

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

DETECTION OF *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* IN TOMATO OF THE STATE OF SONORA, MÉXICO

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

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro. 8300, Hermosillo, Sonora, México. ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carr. a La Victoria Km. 06. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

³ Instituto de Ciencias Agrícolas. Carr. a Delta s/n. 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México. ⁴Laboratorio de Biología Molecular, Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California. Km 1.5 Carr. a San Felipe s/n, Col. Xochimilco. 21380, Mexicali, Baja California, México.

* Autor para correspondencia (jborboa@guayacan.uson.mx)

RESUMEN

El cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*) es una de las principales limitantes en la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el mundo. En México la producción de tomate ocupa 73 % de la producción de hortalizas. En el noroeste de México, específicamente en el Estado de Sonora, su producción se ha visto afectada por la aparición de enfermedades que causan pérdidas hasta de 100 %. El objetivo del presente trabajo consistió en la detección *Cmm* en tomate en el Estado de Sonora. Se muestreó semilla, hoja, tallo y fruto en nueve localidades del estado, ya sea en invernadero, casa sombra o campo a cielo abierto, previa inspección de surcos a pasos equidistantes, de acuerdo con las dimensiones de los cultivos. Se comprobó la presencia de *Cmm* mediante la prueba ELISA, cultivo en medio YDC y NBY, e identificación de colonias por medio de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Con PCR se aisló un fragmento de 279 pb del espaciador intergénico (16S-23S), del operón ribosómico específico de la subespecie *michiganensis*, y se secuenció un fragmento de aproximadamente 480 pb del ARNr 16S, el cual mostró una homología de 99 % con las secuencias de *Cmm* de las bases de datos públicas. La presencia de la bacteria en tomate representa un riesgo para los productores por lo que es necesario se realicen pruebas de diagnóstico en semillas de importación, para evitar su entrada al país.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

SUMMARY

Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* (*Cmm*) is one of the major limitations of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) production in the world. In México the tomato production represents 73 % of the vegetable production. Northwestern México, specifically the State of Sonora, has been affected by diseases that have caused losses of up to 100 %. The objective of this study was to detect *Cmm* in tomato in the State of Sonora, México. Seed, leaves, stems and fruits were collected in nine localities of the state, either in greenhouses, shade houses or opencast fields. *Cmm* was detected through ELISA, by culture in

YDC and NBY, followed by identification of colonies by biochemical tests and by PCR. A 279 bp fragment of the intergenic spacer (16S-23S) specific of the ribosomal operon of *Cmm* was amplified. Another fragment of approximately 480 bp of 16S rRNA was amplified and sequenced, which showed a 99 % homology with sequences of *Cmm* from public databases. The presence of the bacteria in tomato represents a risk for tomato producers. Therefore, it is necessary to carry out tests on imported seeds, to prevent its introduction to the country.

Index words: *Lycopersicon esculentum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

INTRODUCCIÓN

En México la horticultura es una actividad agrícola de importancia tanto en el plano social como en el económico, por la captación de divisas y la generación de empleos (Sandoval, 2004). Entre los factores limitantes para la producción de hortalizas se encuentran la enfermedades causadas por hongos como *Alternaria dauci* f. *solana* (Fritz *et al.*, 2006), *Botrytis cinerea* (Cotora y Silva, 2005), *Fluvial fulva* (Pierre *et al.*, 1985), *Laveillula taurina* (Kasselaki *et al.*, 2006); entre las bacterias fitopatógenas están *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Hadas *et al.*, 2005; Cooksey, 1990), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Boch *et al.*, 2002), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (OEPP/EPPO, 1992) y *Pseudomonas corrugata* (Nico *et al.*, 2006); además, hay enfermedades causadas por fitoplasmas (Gungoosingh-Bunwaree *et al.*, 2007), virus (Amari *et al.*, 2008) y nematodos (Cadet y Thioulouse, 1998). Tales enfermedades provocan grandes pérdidas económicas (Polston y Anderson, 1997).

Los problemas fitosanitarios se han acrecentado debido, en parte, a la falta de un diagnóstico certero y oportuno que permita a los productores manejar apropiadamente el impacto de las enfermedades. Tradicionalmente, la observación de síntomas por el técnico de campo o el propio productor ha sido la estrategia para diagnosticar y tratar las enfermedades, lo cual no es lo más apropiado ya que diferentes patógenos pueden provocar enfermedades con sintomatología similar, o bien ésta puede deberse a la conjunción de un patógeno con algún factor biótico, como toxicidad de agroquímicos o deficiencia/exceso de ciertos minerales del suelo. Es decir, el diagnóstico correcto del agente causal del problema es clave para el manejo integrado de enfermedades (Sandoval, 2004).

Un diagnóstico preciso requiere del auxilio de técnicas bioquímicas, microbiológicas y moleculares (Barnes, 1994). El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es afectado por el cancro bacteriano (OEPP/EPPO, 2005), el cual se encuentra en todas las zonas productoras de tomate del mundo y se considera una enfermedad poco frecuente pero severa y de gran importancia económica (Chang *et al.*, 1991). El agente causal de esta enfermedad fue conocido hasta 1983 como *Corynebacterium michiganensis*, pero actualmente se clasifica como *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*) (Gleason *et al.*, 1993). Esta bacteria en un bacilo Gram positivo, no móvil, aeróbico, productor de cápsula, que en agar nutritivo desarrolla colonias de color amarillo claro a naranja, mucoso, cuya temperatura óptima de crecimiento *in vitro* es de 25 a 28 °C (Schaad *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2001).

La bacteria se transmite por semilla infectada y posteriormente penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátides de la hoja (Gleason *et al.*, 1993). El marchitamiento marginal de folíolos es uno de los primeros síntomas en plantas de todas las edades. Posteriormente aparecen estrías necróticas que se extienden desde la parte inferior del peciolo hasta el punto que se une con el tallo, ya que la bacteria es un invasor sistémico de tejidos del floema, médula y corteza. Finalmente la planta se necrosa y se marchita, y es característico que los bordes de folíolos inferiores aparezcan secos y curvados hacia abajo, y que luego adquieran un color castaño y necrótico con el peciolo unido al tallo. Bajo ciertas condiciones, las manchas necróticas se abren y forman canchales, como fuente de infecciones secundarias.

Las plantas enfermas pueden sobrevivir hasta la cosecha y esporádicamente en el fruto forman pequeñas manchas necróticas rodeadas de un halo claro, que se conoce como “ojo de pájaro o de pavo” (Blancar,

1996). Desde el primer informe de la enfermedad causada por *Cmm* en los EE. U.U., el cancro bacteriano se ha dispersado en el mundo y ha causado pérdidas serias a las cosechas de tomate del invernadero y del campo, porque mata plantas jóvenes y reduce la producción comercial. La reducción en la producción se puede asociar con la pérdida directa de la planta, o con frutos de menor tamaño y cantidad. En Canadá se han registrado pérdidas de producción de 20 % o mayores (Dhanvantari, 1989, 1993); en Francia de 20 a 30 % (OEPP/EPPO, 2005; Rat *et al.*, 1991); en EE. UU. de 46 % (Chang *et al.*, 1992); y de 10 % por pérdida de la planta en Australia (Dullahide *et al.*, 1983).

A pesar de que la enfermedad se consideraba confinada en los estados del noroeste de los EE. UU., en Sinaloa, México se detectó e identificó el cancro bacteriano en el Valle de Culiacán, y de 1994 a 1996 se extendió rápidamente y se estableció en las principales áreas hortícolas de exportación de los Estados de Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur y Baja California Norte (Holguin-Peña *et al.*, 2006). Hasta la fecha, se han presentado daños en 200 ha en sistemas de producción protegida, con pérdidas de comercialización estimadas en 40 millones de dólares. En el 2006 la producción nacional de tomate fue de aproximadamente 995 000 t, y el Estado de Sonora tiene el décimo lugar con 2.7 % de la producción total, después de Sinaloa (28 %), Michoacán (11.3 %), San Luis Potosí (10.8 %), Zacatecas (9.8 %), Morelos (7.0 % en invernadero), Nayarit (4.7 %), Baja California Sur (2.9 %), Jalisco (3.8 %) y Baja California (2.7 %) (SIAP, 2008). Sonora cuenta con 1705 ha de tomate: 15 % en invernadero, 75 % en casa sombra y 10 % a cielo abierto (SIAP, 2008). El objetivo del presente trabajo fue determinar si *Cmm* está presente en el tomate del Estado de Sonora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

La investigación se efectuó en el ciclo agrícola 2006 en terrenos de siembra de tomate en modalidad invernadero, casa sombra y campo a cielo abierto en el Estado de Sonora, México, estado que se ubica en el noroeste de México, entre 32° 29' y 26° 18' LN y entre 108° 25' y 115° 03' LO (INEGI, 2000).

Muestreo de semilla

La semilla aquí utilizada fue donada por la Confederación Nacional de Productores Hortícolas del Estado de Sonora, o adquirida en casas comerciales de agro-insumos de la región. Las semillas recolectadas

fueron depositadas en bolsas de papel previamente identificadas y trasladadas al Laboratorio de Fitopatología del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Mexicali, Baja California.

Muestreo en plantas (plántula, hoja desarrollada y fruto)

Las localidades de muestreo fueron: San Luis Río Colorado, Imuris, Sáric, San Ignacio, Benjamín Hill, Costa de Hermosillo, Valle de Empalme, Valle del Yaqui y Valle del Mayo. El muestreo se hizo en sistemas de siembra de: invernaderos, casa sombra y campo a cielo abierto, previa inspección de surcos a pasos equidistantes, de acuerdo con las dimensiones de los sitios de cultivo. Este sistema permite obtener un intervalo de confianza mínimo de 95 % en la detección, en niveles de infección de 0.1 % y con 5 % de confiabilidad en el muestreo (IPFSAPH, 2001). Los síntomas buscados fueron los atribuibles a la bacteria *Cmm*, descritos anteriormente (Chang *et al.*, 1992; Gleason *et al.*, 1993; Blancar, 1996). Cada muestra colectada se identificó, y se envolvió con papel húmedo, luego se colocó en una hielera para ser trasladada al laboratorio para los análisis fitopatológicos.

Aislamiento e identificación

Se obtuvo savia de las plantas colectadas mediante macerado en mortero de porcelana, y una porción se sembró en tres cajas de petri con diferentes medios de cultivo: YDC (extracto de levadura 1 %, D-glucosa 2 %, CaCO_3 2 %, agar 1.2 %); agar B de King (peptona 2 %, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.15 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 %, agar 1.5 %, glicerol 1.5 %) y NBY (Caldo nutritivo 0.8 %, extracto de levadura 0.2 %, K_2HPO_4 0.2 %, KH_2PO_4 0.025 %, agar 1.5 %). Las cajas se incubaron a 29 °C por 48 h, y a las colonias resultantes se les hicieron pruebas morfológicas y bioquímicas de acuerdo con las recomendaciones de OEPP/PEPO (2005) y de Schaad *et al.* (2000).

Detección serológica

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

Extracción del ADN genómico total a partir de tejido vegetal

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

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

Se amplificó el espaciador intergénico situado entre los genes ribosomales 16S y 23S, mediante los iniciadores PSA-4: 5'-TCA-TTG-GTC-AAT-TCT-GTC-TCC-C-3' y PSA-R: 5'-TAC-TGA-GAT-GTT-TCA-CTT-CCC-C-3', de acuerdo con las especificaciones de Pastrik y Rainey (1999), y se amplificó un fragmento de 270 pb. También por PCR se amplificó un fragmento de ADNr 16S, de 480 pb, con los iniciadores fD1 y rP2 y las condiciones de PCR desarrolladas por Weisburg *et al.* (1991). Los fragmentos de PCR se enviaron a secuenciar a la Universidad de San Diego, Cal. EE. UU., y mediante BLAST los resultados se compararon con las bases de datos públicas disponibles, en el GenBank (Benson *et al.*, 2008).

El volumen total de la reacción fue de 25 µL y como testigo positivo se utilizó ADN genómico extraído de una cepa de referencia. Como testigo negativo se utilizó agua grado biología molecular. Los componentes de la mezcla de reacción fueron: amortiguador para la reacción 1X, iniciadores PSA-4 y PSA-R (2 ng µL⁻¹), MgCl_2 (1.5 mM), dATP, dCTP, dGTP (200 µM), 1 unidad de *Taq* polimerasa y 50 ng de ADN genómico. La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research®) y las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C/2.5 min, seguido de 40 ciclos con 3 segmentos: 94 °C/30 s, hibridación a 63 °C/20 s, y extensión a 72 °C/45 s; la polimerización final se hizo a 72 °C por 5 min.

La electroforesis se hizo en gel de agarosa 2 %. Se utilizó amortiguador TBE (0.5 M, pH 8.3) y al preparar el gel se adicionó bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg mL⁻¹ (Sambrook y Russell, 2001). Se mezclaron 10 µL del producto de PCR con 2 µL de buffer de carga 5X (xilencianol 0.125 %, azul de bromofenol 0.125 %, glicerol 50 %, en TBE 1X) y se cargaron en el gel. Se utilizó el marcador de peso molecular de 0.1 a 2.0 kpb (Invitrogen®). Se aplicó una carga de 100 volts por

40 min; al terminar el gel se colocó sobre un transiluminador UV y los resultados se registraron con el sistema digital BioDoc-it® (UVP, Inc.). El árbol de homología se obtuvo de la comparación de las secuencias en el programa DNAMAN® versión 6.0 (Lynnon Corp.).

Pruebas de patogenicidad

Preparación del inóculo. Un cultivo bacteriano de 24 h en caldo NBY, se centrifugó por 15 min a 3900 g y el precipitado se resuspendió en solución salina a 0.85 % estéril, para eliminar los fragmentos del medio de cultivo; se centrifugó nuevamente y se estandarizó el inóculo a una turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Se tomó una alícuota de 1 mL para hacer diluciones seriadas hasta 10^{-4} y así conocer el número aproximado de células viables. Las diluciones se sembraron en placas con medio NBY por difusión, en volumen de 0.1 mL sobre agar, la solución bacteriana se diseminó con una varilla de arrastre, y se incubaron a 30 °C por 48 h (Madigan *et al.*, 2006). Este inóculo de 1×10^6 UFC mL⁻¹ se utilizó para las pruebas de patogenicidad en semilla, plántula y fruto del tomate cv. 'Pony Express F1'.

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

Pruebas de patogenicidad en plántula. Se tomaron 200 semillas previamente desinfestadas como se mencionó anteriormente, que se germinaron en placas con sustrato estéril (mismas características anteriores), a 25 °C; el riego se hizo con agua estéril. Después de 30 d de la emergencia, se inocularon 10 plántulas con la suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de *Cmm*, de las siguientes cuatro maneras: 1) Por aspersión directa sobre la planta; 2) Por punción en tallo; 3) Por punción en el peciolo; 4) Por lijado de hoja e inoculadas con un cotonete de algodón. En cada tratamiento se utilizaron 10 plántulas como testigo negativo, que pasaron por los mismos procesos mencionados anteriormente pero con agua destilada estéril. Todo el material utilizado durante el muestreo y las pruebas de patogenicidad, así como el material biológico y peat-moss empleado en las pruebas de patogenicidad, fueron esterilizados para su desecho y posteriormente se enviaron a un incinerador, para asegurar que no hubiese diseminación al ambiente y la contaminación de otros sistemas de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las 237 muestras analizadas, de las cuales 8 fueron de raíz, 11 de tallo, 189 de hojas, 15 de frutos y 14 de semilla, provenían de nueve localidades. De éstas se obtuvieron resultados diferentes en función de la técnica utilizada. Se detectó crecimiento de colonias sospechosas de *Cmm* en dos localidades (San Ignacio y Benjamín Hill), con sistemas de siembra en casa sombra e invernadero respectivamente, lo que correspondería a una incidencia de 0.27 y 0.11 %, respectivamente. En ambos casos las plantas presentaron un grado de severidad leve en etapa inicial, y sólo algunas un grado de severidad avanzado (Figura 1).



Figura 1. Plantas de tomate con síntoma inicial de daño por *Cmm* (izquierda), y con síntoma avanzados de *Cmm* (derecha).

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

Detección, aislamiento e identificación

Detección serológica. Por medio de la técnica de ELISA se detectaron cinco muestras positivas de *Cmm*, tres de tallo, una de hoja y una de semilla (Cuadro 1), mediante el juego comercial recomendado por las normas OEPP/EPPO (2005) para la detección presuntiva de la enfermedad en tomate. Esta técnica es la recomendada cuando se va a analizar un número grande de muestras, ya sea de material vegetal o bien de colonias aisladas. En este trabajo únicamente se utilizó para la detección directa en el material vegetal, por lo que sólo se puede concluir que esta técnica fue útil en la detección primaria de la

bacteria; es decir, dio idea de la presencia del patógeno en las plantas, pero sin analizar colonias aisladas.

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

Detección e identificación por técnicas moleculares.

Se detectó la presencia de *Cmm* por la amplificación mediante PCR de un fragmento de ADN específico de 270 pb. Las siete muestras positivas fueron dos de tallo, dos de hoja y tres de semilla (Figura 2). La presencia de *Cmm* se corroboró una vez que fueron aisladas las colonias mediante PCR, con los mismos resultados de amplificación del fragmento de 270 pb (datos no mostrados). La identificación de las colonias se hizo mediante la secuenciación del fragmento de 480 pb, amplificado por PCR del ADNr. Se encontró que los fragmentos obtenidos pertenecen a cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, ya que al compararlas con las secuencias de las bases de datos públicas mostraron una homología de 99 %. La Figura 3 muestra el árbol de similitud de las secuencias de dos de las cepas aisladas (D y H); la cepa D pertenece a los aislamientos de la localidad de San Ignacio, con sistema de siembra en casa sombra, mientras que la cepa H proviene del sitio Benjamín Hill con sistema de invernadero.

Cuadro 1. Número de muestras positivas para *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, sobre el total de muestras analizadas, de acuerdo con el método y órgano analizado de la planta.

Localidad	Sistema de siembra	ELISA					PCR				
		Semilla	Raíz	Tallo	Hoja	Fruto	Semilla	Raíz	Tallo	Hoja	Fruto
San Luis Río Colorado	Cielo abierto	0/1	0/0	0/2	0/14	0/0	0/1	0/0	0/2	0/14	0/0
Imuris	Invernadero	0/4	0/3	1/2	0/19	0/3	1/4	0/3	1/2	1/19	0/3
Sáric	Casa sombra	0/0	0/1	0/1	0/13	0/0	0/0	0/1	0/1	0/13	0/0
San Ignacio	Casa sombra	1/4	0/2	1/3	1/28	0/3	1/2	1/3	1/3	1/28	0/3
Benjamín Hill	Invernadero	0/0	0/0	1/1	0/22	2/2	1/3	0/1	0/1	0/22	0/2
Costa de Hermosillo	Casa sombra	0/1	0/0	0/0	0/19	0/1	0/1	0/0	0/0	0/19	0/1
Valle de Empalme	Casa sombra	0/0	0/0	0/0	0/21	0/1	0/0	0/0	0/0	0/21	0/1
Valle del Yaqui	Casa sombra	0/2	0/0	0/2	0/30	0/3	0/1	0/0	0/2	0/30	0/3
Valle del Mayo	Casa sombra	0/2	0/2	0/0	0/23	0/2	0/2	0/2	0/0	0/23	0/2



Figura 2. Fragmento de ADN específico de la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* obtenido de muestras de diversos tejidos de la planta de tomate con síntomas de cancro bacteriano. Columnas: de 1 y 17 marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder); 2 y 3, testigos positivos; 4, testigo negativo; 5 y 6, tallo (+); 7, tallo (-); 8 y 9, hoja (+); 10, 11 y 12, hoja (-); 13, semilla (-); 14, 15 y 16, semilla (+).

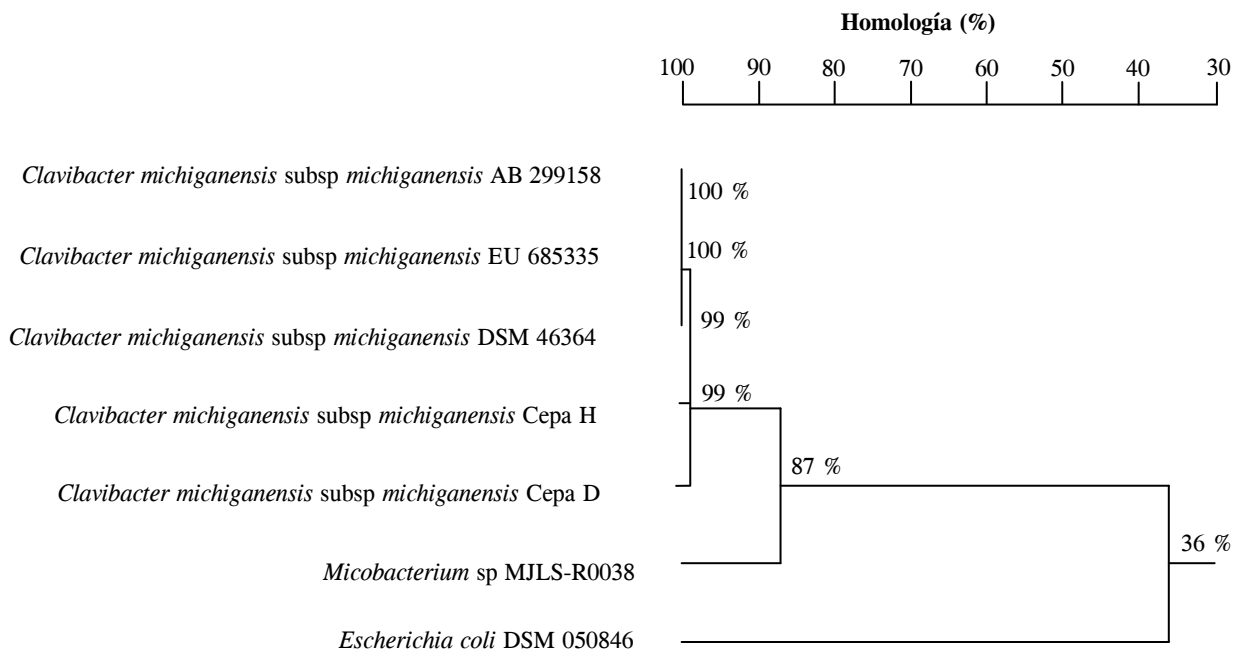


Figura 3. Árbol de homología obtenido en la comparación de secuencias del fragmento del ADN_r amplificado de las cepas H y D aisladas, contra tres secuencias parciales de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, de *Micobacterium* spp. y *Escherichia coli*.

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

en sus genes ribosómicos, la cual es mayor que para otras especies y subespecies del mismo género.

Pruebas de patogenicidad

Las semillas de ambas variedades susceptibles y tolerantes que fueron tratadas con la solución bacteriana germinaron a las 48 h, y a los 7 d alcanzaron un altura de 5 cm; la plántulas fueron marchitándose progresivamente hasta morir totalmente por efecto de la solución bacteriana, mientras que la semilla tratada con agua destilada no manifestó síntoma alguno y continuó su crecimiento (Figura 4).



Figura 4. Plántulas de 20 d tratadas con inóculo bacteriano de *Cm* (izquierda) y tratadas con agua destilada estéril (derecha).

Las plantas que fueron tratadas con el inóculo bacteriano mediante aspersión directa sobre la planta, mostraron síntomas a los 3 d de incubación, mientras que las inoculadas por punción en tallo y peciolo, lijado de hoja e inoculadas con la ayuda de un cotonete de algodón, mostraron síntomas a los 5 d después de la inoculación; a los 17 d las plantas estaban completamente secas, en contraste con las plantas testigo inoculadas con agua estéril, en las que no se observaron síntomas de marchitez. Esto confirma que los aislamientos obtenidos corresponden al agente causal de la enfermedad y que se trata de una cepa fuertemente virulenta, por lo que es necesario se busque la forma de controlarla en los sistemas agrícolas aislados, y de evitar su diseminación.

CONCLUSIONES

No fue posible determinar la procedencia de la infección, ya que no se encontró algún otro caso en plantaciones de tomate ni tampoco en semilla muestreadas.

En el Estado de Sonora, México, la enfermedad conocida como marchitez bacteriana en tomate, inducida por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, está presente en sistemas de producción bajo invernadero y casa sombra, así como en semilla, y fue detectable tanto por técnicas de aislamiento en medios de cultivo y ELISA, como por la reacción en cadena de la polimerasa. Sin embargo, no se encontraron síntomas de la enfermedad en plantaciones de tomate en campos a cielo abierto.

AGRADECIMIENTOS

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal por el apoyo en instalaciones, equipo, reactivos y conocimientos: Armando Pulido Herrera, Gabriela Juárez López, Enrique Montaña Quintana, y al Centro de Investigación en

Alimentación y Desarrollo, A. C., a Rosalva Pérez Morales y al Ing. Ernesto Rascón Rascón, por su ayuda en el muestreo de las plantas. Al CONACYT por la beca asignada a Jesús Borboa para la realización de sus estudios de doctorado. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por el proyecto aprobado 12067 "Detección de bacterias de importancia cuarentenaria en la zona noroeste de México".

BIBLIOGRAFÍA

- Amari K, D Gonzalez-Ibeas, P Gómez, R N Sempere, M A Sanchez Pina, M A Aranda, J A Diaz-Pendon, J Navas-Castillo, E Moriones, J Blanca, M D Hernandez-Gallardo, G Anastasio (2008) Tomato torrado virus is transmitted by *Bemisia tabaci* and infects pepper and eggplant in addition to tomato. *Plant Dis.* 92:1139.
- Ausubel F M, R Brent, R E Kingston, D D Moore, J G Seidman, J A Smith, K Struhl (2002) Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. Inc. 1512 p.
- Barnes L W (1994) The role of plant clinics in disease diagnosis and education. A North American Perspective. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:601-609.
- Basim E, H Basic, E R Dickstein, J B Jones (2004) Bacterial Canker caused By *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on greenhouse-grow tomato in the western Mediterranean region of Turkey. *Plant Dis.* 88:1048.
- Benson D A, I Karsch-Mizrachi, D J Lipman, J Ostell, D L Wheeler (2008) GenBank. *Nucleic Acids Research* 36, Database issue D25-D30. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Blancar D (1996) Enfermedades del Tomate. INRA Estación de Patología. Ed. Mundi-Prensa. España. 109 p.
- Boch J, V Joardar, L Gao, T Robertson, M Lim, N B Kunkel (2002) Identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Microbiol.* 44:73-88.
- Cadet P, J Thioulouse (1998) Identification of soil factors that relate to plant parasitic nematode communities on tomato and yam in the French West Indies. *Appe. Soil Ecol.* 8:35-49
- Chang R J, S M Rie, J K Pataky (1991) Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* by practices used to produce tomato plants. *Phytopathology* 81:1276-1281.

- Chang R J, S M Ries, J K Pataky (1992) Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* 82:553-560.
- Chomczynski P, K Mackey, R Drews, W Wilfinger (1997) DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* 22:550-553.
- Cooksey D A (1990) Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:201-19.
- Cotoras M, E Silva (2005) Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *Mycologia* 97:485-92.
- Dhanvantari B N (1989) Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. *Can. J. Plant Pathol.* 11:400-408.
- Dhanvantari B N (1993) Seed-borne infection in tomato bacterial canker. *Proc. 9th Annual Tomato Disease Workshop*. Orlando, FL, USA. pp:33-36.
- Dullahide S R, M L Moffett, J B Heaton, J Giles (1983) Effect of time of inoculation of *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* on yield of trellised tomatoes. *Austr. Plant Pathol.* 12:15-16.
- Fritz M, I Jakobsen, M F Lyngkaer, C H Thordal, J Ponskühnemann (2006) Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16:413-419.
- Gleason M, E J Braun, R H Peterson (1993) Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 81:1519-1523.
- Gungoosingh-Bunwaree A, A Bertaccini, S P Benimadhu (2007) Presence of phytoplasma infections in tomato plants in Mauritius. *Bull. Insectology* 60:151-152.
- Hadas R, G Kritzman, F Klietman, T Gefen, S Manulis (2005) Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol.* 54:643-649.
- Holguín- Peña R J, R C Vázquez-Juárez, E O Rueda-Puente (2006) Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Dis.* 90:1150.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (2000) Sistemas Nacionales de Estadística y de Información Geográfica. Disponible en: <http://imágenes.google.com.mx> (Julio 2006).
- IPFSAPH, International Portal for Food Safety, Animal and Plant Health (2001) National Seed Health System: Reference Manual B (Seed Health Testing and Phytosanitary Field Inspection Methods Manual). Disponible en: <http://www.ipfsaph.org/servlet/CDS> (Febrero de 2005).
- Jones J B, J P Jones, R E Stall, T A Zitter (2001) Plagas y Enfermedades del Tomate. Sociedad Americana de Fitopatología. Ed. Mundi-Persa, España. pp:26-32.
- Kasselaki A M, M W Shaw, N E Malathrakakis, J Haralambous (2006) Control of *Leveillula taurina* in tomato by *Acremonium alternatum* is by induction of resistance, not hyperparasitism. *Eur. J. Plant. Pathol.* 115:263-267.
- Li X, S H De Boer (1995) Comparison of 16S ribosomal RNA genes in *Clavibacter michiganensis* subspecies with other Coryneform bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:925-929.
- Madigan M T, J M Martinko, J Parker (2006) Brock, Biología de los Microorganismos. 10a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid. pp:142-149.
- Nico A I, A M Alioui, B E Dal, L B Ronco (2006) Interacción de *Pseudomonas corrugata* y *Pseudomonas viridiflava* y diferentes genotipos de tomate. *Rev. Fac. Agron.* 106:37-45.
- OEPP/EPPO (2005) Diagnostic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 7/42(1). OEPP/EPPO Bull. 35:271-273.
- OEPP/EPPO (1992) Quarantine procedures. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - seed-testing method. EPPO/EPPO Bull. 22:247-252.
- Pastrik K H, F A Rainey (1999) Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathol.* 147:687-693.
- Pierre J G, E H Ans, C M Grardy, A K Joseph (1985) Isolation and characterization of an ecitor of necrosis isolated from intercellular fluids of compatible interactions of *cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*) and tomato. *Plant Physiol.* 77:642-647.
- Polston J E, P K Anderson (1997) The emergente of whitefly transmitted geminivirus in tomato in the Western hemisphere. *Plant Dis.* 81:1358-1370.
- Rat B, J Poissonnier, M J Goisque, A Burgaud (1991) Le point sur le chancre bactérien. *Fruit et Legumes* 86:38-40.
- Sambrook J, D W Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 999 p.
- Sandoval B C (2004) Manual Técnico. Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos Agricultura y la Alimentación. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. 53 p.
- Schaad N W, J Jones B, W Chun (2000) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria. Ed. APS Press. U.S.A. pp:1-15.
- SIAP, Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (2008) Anuario Agropecuario 1980 al 2006. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx> (Febrero de 2008).
- Weisburg W G, S M Barns, D A Pelletier, D J Lane (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.