

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BACTERIAS PATÓGENAS QUE AFECTAN A LOS CULTIVOS DE TOMATE.

María Inés Siri¹, Valentina Croce¹, María Inés Lapaz¹, Florencia Hernández¹, María José Montelongo², Matías González³, Diego Maeso³, María Julia Piannzola¹

¹ Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay.

² Cátedra de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Av. Garzón CP 12900, Montevideo, Uruguay.

³ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Estaciones experimentales Las Brujas y Salto Grande).

msiri@fq.edu.uy, mpianzzo@fq.edu.uy

Palabras clave.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas* spp., MLSA-MLST, qPCR, control preventivo.

Resumen.

Las enfermedades bacterianas constituyen un grave problema para la producción de tomate (*Solanum lycopersicon*) tanto en condiciones de cultivo a campo como protegido. Ante la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para el desarrollo bacteriano, se hace muy difícil su manejo pudiendo ocasionar importantes pérdidas en los cultivos. En general, se considera que la estrategia más eficiente para lograr un control efectivo de estas enfermedades es apuntar a un control preventivo, evitando que el patógeno entre en contacto con el cultivo. Para ello, es necesario implementar acciones coordinadas entre los actores que intervienen a diferentes niveles para el control de la enfermedad: proveedores de semilla, viveristas, productores, técnicos e investigadores.

En este trabajo se presentan los avances de investigación en relación al estudio de dos importantes bacterias patógenas de tomate: *Xanthomonas* spp., agente causal de la mancha bacteriana y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), responsable del cancro bacteriano del tomate. Estos estudios fueron realizados en el marco del Proyecto CSIC Grupos I+D "Fitopatógenos de importancia hortícola" que reunió la participación de investigadores de Facultad de Química, Facultad de Agronomía e INIA. Los trabajos realizados se enfocaron a generar conocimiento sobre el tipo de cepas presentes en nuestro país, su variabilidad genética, principales vías de infección y diseminación; información esencial para establecer estrategias de control eficiente. Además, estos estudios permitieron desarrollar herramientas moleculares de identificación, tipificación y diagnóstico, que podrán ser aplicadas para el control de estos patógenos. Por último, los recursos humanos y capacidades de investigación generados a través de este proyecto podrán ser adaptados para el estudio de otros fitopatógenos de relevancia para el sistema productivo.

La mancha bacteriana del tomate causada por *Xanthomonas* spp.

Entre los problemas sanitarios más importantes del cultivo de tomate se encuentra la enfermedad conocida como "mancha bacteriana", causada por bacterias del género *Xanthomonas* (EPPO-PQR, 2015). En Uruguay, se la considera el problema fitosanitario más importante en años lluviosos y cálidos, distribuyéndose en todas las áreas de producción

(Berrueta et al., 2014). Puede afectar todas las partes vegetativas de la planta. En todos los casos reduce la productividad por la destrucción del follaje y la caída de flores y frutos en formación. También tiene grandes efectos en la disminución de la calidad del producto, tanto para el consumo directo como para el procesamiento industrial.

Originalmente el agente causal de la mancha bacteriana en tomate se asignó a un único taxón, *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Sin embargo, actualmente se acepta que las cepas de *Xanthomonas* que afectan a los cultivos de tomate y morrón constituyen un grupo heterogéneo formado por cuatro especies: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri* (Jones et al., 2004).

Trabajos previos realizados en Uruguay permitieron generar una colección muy completa de cepas de *Xanthomonas* aisladas a partir de frutos de tomate con síntomas típicos de mancha bacteriana (Montelongo, 2012). Esta colección fue caracterizada mediante determinación de razas, evaluación de resistencia a sulfato de cobre y antibióticos y comparación de la agresividad de los aislamientos (Montelongo, 2012). Sin embargo, no se conocían las especies de *Xanthomonas* predominantes en nuestro país, información esencial para seleccionar las fuentes de resistencia a utilizar en el programa de mejoramiento genético de tomate que se desarrolla en INIA, así como para establecer medidas de vigilancia epidemiológica de este patógeno. En base a estos antecedentes, nos propusimos avanzar en la identificación de las especies de *Xanthomonas* que afectan los cultivos de tomate en Uruguay mediante el uso de diferentes métodos moleculares.

El cancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*).

El cancro bacteriano del tomate es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta a este cultivo a nivel mundial (EPPO, 2013). Se trata de una enfermedad con un amplio rango de síntomas. En el campo, puede manifestarse como un marchitamiento generalizado o sistémico que causa la muerte de la planta (cancro primario) y/o como una fase foliar no sistémica (cancro secundario) que ocasiona un quemado característico de los márgenes de las hojas (Agrios, 2005).

La semilla infectada es el principal origen de infección y disseminación de este patógeno (de Leon et al, 2011). Una vez que está presente en el cultivo tiene la capacidad de diseminarse fácilmente, afectando a todas las plantas en parcelas o invernaderos en cuestión de semanas (Sharabani et al., 2013). *Cmm* no es un patógeno de suelo, sin embargo, se ha comprobado que puede sobrevivir por períodos de más de 3 años cuando se asocia a restos de cultivos, lo que representa una vía alternativa de infección (Chang et al., 1991). También puede diseminarse de manera mecánica por las manos, herramientas de trabajo, poda y otras labores culturales (Eichenlaub et al., 2006). Las infecciones latentes en plántulas asintomáticas también contribuyen a su disseminación ya que al ser transplantadas a campo o invernáculo constituyen una fuente de inóculo adicional (Gitatis et al., 1991).

La mejor estrategia de control de esta enfermedad es el control preventivo y el uso de semillas sanas es la principal medida a la que se debe apuntar. Está reportado que la existencia de 1 sola semilla infectada en un lote de 10.000 es suficiente para iniciar una epidemia en condiciones ambientales favorables (de León et al., 2008). El tratamiento químico o térmico de las semillas ha demostrado una reducción de los niveles de contaminación por *Cmm*, pero estos métodos no existe ningún método que asegure la completa erradicación del patógeno de la semilla de tomate sin afectar su germinación (de Leon et al., 2008; Sen et al., 2015).

Para asegurar un estricto control de la calidad fitosanitaria de la semilla, muchos países han adoptado medidas cuarentenarias. En Europa, *Cmm* ha sido clasificado como plaga

cuarentenaria tipo A2, y la introducción de semilla de tomate está estrictamente regulada (EPPO, 2013). En Uruguay, *Cmm* no figura como plaga cuarentenaria ni regulada según las disposiciones establecidas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Por lo tanto actualmente no se realiza ningún control fitosanitario a las semillas de tomate que ingresan al país. Sin embargo, se hace evidente la necesidad de contar con capacidades que nos permitan evaluar la calidad fitosanitaria de semilla comercial. En este contexto, los objetivos de este trabajo en relación a *Cmm* fueron: i) realizar un relevamiento de las cepas de *Cmm* que afectan los cultivos de tomate en Uruguay, ii) optimizar diferentes métodos moleculares para la identificación y tipificación de las cepas aisladas, y iii) desarrollar métodos moleculares de diagnóstico de *Cmm* en material de propagación (semilla y plántulas).

Metodología.

Aislamiento, cultivo y conservación de las cepas.

Se analizó una colección de 111 cepas de *Xanthomonas spp.* causantes de mancha bacteriana del tomate generada en el marco de la Tesis de Maestría de la Ing. Agr. María José Montelongo. Los aislamientos se realizaron a partir de frutos con síntomas atribuibles a mancha bacteriana provenientes de predios ubicados en el departamento de Canelones durante el período 2007-2012.

Por otro lado, se analizaron 33 cepas de *Cmm* aisladas durante el período 2011-2015, a partir de cultivos de tomate con síntomas de cancro de la zona sur (Montevideo, Canelones y San José) y de la zona norte (Salto). También se incluyeron en el análisis 22 cepas aisladas de brotes previos de cancro bacteriano, las cuales fueron aportadas por el Ing. Agr. Enrique Verdier (DGSA-MGAP) y Elisa Silvera (Facultad de Agronomía).

El cultivo de las cepas de *Cmm* y *Xanthomonas* se realizó en medio agar nutriente dextrosa (NAD) o agar nutriente extracto de levadura (NBY), incubando las placas a 28°C durante 48-72 hs. Las cepas son conservadas por congelamiento a -70°C y forman parte de la colección de Microorganismos de Importancia Agrícola e Industrial (MAI) del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química.

Caracterización molecular de las cepas de *Xanthomonas* y *Cmm*.

La extracción ADN de las cepas se realizó a partir de cultivos líquidos en caldo NBY incubados a 28°C por 24 hs, utilizando protocolos clásicos de extracción para bacterias gram negativas (*Xanthomonas*) y gram positivas (*Cmm*) (Sambroock and Russell, 2001).

Se utilizaron dos abordajes moleculares diferentes para identificar los aislamientos de *Xanthomonas spp.* a nivel de especie.

Por un lado, se realizó la amplificación utilizando el método de multiplex-PCR desarrollado por Araújo y colaboradores (2012) para la identificación de las cuatro especies de *Xanthomonas* causantes de mancha bacteriana en tomate: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri*.

Además, se analizó un subgrupo de 33 aislamientos representativos de esta colección mediante el método *Multilocus Sequence Analysis and Typing* (MLSA-MLST), basado en la amplificación y secuenciación de 5 genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *gyrB*, *rpoD*). La amplificación se realizó utilizando los cebadores y las condiciones descritas por Mhedbi-Hajri y colaboradores (2013). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por el Servicio de Macrogen (Kumchun, Seúl, Corea). En el análisis filogenético se incluyeron secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* de las cuatro cepas de referencia de las especies de *Xanthomonas* causantes de mancha bacteriana en tomate (*X.*

vesicatoria ATCC35937, *X. perforans* 91-118, *X. euvesicatoria* 83M y *X. gardneri* ATCC19865). Como grupo externo para el análisis se utilizó la cepa *X. campestris* pv. *raphani* 756C. Las secuencias fueron editadas y alineadas utilizando el programa Genius (Hall, 1999). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de neighbor-joining en el programa MEGA 5.0. Los árboles resultantes y la topología fueron evaluados mediante el análisis de bootstrap basado en 1000 repeticiones. Las secuencias de los diferentes genes se analizaron individualmente y concatenadas. En todos los árboles filogenéticos se consideraron clusters consistentes los que presentaban valores de bootstrap $\geq 70\%$.

Las cepas de *Cmm* fueron identificadas mediante amplificación y análisis de secuencia del gen 16S rRNA y por amplificación con cebadores específicos (Jacques et al., 2012). También se realizó la caracterización en base a la presencia o ausencia de genes específicos de virulencia de *Cmm* (*pat1*, *celA*, *ppaA*, *chpC* y *tomA*) (Kleitman et al., 2008). Posteriormente, se realizó un análisis de la diversidad genética dentro de 39 aislamientos de esta colección mediante la técnica MLSA-MLST según el esquema reportado por Jacques et al. (2012). La metodología seguida para realizar este análisis se encuentra detallada en el trabajo de Croce et al. (2015).

Desarrollo y evaluación de un método de diagnóstico de *Cmm* mediante qPCR.

Se evaluaron dos sistemas de cebadores y sonda para qPCR (*Ptssk* y *MVS21*) recomendados en la última versión del protocolo de la ISF para identificación de *Cmm* (ISF, 2015). Para evaluar la eficiencia de estos sistemas y determinar la sensibilidad de las reacciones de qPCR en nuestras condiciones, se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas del ADN de una de las cepas de *Cmm* abarcando concentraciones desde 20 ng/ μ l a 0,2 pg/ μ l.

Posteriormente, se evaluaron distintos procedimientos con el objetivo de optimizar un protocolo de diagnóstico de *Cmm* en muestras de semillas (Figura 1). Para evaluar la sensibilidad de estos métodos, se prepararon semillas infectadas de manera artificial con diferentes concentraciones de *Cmm* (10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 ufc/semilla). Las mismas fueron utilizadas para infectar lotes de 2000 semillas sanas y evaluar así el límite de sensibilidad de la qPCR (Figura 1). Los lotes de semilla fueron procesadas según el protocolo ISF (2015) y el extracto obtenido fue analizado en paralelo por dos metodologías diferentes: i) sobre 10 ml se realizó la extracción de ADN y posterior amplificación por qPCR, y ii) BIO qPCR: se sembraron 2 placas de medio selectivo para *Cmm* y se incubaron a 28°C. Luego de 72 horas se lavó una de las placas con 2 ml de agua estéril, se juntó en un tubo y se realizó una lisis celular (20 minutos a 99°C). Este lisado fue utilizado como molde en la reacción de qPCR. La segunda placa se dejó incubando como placa control para la observación de colonias de *Cmm*. Todas las reacciones de qPCR se realizaron utilizando el sistema *TaqMan MVS21* (ISF, 2015).

También se adaptaron estos procedimientos para evaluar la detección de *Cmm* en plantas de tomate jóvenes. Las semillas infectadas mencionadas anteriormente se pusieron a germinar y se realizó la detección del patógeno sobre las plantas luego de 4 semanas en cámara de crecimiento. Cada muestra de distinto nivel de infección se armó con pooles de 5 plantas y a su vez se separaron en 2 tipos de muestras: cotiledones y parte aérea de la planta. Se utilizaron las mismas metodologías que para el análisis en muestras de semillas: qPCR directa y BIO qPCR (Figura 2).

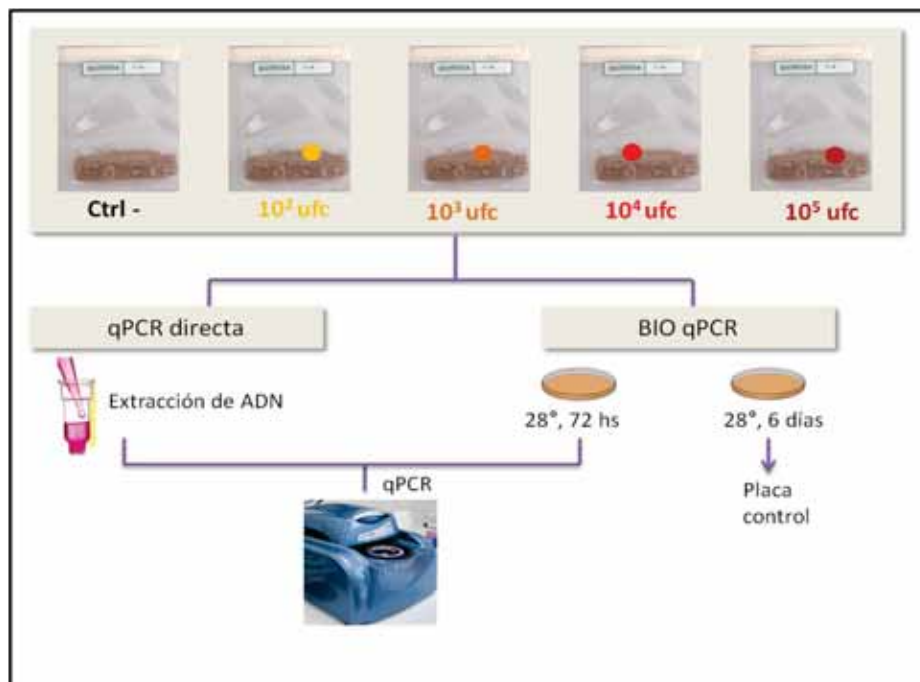


Figura 1. Estrategia adoptada para la evaluación de métodos de detección de *Cmm* en semillas de tomate. Se utilizaron lotes de 2000 semillas sanas inoculadas con 1 semilla infectada con diferentes niveles del patógeno (10^2 a 10^5 ufc/semilla). Como control negativo (Ctrl -) se utilizó un lote de 2000 semillas sanas.

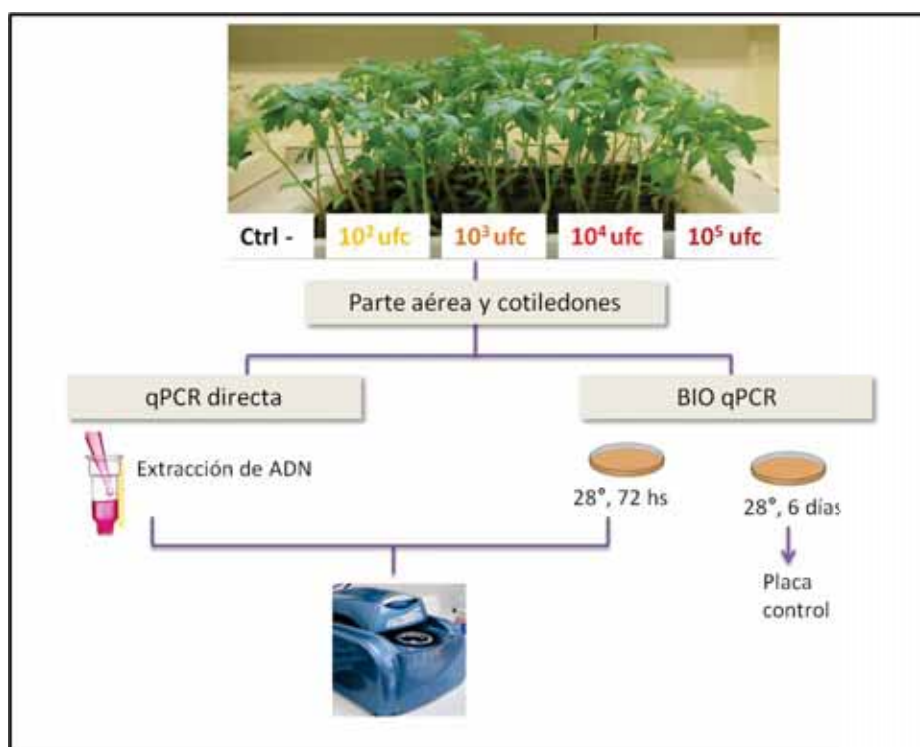


Figura 2. Estrategia adoptada para la evaluación de métodos de detección de *Cmm* en plántulas de tomate generadas a partir de semillas con diferentes niveles de infección (10^2 a 10^5 ufc/semilla).

Resultados y discusión.

Identificación de las especies de *Xanthomonas* que afectan a los cultivos de tomate en Uruguay.

Se utilizaron diferentes métodos moleculares capaces de identificar a nivel de especie las poblaciones de *Xanthomonas* que afectan los cultivos de tomate en Uruguay. En primera instancia, se utilizó la técnica de multiplex-PCR desarrollado por Araújo y colaboradores (2012), la cual permite la identificación de las cuatro especies de *Xanthomonas* patógenas de tomate en una misma reacción de amplificación. Se pusieron a punto las condiciones de reacción utilizando ADN de cuatro cepas de referencia pertenecientes a las especies *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri* (Figura 3). Posteriormente, se analizaron 88 cepas de la colección, logrando asignar 68 a la especie *X. vesicatoria* y 12 a *X. gardneri* (Figura 3). Algunas cepas (8) no produjeron ningún producto de amplificación, no pudiendo ser asignadas a ninguna de las cuatro especies descritas como patógenas de tomate.

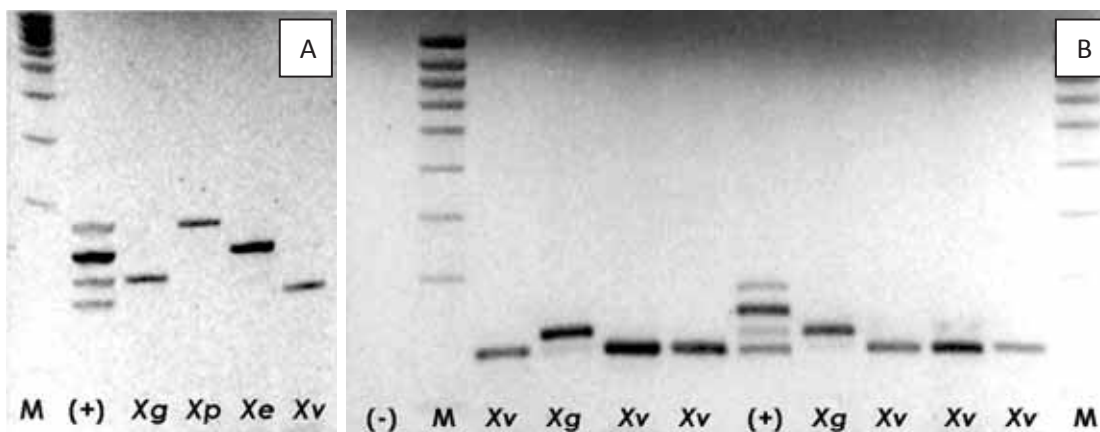


Figura 3. Productos de PCR obtenidos con la técnica multiplex-PCR utilizando cebadores específicos para *X. gardneri* (Xg), *X. perforans* (Xp), *X. euvesicatoria* (Xe) y *X. vesicatoria* (Xv). A) Cepas de referencia de cada una de las especies. B) Cepas de *Xanthomonas* aisladas en Uruguay. M: marcador de peso molecular, (+) control positivo con ADN de las cuatro especies, (-) control negativo sin ADN.

Para complementar este estudio y evaluar en mayor profundidad la diversidad genética de los aislamientos de *Xanthomonas* en nuestro país, se realizó un estudio filogenético utilizando la técnica MLSA-MLST. Esta técnica está basada en el análisis de polimorfismos a nivel de la secuencia de ADN de varios loci genéticos conservados involucrados en funciones metabólicas básicas y en los últimos años se ha utilizado con éxito para la clasificación taxonómica de las especies de *Xanthomonas* (Mhedbi-Hajri et al., 2013; Jibrin et al., 2015; Timilsina et al., 2015). En este trabajo, se aplicó el esquema MLSA descrito por Mhedbi-Hajri y colaboradores (2013) para el análisis de 33 cepas de *Xanthomonas* de nuestra colección. Los resultados de este análisis son concordantes con los obtenidos mediante multiplex-PCR, indicando que *X. vesicatoria* y *X. gardneri* son las especies prevalentes en los cultivos de tomate en Uruguay (Figura 4). Por otro lado, ninguno de los aislamientos analizados se asignó a las especies *X. euvesicatoria* y *X. perforans*, lo que indicaría que estas especies no se encuentran presentes en nuestro país, resaltando la necesidad de implementar medidas tendientes a la vigilancia de estos patógenos. El análisis filogenético también reveló la existencia de varios haplotipos dentro de los aislamientos pertenecientes a la especie *X. vesicatoria*, lo que sugiere la ocurrencia de varios eventos de introducción de esta especie en nuestro país. Por otro lado, no

Identificación y evaluación de la diversidad genética de las cepas de *Cmm* causantes de cancro bacteriano del tomate en Uruguay.

Con el objetivo de caracterizar las cepas de *Cmm* que afectan los cultivos de tomate en Uruguay, se generó una colección de 55 cepas aisladas de cultivos provenientes de las principales zonas de producción (Norte y Sur). Todas las cepas fueron capaces de causar patogenicidad en tomate, produciendo los típicos síntomas de marchitamiento y cancro en tallo luego de 14 días de la inoculación (Figura 5). El análisis de secuencias del 16S rRNA de todas las cepas reveló un 99-100% de identidad respecto a la cepa de referencia de *Cmm* NCPPB 382, y también se verificó la presencia de varios genes de patogenicidad.



Figura 5. Síntomas típicos de cancro bacteriano en plantas de tomate inoculadas con una de las cepas de *Cmm* aisladas en Uruguay (14 dpi): a) marchitamiento generalizado, b) marchitamiento unilateral.

Se evaluó la diversidad genética de las cepas de *Cmm* aisladas con el objetivo de generar conocimiento para futuros estudios epidemiológicos que profundicen en los principales mecanismos de transmisión y la introducción de nuevas variantes del patógeno en el país. A través de este estudio apuntamos a responder varias preguntas: i) saber si un brote de infección localizado es originado por uno o más cepas diferentes del patógeno, ii) inferir un posible origen de los brotes a partir de la comparación de los perfiles genéticos de cepas de diferentes localidades y iii) determinar cómo se relacionan las cepas presentes en Uruguay con otras cepas de *Cmm* aisladas del resto del mundo. Se utilizó el método MLSA-MLST que ha sido aplicado con éxito en estudios de epidemiología molecular de varios patógenos humanos y vegetales, demostrando una gran reproducibilidad y capacidad de discriminar los aislamientos a nivel infraespecífico (Almeida et al., 2010).

Hasta el momento se analizaron 39 cepas de *Cmm* aisladas en Uruguay, quedando pendiente el análisis de las cepas aisladas más recientemente. Este análisis se realizó durante una estancia de investigación en el Laboratorio IRHS, INRA, Angers, Francia en el marco de una colaboración con la Dra. Marie-Agnès Jacques. Los resultados obtenidos se encuentran publicados en el artículo de Croce et al. (2015). Se detallan a continuación los hallazgos más relevantes de este estudio.

En la Figura 6 se muestra el árbol filogenético obtenido a partir de este análisis, incluyendo también 68 cepas de *Cmm* provenientes de una colección mundial de aislamientos. Se identificaron un total de 36 variantes alélicas (STs) dentro de la población de cepas de *Cmm*, confirmando la aplicabilidad de esta técnica como herramienta de tipificación. Las cepas aisladas en Uruguay se distribuyeron en 10 de estos STs, 8 de los cuáles fueron identificados por primera vez en este estudio.

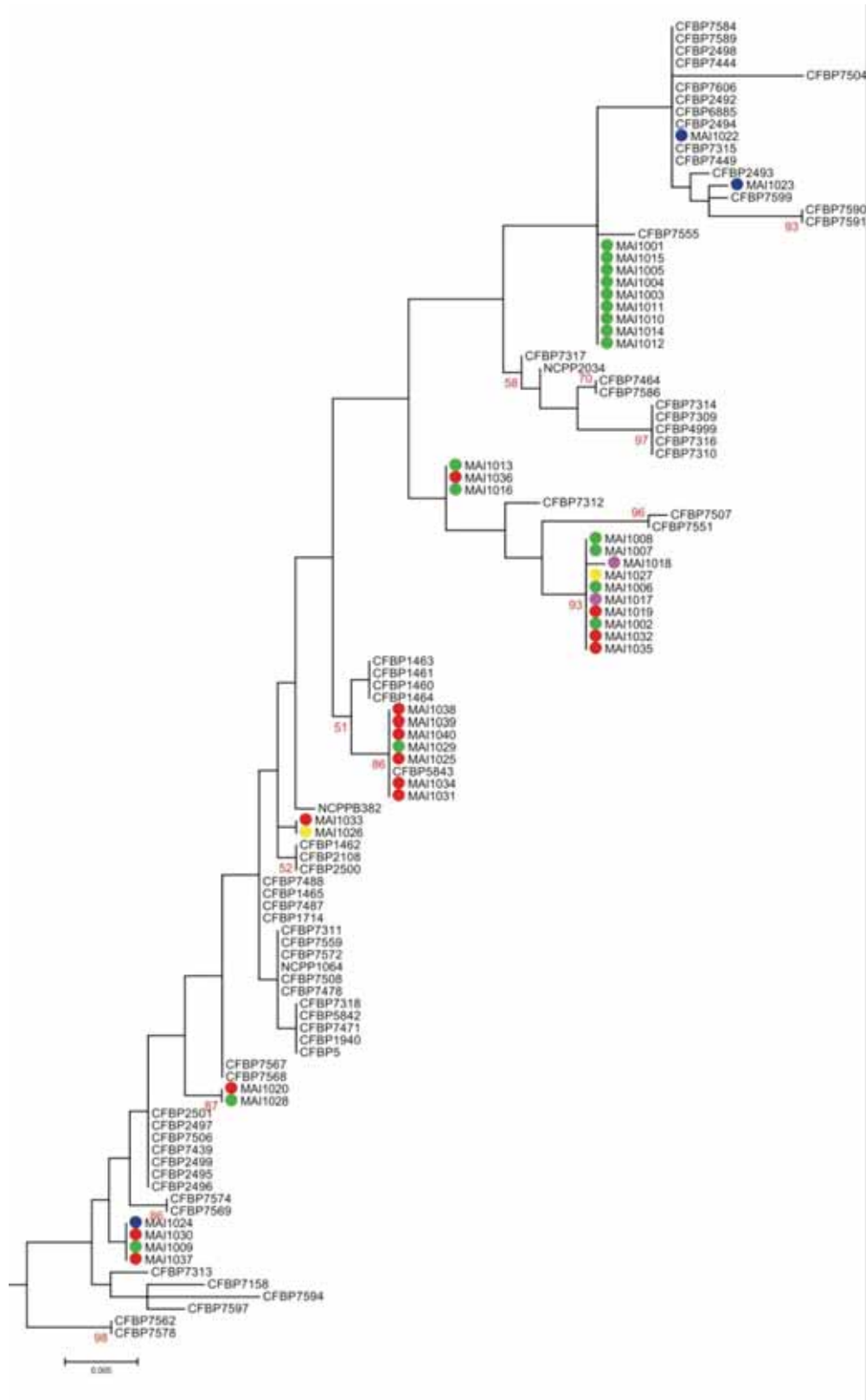


Figura 6. Árbol filogenético construido usando el método de máxima verosimilitud a partir del alineamiento de las secuencias parciales concatenadas de los cinco genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk*, *recA*) de cepas de *Cmm*. Valores de *bootstrap* >50% (basados en 1000 repeticiones) se indican en los nodos. El origen geográfico de las cepas aisladas en Uruguay se indica con colores (Salto: verde, Artigas: azul, Montevideo: rojo, Canelones: amarillo, San José: rosado).

En la Figura 7 se representa la distribución de estos STs en las diferentes zonas de producción del país. Un resultado interesante a destacar, es la ocurrencia de brotes originados por diferentes cepas de *Cmm* (asignados a diferentes STs). Este es el caso, de los brotes ocurridos en Salto durante las zafas de 2011 y 2012, los cuales fueron originados por cepas distribuidas en 6 STs diferentes. Por otro lado, algunos STs están asociados a una región o brote específico, como es el caso del ST3 aislado únicamente en Salto durante la zafra de 2012. Por el contrario, otros STs se identificaron como causantes de brotes en diferentes años y en todas las zonas de producción.



Figura 7. Distribución geográfica de las diferentes cepas de *Cmm* aisladas en Uruguay. Los números representan los tipos de secuencia (STs) determinados mediante análisis MLSA-MLST.

Como resultado de este estudio se observó que las cepas uruguayas tienen orígenes diversos, destacándose la transmisión global del patógeno a través de la semilla. Además, se encontraron nuevas variantes alélicas respecto a las previamente identificadas aportando mayor información en cuanto a la diversidad genética de esta subespecie.

Desarrollo de un método de diagnóstico molecular de *Cmm* en material de propagación (semilla y plántulas).

Dada los bajos niveles de infección que se requieren para iniciar una epidemia por *Cmm* en condiciones favorables, es necesario contar con métodos rápidos, confiables y de alta sensibilidad para la detección del patógeno en lotes de semillas contaminadas, especialmente en el comercio internacional. Los métodos basados en PCR presentan varias ventajas frente a otras metodologías de diagnóstico y se utilizan cada vez más en protocolos para análisis fitosanitarios (de León et al., 2011). La PCR en tiempo real (qPCR) es una variante que 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, disminución del riesgo de ocurrencia de falsos positivos y posibilidad de efectuar la cuantificación del ADN diana (Valasek and Repa, 2005).

En este trabajo, se evaluaron diferentes metodologías basadas en qPCR para desarrollar protocolos de diagnóstico de *Cmm* en muestras que contribuyen a la diseminación del patógeno (semilla y plántula). Para ello, se trabajó en colaboración con el Dr. Leandro de León a través de una pasantía de investigación que realizó la estudiante V. Croce en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de INIA, Madrid, España.

Se tomó como punto de partida los sistemas de detección de *Cmm* (*Ptssk* y *MVS21*) recomendados por la ISF (*International Seed Federation*) (ISF, 2015). Se evaluaron estos sistemas en nuestras condiciones, resultando que ambos presentaron muy buenos niveles de eficiencia y sensibilidad (límite de detección 2 pg/ μ l de ADN) (Figura 8). Este resultado indica que ambos sistemas podrían ser utilizados de igual manera para la detección de *Cmm* en extractos de semillas. La especificidad del sistema *Ptssk* ha sido verificada previamente en trabajos previos (Jacques et al., 2012), mientras que el sistema *MVS21* ha sido incorporado al protocolo de la ISF recientemente y no existen al momento trabajos publicados que utilicen este sistema.

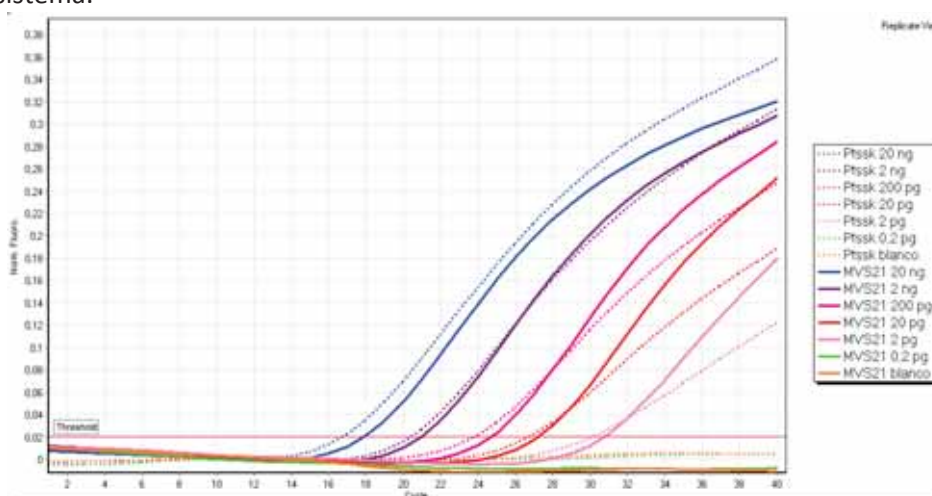


Figura 8. Curvas de calibración (Fluorescencia vs ciclos) de las reacciones de qPCR con diferentes sistemas *TaqMan* para detección de *Cmm* (*Ptssk* y *MVS21*). Se analizaron diferentes concentraciones de ADN de *Cmm* en un rango de 20 ng a 0,2 pg por reacción.

El protocolo de detección recomendado por la ISF, tiene la limitante de que el análisis de las muestras de semillas abarca el aislamiento del patógeno y la posterior identificación de las colonias aisladas mediante qPCR. Dado que las muestras de semillas pueden estar muy contaminadas por otros microorganismos saprófitos, el aislamiento puede resultar muy dificultoso y laborioso. 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. En este trabajo, se propuso optimizar un protocolo de detección directa en extracto de semillas que presente buena sensibilidad y confiabilidad. Con este objetivo, se evaluaron 2 metodologías: extracción de ADN seguida de una amplificación por qPCR y BIO qPCR. Ambas metodologías mostraron resultados similares en cuanto a su sensibilidad, siendo capaces de detectar la presencia de *Cmm* en los lotes inoculados con una semilla infectada con 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc del patógeno. De esta forma, el límite de sensibilidad de la qPCR con ambas metodologías fue de 1 semilla infectada (con 10^3 ufc) en un lote de 2000 semillas sanas. Este resultado es muy bueno ya que aunque no se puede establecer con exactitud el nivel de contaminación de cada semilla infectada de manera natural, está reportado que es de 10^2 - 10^4 ufc/semilla (Fatmi y Schaad, 1988). En relación a la comparación

de ambas metodologías propuestas, la ventaja de la qPCR directa es su rapidez, ya que permite realizar el análisis de las muestras en un día. Por otro lado, el método basado en BIO qPCR, a pesar de insumir un mayor tiempo de análisis (72 hs) tiene la ventaja de detectar únicamente las células viables del patógeno y de permitir contar con un cultivo control que sirve como respaldo de los resultados obtenidos.

Las semillas infectadas artificialmente, también se pusieron a germinar con el objetivo de evaluar la detección del patógeno en plántulas. La detección en plantas jóvenes, puede resultar de importancia a nivel de viveros. Si es posible detectar a la bacteria en plantas jóvenes infectadas en viveros, se evitaría llevar esas plantas a campo para que luego desarrollen enfermedad. En una primera instancia, se verificó la transmisión de la bacteria de estas semillas infectadas a la planta. A las 8 semanas de crecimiento, se observaron síntomas típicos de cancro en plantas generadas a partir de semillas con los niveles más bajos de infección (10^2 ufc) (Figura 9). A partir de estas plantas se realizaron aislamientos, logrando verificar la presencia de *Cmm* en todas estas muestras. Este resultado resalta la importancia de contar con métodos de diagnóstico capaces de detectar niveles bajos de infección en los lotes de semillas.



Figura 9. 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 *Cmm*.

En cuanto a la evaluación de las metodologías para detección de *Cmm* en plántulas, se siguió el esquema de la Figura 2. En este caso, las metodologías de qPCR directa y BIOqPCR también mostraron resultados similares en cuanto a su sensibilidad. Sin embargo, no se obtuvieron los mismos resultados al analizar los cotiledones y la parte aérea de la planta. Mientras que en cotiledones fue posible la detección de *Cmm* en plantas provenientes de semillas infectadas con 10^4 y 10^5 ufc, en la parte aérea de la planta se detectó hasta en las de 10^2 ufc. Estos resultados preliminares sirven como punto de partida para diseñar un protocolo de diagnóstico de *Cmm* a nivel de viveros.

Las metodologías desarrolladas en este trabajo podrán ser transferidas a otras instituciones (INASE, INIA, etc.) para su aplicación a la evaluación de la calidad fitosanitaria de semilla y plántulas de tomate. De esta forma se pretende lograr un mejor aprovechamiento de las plataformas tecnológicas disponibles actualmente en nuestro país, disminuyendo el impacto que tiene actualmente esta importante enfermedad para el sector hortícola nacional.

Agradecimientos.

Se agradece la colaboración de la Dra. E. Silvera (Facultad de Agronomía) y el Ing. Agr. Enrique Verdier (MGAP) por el aporte de aislamientos de *Cmm* utilizados en este estudio. También se agradece al Ing. Agr. Federico Boschi (INASE) por el aporte de lotes de semilla de tomate para la evaluación de las metodologías de diagnóstico de *Cmm* y por discusiones e ideas aportadas en relación a este trabajo. Por último, queremos agradecer a la Dra. Marie-Agnés Jacques (INRA-Angers, Francia) y al Dr. Leandro de León (INIA-Madrid, España) por recibir a la estudiante V. Croce para realizar estancias de investigación en sus respectivos laboratorios. Fuentes de financiamiento: Proyecto CSIC Grupos I+D N°652 (2011-2015), PEDECIBA (Beca de movilidad para que V. Croce realice una pasantía en INIA-Madrid, 2015), ANII (Beca de Maestría, V. Croce, 2013-2015).

Referencias Bibliográficas.

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5th ed. University of Florida. Elsevier Academic Press, p 651-653.
- Almeida NF, Yan S, Cai R, Clarke CR, Morris CE, Schaad NW, et al. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*. 100:208–215.
- Araújo ER, Costa JR, Ferreira MASV and Quezado-Duval AM. 2012. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *J Appl Microbiol*, 113: 1479-1490.
- Berrueta C, Giménez G, Galván G, Borges A. 2014. Componentes de resistencia a *Xanthomonas vesicatoria* raza T2 en genotipos de tomate en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento. *Agrociencia Uruguay*, 18(1): 86-96.
- Chang RJ, Ries SM, Pataky JK. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* 81: 1276-1281.
- Croce V, Pianzola MJ, Durand K, González-Arcos M, Jacques MA, Siri MI. 2015. Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-015-0738-0.
- de León L, Siverio F, Lopez MM, and Rodriguez 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: 1277-1283.
- de León L, Siverio F, López MM, Rodríguez A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant disease*, 95: 1328–1339.
- Eichenlaub R, Gartemann KH, and Burger A. 2006. *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. Pages 385-421 in: Plant-Associated Bacteria. S. S. Gnanamanickam, ed. Springer, The Netherlands.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. EPPO Standards Diagnostic PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bulletin* 43, 46–67.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2015. EPPO-PQR (Plant Quarantine Data Retrieval system). Available online: www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm
- Fatmi M and Schaad NW. 1988. Semiselective Agar Medium for Isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganense* from Tomato Seed. *Phytopathology* 78: 121-126.
- Gitaitis R, Beaver RW, Voloudakis AE. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*. 75: 834-838.
- Jacques MA, 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.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755 - 762.
- Hall T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.

- ISF (International Seed Federation). 2015. Method for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seed. Version 4.3, September, 2015, online, http://www.worldseed.org/isf/detection_methods.html.
- Jibrin MO, Timilsina S, Potnis N, Minsavage GV, Shenge KC, Akpa AD, Alegbejo MD, Beed F, Vallad GW, and Jones JB. 2015. First report of atypical *Xanthomonas euvesicatoria* strains causing bacterial spot of tomato in Nigeria. *Plant Disease*, 99(3): 415-415.
- 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.
- Mhedbi-Hajri N, Hajri A, Boureau T, Darrasse A, Durand K, Brin C, Fischer-Le Saux M, Manceau C, Poussier S, Pruvost O, Lemaire C and Jacques MA. 2013. Evolutionary history of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas axonopodis*. *PLoS ONE* 8(3): e58474.
- Montelongo MJ. 2012. Caracterización de *Xanthomonas spp.* causantes de la mancha bacteriana del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Uruguay [Tesis de Maestría]. Montevideo: Facultad de Agronomía. 70p.
- Sambrook J Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual,. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sen Y, van der Wolf J, Visser RGF, van Heusden S. 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance and interactions. *Plant Disease* 99 (1): 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 Pathology*, 62: 578-586.
- Timilsina S, Jibrin MO, Potnis N, Minsavage GV, Kebede M, Schwartz A, Bart R, Staskawicz B, Boyer C, Vallad GE, Pruvost O, Jones JB, Goss EM. 2015. Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and pepper plants reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 1520-1529.
- Valasek MA and Repa JJ. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29: 151-159.