, Hawaii, 6–10 August 2011.
- De León, L., Siverio, F., López, M. M., & 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 Protection*, *27*(9), 1277–1283.
- De León, L., Rodríguez, A., Llop, P., López, M. M., & Siverio, F. (2009). Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathology*, *58*(5), 862–871.
- De León, L., Siverio, F., López, M., & Rodríguez, A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease*, *95*(11), 1328–1338.
- DGSA-MGAP (Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) (2009). Sub-estándar fitosanitario Mercosur. Sección III - Medidas Fitosanitarias. Requisitos fitosanitarios para *Lycopersicon esculentum* (tomate) según País de Destino y Origen, para los Estados Partes. http://www.mgap.gub.uy/dgssaa/Normativa/Archivos/INTERN_ResGMC/ResDGSA16tomate.pdf. Accessed 26 Feb 2015.
- Dreier, J., Bempohl, A., & Eichenlaub, R. (1995). Southern hybridization and PCR for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, *85*, 462–468.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). (2014). Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. *EFSA Journal*. doi:10.2903/j.efsa.2014.3721.
- EPP0 (European and Mediterranean Plant Protection Organization). (2013). PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPP0 Bulletin*, *43*(1), 46–67.
- Fatmi, M., & 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*(2), 149–154.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., & Spratt, B. G. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, *186*(5), 1518–1530.
- Felsenstein, J. (2005). *PHYLIP: Phylogeny inference package* (Version 3.63). Seattle: Department of Genetics, University of Washington.
- Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, *133*, 693–709.
- Giovannoni, S. (1991). The polymerase chain reaction. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 177–204). Chichester: Wiley.
- Gleason, M., Gitaitis, R., & Ricker, M. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease*, *77*(11), 1069–1076.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, *59*(3), 307–321.
- Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.

- Jacques, M.-A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., et al. (2012). Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8388–8402.
- Kawaguchi, A., & Tanina, K. (2014). Genetic groups of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identified by DNA fingerprinting and the effects of inoculation methods on disease development. *European Journal of Plant Pathology*, 140(3), 399–406.
- Kawaguchi, A., Tanina, K., & Inoue, K. (2010). Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology*, 59, 76–83.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., et al. (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 463–475.
- Lasa, C. I., Abiko, K., Tezuka, N., Inaba, T., & García, S. (1981). Algunas enfermedades que afectan actualmente los cultivos de hortalizas en Uruguay. *Investigaciones Agronómicas. Uruguay, Año*, 2(Nro 1), 97–100.
- 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(2), 332–337.
- Maiden, M., Bygraves, J., Feil, E., Morelli, G., Rusell, J., Urwin, R., et al. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3140–3145.
- Milijašević-Marčić, S., Gartemann, K.-H., Frohwitter, J., Eichenlaub, R., Todorović, B., Rekanović, E., & Potočnik, I. (2012). Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 134(4), 697–711.
- Nunney, L., Elfekih, S., & Stouthamer, R. (2012). The importance of multilocus sequence typing: cautionary tales from the bacterium *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, 102, 456–460.
- Pastrik, K. H., & Rainey, F. A. (1999). Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by Polymerase chain reaction- based techniques. *Journal of Phytopathology*, 147, 687–693.
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., & Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 38–53.
- Quesada-Ocampo, L. M., Landers, N. A., Lebeis, A. C., Fulbright, D. W., & Hausbeck, M. K. (2012). Genetic structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in Michigan commercial tomato fields. *Plant Disease*, 96(6), 788–796.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP: DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496–2497.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor.
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., Wolf, J., Visser, R. G. F., & Heusden, A. W. (2012). Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*, 190(2), 309–317.
- Sen, Y., van der Wolf, J., Visser, R. G. F., & van Heusden, A. W. (2015). Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance and interactions. *Plant Disease*, 99(1), 4–13.
- Shimodaira, H., & Hasegawa, M. (1999). Multiple comparisons of log likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1114–1116.
- Smith, E. F. (1910). A new tomato disease of economic importance. *Science*, 31, 794–796.
- Strider, D. L. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* 193.
- Swofford, J. L. (2002). PAUP. Phylogenetic analysis using Parsimony.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tancos, M. A., Lange, H. W., & Smart, C. D. (2015). Characterizing the genetic diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in New York. *Phytopathology*, 105(2), 169–179.
- Umesha, S. (2006). Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop Protection*, 25(4), 375–381.
- Van Heusden, A. W., Koornneef, M., Voorrips, R. E., Brüggemann, W., Pet, G., Vrielink-van Ginkel, R., et al. (1999). Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(6), 1068–1074.

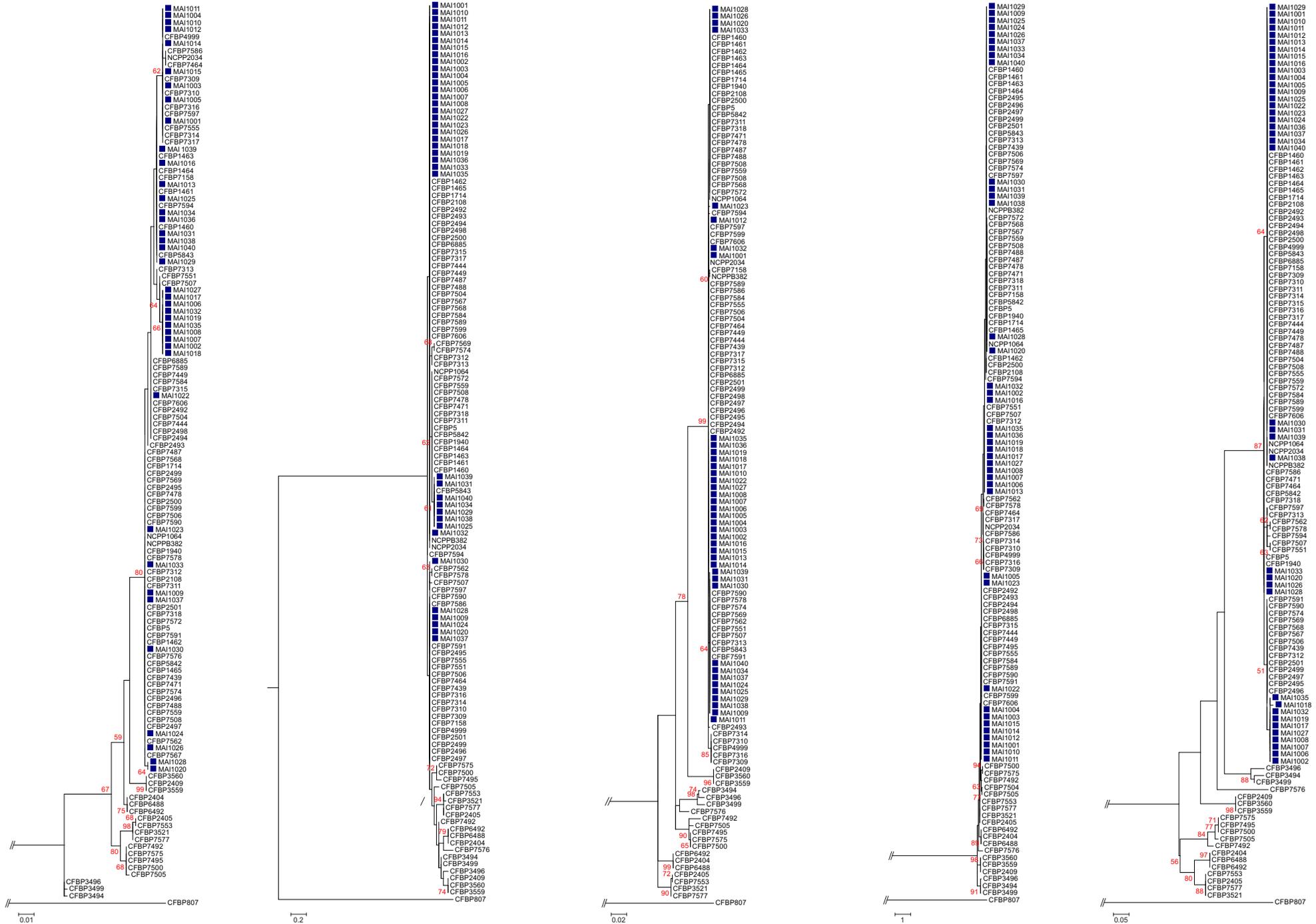
atpD

dnak

gyrB

ppk

recA



Supplemental Table S1. Grouping of strains in sequence type and allelic profiles.

Strain	Country of origin	Year of isolation	ST	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>ppk</i>
MAI 1028	Uruguay	2011	1	20	1	7	19	4
MAI 1020	Uruguay	2012	1	20	1	7	19	4
MAI 1029	Uruguay	2011	2	3	21	2	2	3
MAI 1025	Uruguay	2005	2	3	21	2	2	3
MAI 1034	Uruguay	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1040	Uruguay	2010	2	3	21	2	2	3
CFBP 5843	Brazil	1994	2	3	21	2	2	3
MAI 1031	Uruguay	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1039	Uruguay	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1038	Uruguay	2010	2	3	21	2	2	3
MAI 1001	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1003	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1004	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1005	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1010	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1011	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1012	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1014	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1015	Uruguay	2012	3	4	2	1	2	1
MAI 1013	Uruguay	2012	4	3	2	1	2	6
MAI 1016	Uruguay	2012	4	3	2	1	2	6
MAI 1036	Uruguay	2010	4	3	2	1	2	6
MAI 1002	Uruguay	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1006	Uruguay	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1007	Uruguay	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1008	Uruguay	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1027	Uruguay	2008	5	19	2	1	21	6
MAI 1017	Uruguay	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1019	Uruguay	2012	5	19	2	1	21	6
MAI 1035	Uruguay	2010	5	19	2	1	21	6
MAI 1032	Uruguay	2010	5	19	2	1	21	6
MAI 1024	Uruguay	1997	6	1	1	2	2	3
MAI 1009	Uruguay	2012	6	1	1	2	2	3
MAI 1037	Uruguay	2010	6	1	1	2	2	3
MAI 1030	Uruguay	2010	6	1	1	2	2	3
MAI 1022	Uruguay	1997	7	2	2	1	2	1
CFBP 2492	Algeria	1985	7	2	2	1	2	1
CFBP 2494	Algeria	1984	7	2	2	1	2	1
CFBP 2498	Algeria	1984	7	2	2	1	2	1
CFBP 6885	France	2004	7	2	2	1	2	1
CFBP 7315	United States	1998	7	2	2	1	2	1

CFBP 7444	na	1998	7	2	2	1	2	1
CFBP 7449	France	1998	7	2	2	1	2	1
CFBP 7584	The Netherlands	2008	7	2	2	1	2	1
CFBP 7589	Belgium	1984	7	2	2	1	2	1
CFBP 7606	The Netherlands	1998	7	2	2	1	2	1
MAI 1023	Uruguay	1997	8	1	2	21	2	1
MAI 1026	Uruguay	1999	9	1	2	7	19	3
MAI 1033	Uruguay	2010	9	1	2	7	19	3
MAI 1018	Uruguay	2012	10	19	2	1	20	6
CFBP 1460	France	1974	11	3	6	7	2	3
CFBP 1461	France	1974	11	3	6	7	2	3
CFBP 1463	France	1975	11	3	6	7	2	3
CFBP 1464	France	1975	11	3	6	7	2	3
CFBP 1462	France	1975	12	1	2	7	2	23
CFBP 2108	France	1981	12	1	2	7	2	23
CFBP 2500	Algeria	1984	12	1	2	7	2	23
CFBP 1465	France	1975	13	1	2	7	2	4
CFBP 1714	France	1975	13	1	2	7	2	4
CFBP 7487	France	2008	13	1	2	7	2	4
CFBP 7488	France	2008	13	1	2	7	2	4
CFBP 1940	Spain	1978	14	1	6	7	19	4
CFBP 5	France	1956	14	1	6	7	19	4
CFBP 5842	Brazil	1993	14	1	6	7	19	4
CFBP 7318	na	2001	14	1	6	7	19	4
CFBP 7471	France	1997	14	1	6	7	19	4
CFBP 2493	Algeria	1985	18	18	2	20	2	1
CFBP 2495	Algeria	1985	19	1	1	1	1	3
CFBP 2496	Algeria	1978	19	1	1	1	1	3
CFBP 2497	Algeria	1978	19	1	1	1	1	3
CFBP 2499	Algeria	1984	19	1	1	1	1	3
CFBP 2501	Algeria	1984	19	1	1	1	1	3
CFBP 7439	na	1992	19	1	1	1	1	3
CFBP 7506	na	2009	19	1	1	1	1	3
CFBP 4999	Algeria	1984	24	4	1	18	2	21
CFBP 7309	United States	1998	24	4	1	18	2	21
CFBP 7310	United States	1998	24	4	1	18	2	21
CFBP 7314	United States	2002	24	4	1	18	2	21
CFBP 7316	United States	1998	24	4	1	18	2	21
CFBP 7158	New Zealand	1968	25	3	1	4	5	4
CFBP 7311	Morocco	1989	26	1	6	7	2	4
CFBP 7478	Switzerland	2007	26	1	6	7	2	4
CFBP 7508	France	2009	26	1	6	7	2	4
CFBP 7559	na	na	26	1	6	7	2	4
CFBP 7572	na	2002	26	1	6	7	2	4

NCPBP 1064	Italy	1961	26	1	6	7	2	4
CFBP 7312	China	1998	27	1	20	1	1	6
CFBP 7313	United States	2002	28	17	20	2	4	3
CFBP 7317	France	2001	29	4	2	1	2	9
CFBP 7464	Morocco	na	30	8	1	1	19	9
CFBP 7586	Belgium	1998	30	8	1	1	19	9
CFBP 7504	France	2009	34	2	2	1	2	16
CFBP 7507	France	2010	36	5	16	2	6	6
CFBP 7551	Switzerland	2007	37	5	1	2	6	6
CFBP 7555	Slovenia	2001	38	4	1	1	2	1
CFBP 7562	Portugal	1998	39	1	7	2	9	10
CFBP 7578	na	na	39	1	7	2	9	10
CFBP 7567	na	na	40	1	2	7	1	4
CFBP 7568	United States	2000	40	1	2	7	1	4
CFBP 7569	na	na	41	1	8	2	1	3
CFBP 7574	na	na	41	1	8	2	1	3
CFBP 7590	Taiwan	1988	44	1	1	2	1	1
CFBP 7591	Taiwan	1988	44	1	1	2	1	1
CFBP 7594	Belgium	2008	45	3	3	3	3	2
CFBP 7597	Belgium	2008	46	4	1	1	4	3
CFBP 7599	France	2007	47	1	2	1	2	5
NCPBP 2034	South Africa	1992	48	8	2	1	2	9
NCPBP 382	na	1956	49	1	2	4	2	3

Anexo II

El presente documento corresponde al protocolo recomendado actualmente por la *International Seed Federation* para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate. Actualmente, la versión disponible es la 4.3 de Setiembre 2015 y está disponible en <http://www.worldseed.org/our-work/phytosanitary-matters/seed-health/ishi-veg/>.

Method for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato seed

Crop:	Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> L. now <i>Solanum lycopersicum</i>)
Pathogen:	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Revision history:	Version 4.3, September 2015

Sample and sub-sample size

The recommended minimum sample size is 10,000 seeds, with a maximum sub-sample size of 10,000 seeds.

Principle

- Extraction from the seed of externally and internally located bacteria
- Isolation of viable *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) bacteria by dilution plating seed extract on two different semi-selective media
- Confirmation of suspect bacterial colonies by morphology on a non-selective medium, followed by a PCR and/or by a pathogenicity assay

Restrictions on use

- This test method is suitable for untreated seed.
- This test method is suitable for seed that has been treated using physical or chemical (acid extraction, calcium or sodium hypochlorite, tri-sodium phosphate, etc.) processes with the aim of disinfestation/disinfection, provided that any residue, if present, does not influence the assay. It is the responsibility of the user to check for such inhibition by analysis, sample spiking, or experimental comparisons.
- The ability to recover Cmm on plates can be influenced by the presence of other microorganisms. A check for such antagonism must be performed by spiking the most concentrated seed extracts with a known number of Cmm-colony forming units (CFUs). See test method description for details on spiking.
- This test method has not been validated for seed treated with protective chemicals or biological substances. If a user chooses to test treated seed using this method, it is the responsibility of the user to determine empirically (through analysis, sample spiking, or experimental comparisons) whether the protective chemicals or biological substances have an effect on the method results.

Method execution

It is strongly recommended that the best practices described by ISHI-Veg for the reliable use of molecular techniques and dilution-plating assays in seed health testing be followed to ensure process standardization and valid results (see http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable_1.html).

Note – In this version Section 2.10 has been modified according to ISHI-Veg's best practices for dilution-plating assays used in routine seed health testing. An error in the recipes for the SCM and SCMF media has been corrected.

Method description

1. Extraction of bacteria from the seed

- 1.1 Put sub-samples in sterile stomacher bags. Add sterile seed extraction buffer to each bag at a ratio of 4 ml of seed extract buffer to 1 g of seed (v:w). Incubate overnight (minimum 14 hours) at 4°C, and macerate for at least 4 min in a stomacher machine until the extraction buffer has become milky and white particles become visible as a result of endosperm release (see Fig. 1).



Figure 1. The seed extraction buffer and seeds after stomaching

2. Isolation on semi-selective media

- 2.1. Filter coarse particles from the required volume of extract using a filter bag (e.g. Bagfilter® or Bagpage® from Interscience (France) or an extraction bag with synthetic intermediate layer from Bioreba (Switzerland) or Neogen Europe (Scotland)). If a stomacher bag with filter is used this is automatically achieved.
- 2.2. It is recommended to clear the filtered extract by a low speed centrifugation for 1 min at 1,000 g. This removes fungal spores and facilitates re-suspension of the pellets. Remove the supernatant carefully and use it for further dilution plating.
- 2.3. Prepare a 10-fold dilution of the seed extract in sterile seed extraction buffer. For sub-samples larger than 2,000 seeds prepare also a 10-fold concentrated extract. Centrifuge the filtered extract with a time and speed sufficient to pellet bacteria (e.g. for 5 minutes at 5,000 g). Remove the supernatant carefully and re-suspend the pellet in 1/10 of the original centrifuged volume of sterile seed extraction buffer.
- 2.4. Spread-plate 0.1 ml of the concentrated (if applicable), the undiluted and diluted extracts onto plates of each of two semi-selective media, CMM1T and either SCM or SCMF.
- 2.5. Prepare a 10-fold dilution series of a suspension of a pure culture of a known Cmm reference strain in sterile seed extraction buffer. Spread-plate 0.1 ml of the dilutions on each semi-selective medium. Make sure that at least one plate with 30-300 colonies is obtained on each of the semi-selective media (reference plates for section 2.9).
- 2.6. As a check on the ability to recover Cmm, spike Cmm into (a separate aliquot of) the most concentrated extract of each subsample at a level of 20 – 100 CFU per 0.1 ml. Spread-plate 0.1 ml of these spiked extracts on a plate of each of the two semi-selective media. Use similarly spiked seed extraction buffer as a control.

- Use of an antibiotic resistance marked Cmm-strain is an option to rapidly verify possible false-positives due to cross-contamination.
 - Use of a different *Clavibacter* subspecies such as *C. m.* subsp. *tessellarius*, with a morphology that is distinct from Cmm and from common saprophytes is another option. Such a subspecies can be spiked directly into the most concentrated seed extracts plated for detection of Cmm. The selected strain must have been shown to be suppressed or overgrown similarly to Cmm on the semi-selective media in the presence of antagonists.
- 2.7. Incubate plates in the dark at 26-28°C for 10 days. Check plates at 7-10 days.
 - 2.8. Check recovery and morphology of the Cmm reference strain on both media.
 - 2.9. Examine the sample plates for the presence of colonies with typical Cmm morphology by comparing them with the reference Cmm strain. Record the number of suspected colonies as well as other colonies.
 - After 10 days of incubation on CMM1T, Cmm colonies are yellow, mucoid and convex (see Fig. 2).
 - After 10 days of incubation on SCM, Cmm colonies are translucent grey, mucoid, eventually often irregularly shaped, with internal black flecks (see Fig. 3).
 - After 10 days of incubation on SCMF, Cmm colonies are mucoid and translucent grey, often irregularly shaped. The center of the colony can be grey to grey-black depending on the strain (see Fig. 4).
 - The colony size and color can differ within and between samples. It is particularly influenced by other colonies growing nearby. Isolates may vary in growth speed.
 - 2.10. From sample plates, select, if present, at least 6 suspect colonies per medium per sub-sample for further identification on YDC medium.
 - 2.11. Examine the plates of the spiked extracts of each subsample for the presence of colonies with typical Cmm morphology. Spiking is valid when at least 5 colonies are present on any one medium. A negative sub-sample test result can only be concluded if the spiking of the same sub-sample is valid. In the case that no Cmm is identified and the spiking is invalid, test a new subsample after (further) treatment/disinfestations of the seed lot.

3. Identification by morphology on YDC medium

- 3.1. Transfer selected suspect colonies as well as the reference strains onto YDC medium. Incubate YDC plates at 26 - 28°C for 2-3 days.
- 3.2. Determine whether transferred colonies have typical Cmm morphology by comparing them with the reference strains and record which of the isolates are still suspected to be Cmm.
 - On YDC Cmm is yellow, domed (convex) and mucoid in appearance.
- 3.3. Identify all suspect isolates directly by the pathogenicity assay (section 5) or by a pre-screening using PCR (section 4) followed by the pathogenicity assay.

4. Identification by PCR

- 4.1. Prepare a slightly turbid cell suspension (OD_{600nm} approximately 0.05) in 1 ml sterile distilled water from each suspect colony on YDC medium and the positive control. Cultures should not be older than 5 days after plating. In addition use as controls: a non-suspect isolate as a negative control, a positive amplification control and a positive process control. Heat the suspensions for 10 min at 95–100°C. The suspensions can be stored at -20°C until the PCR analysis. Two PCRs (4.2 and 4.3) are performed for each suspect isolate.

4.2. **MVS21 Taqman® PCR**

4.2.1. Use the following specific primers (6) which will produce an amplicon of 83 bp.

MVS21 Forward: 5'-CTAgTTgCTgAATCCACCCAg-3'

MVS21 Reverse: 5'-TACCgCTTgACTCTCgTTTC-3'

MVS21 Probe: 5'-FAM-CTgCCACCCgATgTTgTTCC-TAMRA-3'

4.2.2. Use the following universal bacterial primers to validate the PCR reaction. These primers will give a product of approximately 228 bp (adapted from 8).

Wu Forward: 5'- CAACgCgAAgAACCTTACC-3'

Wu Reverse: 5'- ACgTCATCCCCACCTTCC-3'

Wu Probe 1: 5'-VIC- ACgACAACCATgCACCCACCTg-QSY-3'

Wu Probe 2: 5'-VIC- ACgACAgCCATgCAGCACCT-QSY-3'

4.2.3. Prepare the reaction mixture (appendix 1A). Carry out PCR reactions in a real-time PCR instrument in a final volume of 25 µl (20 µl reaction mixture + 5 µl bacterial suspension).

4.2.4. PCR conditions: 5 min incubation at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. Ramp speed should be 5°C/s.

4.2.5. Determine Ct values; Ct values of positive controls should consistently be lower than 30. The cut off Ct value of the internal amplification control (WU-primers) should be below 30-35, to be determined by the user based on experimental data.

4.3. **PTSSK Taqman® PCR**

4.3.1. Use the following specific primers and probe (2). A fragment of 132 bp is amplified.

Primer RZ_ptssk 10: 5' ggg gCC gAA ggT gCT ggT g 3'

Primer RZ_ptssk 11: 5' CgT CgC CCg CCC gCT g 3'

Probe RZ_ptssk 12: 5' FAM-Tgg TCg TCC TCg gCg-MGB-NFQ 3'

4.3.2. Use the universal bacterial primers (see 4.2.2.) to validate the PCR reaction.

4.3.3. Prepare the reaction mixture (appendix 1B). Carry out PCR reactions in a real-time PCR instrument in a final volume of 25 µl (20 µl reaction mixture + 5 µl bacterial suspension).

4.3.4. PCR conditions: 5 min incubation at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. Ramp speed should be 5°C/s.

- The PTSSK PCR has been validated on a strain collection using an annealing temperature of 60°C, a temperature that is 8-10 C below the maximum annealing temp (2).

4.3.5. Determine Ct values; Ct values of positive controls should consistently be lower than 30. The cut off Ct value of the internal amplification control (WU-primers) should be below 30-35, to be determined by the user based on experimental data.

4.4. Combine results of both PCRs (sections 4.2 and 4.3). If both PCRs result in a negative confirmation, and the internal amplification control (Wu taqman) is positive in both reactions, the suspect colony is considered not to be Cmm. If one or both PCRs result in a positive confirmation, the pathogenicity assay should be performed to reach a final conclusion about the identity of the suspect colony. Possible PCR outcomes and the conclusions are summarized in the table below.

Table 1: Interpretation and decision table

MVS21 Taqman	RZ-PTSSK Taqman	qPCR Result	Follow-up
Ct ≤35 Positive	Ct ≤35 Positive	Expected result for Cmm	Pathogenicity test needed for confirmation
Ct > 35 Negative	Ct ≤35 Positive	Inconclusive	Pathogenicity test needed for confirmation
Ct ≤35 Positive	Ct > 35 Negative	Inconclusive	Pathogenicity test needed for confirmation
Ct > 35 Negative	Ct > 35 Negative	Expected result for non-Cmm	Negative PCR-result, isolate is not Cmm

5. Identification by pathogenicity assay

- 5.1 Grow seedlings of a known susceptible tomato cultivar (e.g. Moneymaker) under suitable conditions until 2-3 true leaves have developed (about 3-4 weeks after sowing).
- 5.2 Dip a sterile toothpick directly in a fresh suspect colony on YDC medium and inoculate two tomato seedlings by stabbing the toothpick into the stem between the cotyledons and the first true leaf. Use the sharp (rather than blunt) end of the toothpick to avoid excessive damage while introducing inoculum. Include a reference Cmm strain as a positive control and do a mock inoculation with a clean toothpick as a negative control.
- 5.3 Incubate the inoculated plants at 25-32°C with a minimum of 8 hours daylight.
- 5.4 Observe the plants for symptoms starting 1 week after inoculation. Final observation is 3 weeks after inoculation. Compare with the positive and negative control.
 - Typical symptoms caused by Cmm are canker formation at the site of inoculation, yellowing and marginal necrosis, and/or wilting of true leaves.

Buffers and media

- Use de-ionized water.
- Autoclave buffers and media at 121°C, 15 psi for 15 minutes.
- Antibiotic (units/mg) activity is critical for the recovery of Cmm. The purity of an antibiotic, and therefore its activity, can vary from batch to batch.
- Antibiotics are not stable in time. Therefore, add antibiotics to the media at a relatively low temperature (< 50°C). Use plates within a month to maintain the selectivity of the media.

Seed extraction buffer (pH 7.4) per liter

Compound	Amount per liter
Na ₂ HPO ₄	7.75 g
KH ₂ PO ₄	1.65 g
Tween 20	0.2 ml
Na ₂ S ₂ O ₃ ¹	0.5 g

¹ Recommended when seeds have been treated with hypochlorite

CMM1T (pH 7.7) per liter (1, 4)

Compound	Amount per liter	Stock solution
Sucrose	10.0 g	

Trizma base (Tris base)*	3.32 g	
TrisHCl*	11.44 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g	
LiCl	5.0 g	
Yeast extract	2.0 g	
NH ₄ Cl	1.0 g	
Casein hydrolysate	4.0 g	
Agar	15 g	
Polymyxin B sulphate ¹	10 mg	10 mg/ml in distilled water
Nalidixic acid (salt) ¹	28 mg	sodium salt, 10 mg/ml in 0.1 M NaOH
Nystatin ¹	100 mg	100 mg/ml in 50% DMSO/ 50% ethanol

¹ Add after autoclaving

* The pH should be set by using both Tris base and TrisHCl rather than taking either one of the two compounds and setting with NaOH or HCl as that would increase salt concentration. Most importantly, this approach secures correct pH without any need for adjusting it when all ingredients have been added. The pH is very critical and most pH meters are less suitable for Tris buffers at high molarity.

SCM (pH 7.3*) per liter (3)

Compound	Amount per liter	Stock solution
Sucrose	10.0 g	
K ₂ HPO ₄	2.0 g	
KH ₂ PO ₄	0.5 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g	
H ₃ BO ₃ (boric acid)	1.5 g	
Yeast extract	0.1 g	
Agar	18 g	
Potassium tellurite ¹	10 mg ²	1 ml of 1% solution
Nicotinic acid ¹	100 mg	20 mg/ml in distilled water
Nalidixic acid (salt) ¹	30 mg	sodium salt, 10 mg/ml in 0.1 M NaOH
Nystatin ¹	100 mg	100 mg/ml in 50% DMSO and 50% ethanol

¹ Add after autoclaving

² This is a guideline. The concentration of potassium tellurite varies depending on the manufacturer and adjustment of the volume may be needed. The pH of the medium may influence the recovery of Cmm in the presence of potassium tellurite.

* Recommended pH before autoclaving.

SCMF (pH 7.3*) per liter (3, 4)

Compound	Amount per liter	Stock solution
Sucrose	10.0 g	
K ₂ HPO ₄	2.0 g	
KH ₂ PO ₄	0.5 g	
H ₃ BO ₃ (boric acid)	1.5 g	
Yeast extract	2.0 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g	

Agar	18 g	
Potassium tellurite ¹	10 mg ²	1 ml of 1% solution
Trimethoprim ¹	80 mg	10 mg/ml in 100% methanol
Nicotinic acid ¹	100 mg	20 mg/ml in distilled water
Nalidixic acid (salt) ¹	20 mg	sodium salt, 10 mg/ml in 0.1 M NaOH
Nystatin ¹	100 mg	100 mg/ml in 50% DMSO and 50% ethanol

¹ Add after autoclaving

² This is a guideline. The concentration of potassium tellurite varies depending on the manufacturer and adjustment of the volume may be needed. The pH of the medium may influence the recovery of Cmm in the presence of potassium tellurite.

* Recommended pH before autoclaving.

YDC (Yeast extract - dextrose - CaCO₃ Agar) per liter (5, 7)

Compound	Amount per liter
Yeast extract	10.0 g
D-glucose (dextrose)	20.0 g
CaCO ₃	20.0 g
Agar	15.0 g

References

1. Alvarez, A.M. and Kaneshiro, W.S. (1999) Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed. p. 93-97. In: J.W. Sheppard (ed.), Proc. 3rd Intl. Seed Testing Association Seed Health Symposium, Int. Seed Testing Assn., Zurich, Switzerland.
2. Berendsen S.M.H., Koenraad H., Woudt B. and Oosterhof J. (2011) The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. APS-IPPC Meeting, Honolulu (Hawaii), 6-10 August 2011.
3. Fatmi, W. and N.W. Schaad (1988) Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology* **78**: 121-126.
4. Koenraad, H., van Vliet, A., Neijndorff, N. and Woudt, B. (2009) Improvement of semi-selective media for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in seeds of tomato. *Phytopathology* **99**: S66 (Abstr.)
5. Schaad, N.W. Jones, J.B. and W. Chun (eds.) (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition. St Paul, USA: American Phytopathological Society Press.
6. Sudarshana, P., May, M., Kurowski, C., Thomas, S. (2012) Characterization of saprophytic bacteria that react with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in seed health testing. *Phytopathology* **102** (Supplement 4): S4.115.
7. Wilson, E.E., Zeitoun, F.M. and D.L. Fredrickson (1967) Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. *Phytopathology* **57**: 618-621.
8. Wu Y.D., Chen L.H., Wu X.J., Shang S.H., Lou J.T., Du L.Z., Zheng Y.Z. (2008) Gram-Stain-Specific-Probe-Based Real-Time PCR for Diagnosis of Bacterial Neonatal Sepsis. *Journal of Clinical Microbiology* **46(8)**: 2316-2319.

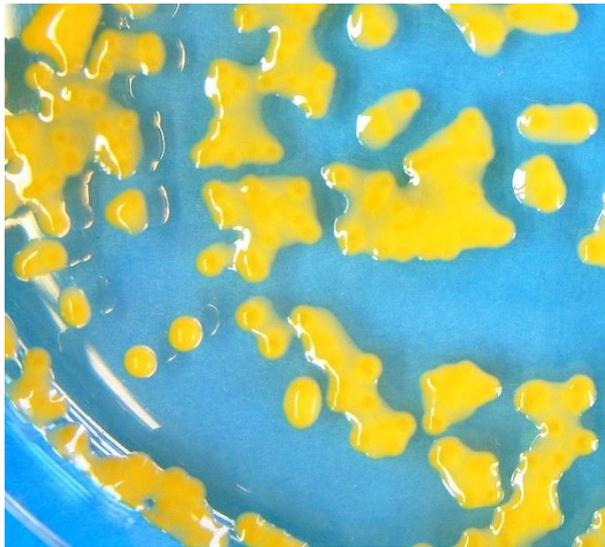


Figure 2. Cmm morphology after 10 days of incubation on CMM1T

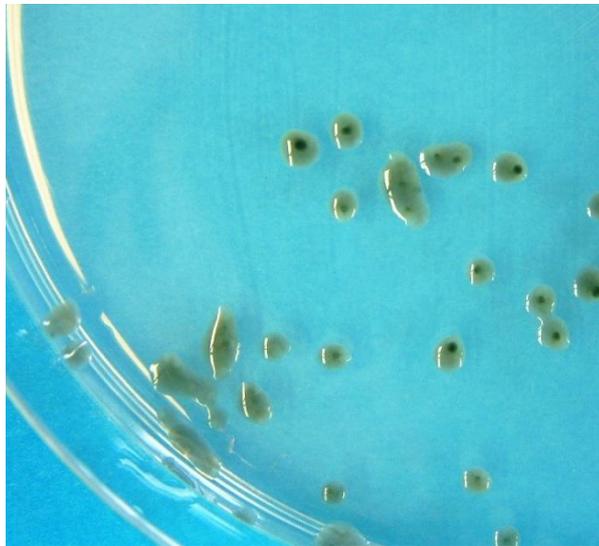


Figure 3. Cmm morphology after 10 days of incubation on SCM



Figure 4. Cmm morphology after 10 days of incubation on SCMF

Appendix 1

A. Preparation of Reaction Mixture for MVS21 TaqMan® PCR (4.2.3)

Compound	Final concentration	Volume (µl) in 25 µl
Sterile Milli Q water		6.9875
MVS21 Forward (100 pmol/µl)	0.50 µM	0.125
MVS21 Reverse (100 pmol/µl)	0.50 µM	0.125
MVS21 Probe (100 pmol/µl)	0.250 µM	0.0625
TaqMan® master mix (2x)		12.50
Wu-Forward (100 pmol/µl)	0.20 µM	0.05
Wu-Reverse(100 pmol/µl)	0.20 µM	0.05
Wu-Probe 1 (100 pmol/µl)	0.20 µM	0.05
Wu-Probe 2 (100 pmol/µl)	0.20 µM	0.05
Bacterial suspension		5.00

B. Preparation of Reaction Mixture for PTSSK TaqMan® PCR (4.3.3)

Compound	Final concentration	Volume (µl) in 25 µl
Sterile Milli Q water		6.9875
PTSSK Forward (100 pmol/µl)	0.50 µM	0.125
PTSSK Reverse (100 pmol/µl)	0.50 µM	0.125
PTSSK Probe (100 pmol/µl)	0.25 µM	0.0625
TaqMan® master mix (2x)		12.50
Wu-Forward (100 pmol/µl)	0.20 µM	0.05
Wu-Reverse(100 pmol/µl)	0.20 µM	0.05
Wu-Probe 1(100 pmol/µl)	0.20 µM	0.05
Wu-Probe 2(100 pmol/µl)	0.20 µM	0.05
Bacterial suspension		5.00

Anexo III

En este apartado se muestran las Tablas correspondientes a las gráficas de fluorescencia en función de los ciclos del Capítulo 4. Los valores de C_q se expresan como promedio (de duplicados) con su intervalo de confianza del 95% (cuando corresponde). (-) indica valores superiores a 35. NTC: *No template control*

Tabla A-1. Correspondiente a Figura 4-10

Muestra	Tipo	C_q
1004 QT	muestra	27,6
1013 QT	muestra	27,8
1030 QT	muestra	27,1
1040 QT	muestra	28,5
blanco QT	NTC	-
1004 RG	muestra	19,9
1013 RG	muestra	21,1
1030 RG	muestra	19,9
1040 RG	muestra	21,4
blanco RG	NTC	-

Tabla A-2. Correspondiente a Figura 4-11

[ADN]	Tipo	C_q
Ptssk 20 ng	Estándar	16,7 ± 0,1
Ptssk 2 ng	Estándar	20,4 ± 0,4
Ptssk 200 pg	Estándar	23,8 ± 0,1
Ptssk 20 pg	Estándar	26,7 ± 0,0
Ptssk 2 pg	Estándar	30,1 ± 0,4
Ptssk 0.2 pg	Estándar	-
Ptssk blanco	NTC	-
MVS21 20 ng	Estándar	17,9 ± 0,2
MVS21 2 ng	Estándar	21,0 ± 0,3
MVS21 200 pg	Estándar	24,7 ± 0,6
MVS21 20 pg	Estándar	27,2 ± 0,3
MVS21 2 pg	Estándar	30,9 ± 1,5
MVS21 0.2 pg	Estándar	-
MVS21 blanco	NTC	-

Tabla A-3. Correspondiente a Figura 4-13

[Cmm]	Tipo	C _q
10e6 ufc/ml SF	estándar	23,6 ± 0,6
10e5 ufc/ml SF	estándar	28,3 ± 0,9
10e4 ufc/ml SF	estándar	32,0 ± 1,0
10e3 ufc/ml SF	estándar	-
10e6 ufc/ml ES	estándar	23,6 ± 0,3
10e5 ufc/ml ES	estándar	27,3 ± 0,4
10e4 ufc/ml ES	estándar	31,3 ± 1,3
10e3 ufc/ml ES	estándar	34,7 ± 0,6
ES s/inoc	muestra	-
10e6 ufc/ml EP	estándar	26,8 ± 0,0
10e5 ufc/ml EP	estándar	30,0 ± 0,6
10e4 ufc/ml EP	estándar	33,9 ± 0,2
10e3 ufc/ml EP	estándar	-
EP s/inoc	muestra	-
blanco	NTC	-

Tabla A-4. Correspondiente a Figura 4-14

[Cmm]	Tipo	C _q
ctrl- ES	muestra	-
10 ufc/ml ES	muestra	29,0 ± 0,3
100 ufc/ml ES	muestra	28,6 ± 0,5
10e3 ufc/ml ES	muestra	25,0 ± 0,7
ctrl- EP	muestra	-
10 ufc/ml EP	muestra	29,1 ± 1,3
100 ufc/ml EP	muestra	31,4 ± 0,1
10e3 ufc/ml EP	muestra	28,0 ± 0,4
blanco	NTC	-

Tabla A-5. Correspondiente a Figura 4-16 (A)

Lote	Tipo	C _q
Lm-1	muestra	23,4 ± 0,2
Lm-2	muestra	-
Lm-3	muestra	-
Ctrl +	muestra	12,2 ± 0,3
Ctrl -	muestra	-
blanco	NTC	-

Tabla A-6. Correspondiente a Figura 4-23

Lote	Tipo	C_q
Ctrl- (P)	muestra	-
P1	muestra	-
P2	muestra	20,2 ± 0,2
P3	muestra	-
P4	muestra	21,9 ± 0,1
P5	muestra	18,3 ± 0,0
Ctrl- (C)	muestra	32,3 ± 0,1
C1	muestra	30,5 ± 0,1
C2	muestra	31,3 ± 0,6
C3	muestra	31,5 ± 1,4
C4	muestra	16,3 ± 0,0
C5	muestra	16,0 ± 0,1

