

EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES PARA PREVENIR LA TRASMISIÓN DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* EN TOMATE MEDIANTE TIJERAS DE PODA

Maeso Diego¹, Walasek Wilma¹, Fernández Alfredo¹

¹ INIA Las Brujas. Ruta 48 km 10, Rincón del Colorado, 90200 Canelones, Uruguay. Correo electrónico: dmaeso@inia.org.uy

Palabras clave: cancro bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, desinfectantes.

Introducción

El cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) es una enfermedad importante del cultivo del tomate (Strider, 1969; Davis *et al.*, 1984). Provoca marchitamiento, muerte de plantas y pérdidas en la producción. Dada la facilidad con que se disemina esta enfermedad por labores y la prolongada latencia de la infección (Chang *et al.*, 1992), niveles muy bajos de infección de semillas (0,01 %) pueden traducirse en importantes epidemias en cultivo (Chang *et al.*, 1991; Gitaitis *et al.*, 1991). Hasta el momento, en Uruguay no existen cultivares resistentes disponibles a nivel comercial con capacidad de reemplazar a los usados actualmente, por lo que el control de la enfermedad se basa en la prevención utilizando semilla libre del patógeno y evitando su diseminación.

En el cultivo de tomate para consumo fresco se realizan tareas de desbrotado y deshoje utilizando tijeras o navajas, las cuales generan heridas y favorecen la transmisión de Cmm. Tradicionalmente, las herramientas de poda y deshoje se desinfectan con hipoclorito de sodio. Sin embargo, algunos productores lo han reemplazado por otros desinfectantes buscando superar algunas de las limitantes del hipoclorito (efecto corrosivo, inactivación por materia orgánica y fotosensibilidad, entre otras). El presente trabajo tuvo como objetivo comparar la efectividad de varios productos desinfectantes usados por productores de tomate en Uruguay en la prevención de la transmisión de Cmm mediante tijeras.

Materiales y métodos

Material vegetal y tratamientos evaluados

Tomate cultivar Loica, de aproximadamente 50 días de edad (seis hojas extendidas).

Las plantas fueron cultivadas en macetas con sustrato esterilizado (autoclavado a 121 °C por 20 minutos), utilizando semilla desinfectada (inmersión en agua caliente a 50 °C por 25 minutos) en un invernadero con control de temperatura (20-28 °C).

Las plantas fueron cubiertas con bolsas de polietileno por 48 h previo a la aplicación de los tratamientos, y reembolsadas por 48 h luego de aplicarse los mismos.

Los tratamientos evaluados se muestran en el Cuadro 1. Se utilizó un tubo individual con la solución desinfectante para cada planta.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados

Tratamiento	Principio activo	Dosis ¹
1. Sin inoculación	---	---
2. Sin desinfección	---	---
3. Hipoclorito de sodio	Hipoclorito de sodio	1% de cloro activo
4. Virkon S	Monopersulfato potásico (sal triple) 50%	1%
5. Desinfectante a base de iodo Perrin	Agentes tensoactivos en complejo con iodo, 0,8-0,9% de iodo libre o titulable	0,15%
6. Sporekill	Cloruro de didecildimetilamonio 120 g/L (compuesto de amonio cuaternario)	1%

Cultivo de Cmm y preparación de inóculo

Se utilizó la cepa de Cmm LB 17 de la colección del laboratorio de fitopatología de INIA Las Brujas. Para la preparación del inóculo la cepa seleccionada se cultivó en agar nutritivo dextrosado y se resuspendió en agua estéril.

Experimento 1: Transmisión de Cmm a partir de una suspensión bacteriana

La trasmisión se realizó empleando tijeras sin uso previo de 140 mm de hoja las cuales fueron sumergidas durante diez segundos en la suspensión de Cmm e inmediatamente después en las soluciones del tratamiento correspondiente. Posteriormente, se realizó un corte en el tallo de las plantas de tomate a la altura del primer par de hojas completamente desarrolladas. La tijera fue sumergida en agua estéril en el caso del tratamiento testigo. Las plantas de cada unidad experimental fueron inoculadas con una misma solución bacteriana y una única tijera. La concentración del inóculo fue ajustada a una densidad óptica de 0,1 a 530 nm correspondiente a $1,9 \times 10^8$ ufc ml⁻¹, concentración corroborada posteriormente con el método de dilución en placas.

Experimento 2: Transmisión Cmm a partir de plantas enfermas

La trasmisión fue realizada a partir de las plantas enfermas del tratamiento sin desinfección del experimento 1 o plantas sanas para el tratamiento sin inocular. Para ello se realizaron tres cortes sucesivos en los tallos de las plantas infectadas. Inmediatamente las tijeras fueron sumergidas en las soluciones desinfectantes o en agua estéril según el tratamiento correspondiente. Luego se realizó un corte en el tallo de las plantas de tomate a la altura del primer par de hojas completamente desarrolladas.

Evaluación de la transmisión

Presencia de síntomas externos a los 14 días post tratamiento (marchitamiento, necrosis foliar, emisión de raíces aéreas, amarillamiento). Los datos fueron expresados en porcentaje de plantas enfermas en cada repetición.

A los 42 días de establecidos los tratamientos, los tallos de todas las plantas fueron cortados en forma longitudinal y se observó el estado de su sistema vascular registrándose el porcentaje de plantas que presentaban amarronamiento de vasos y/o médula. Se conservaron secciones de 5 cm de longitud a partir del punto de inoculación para confirmar la presencia de Cmm mediante aislamiento (experimento de transmisión por suspensión bacteriana) o por serología (ambos experimentos).

En el experimento de transmisión por suspensión bacteriana una parte de las secciones de tallo fue desinfectada superficialmente con alcohol 70 % y sumergida por dos horas en 10 ml de agua estéril. Esa suspensión fue sembrada en una placa con agar nutritivo dextrosado. A las 48 h se registró el número de placas en las que crecieron colonias con características similares a Cmm (aparición y Gram positivas), registrándose el porcentaje de plantas a partir de las cuales se aisló este tipo de colonias.

En ambos experimentos, parte de las secciones obtenidas fueron utilizadas para la detección de Cmm por la prueba DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) empleando el antisuero monoclonal MAb Cmm1 (Alvarez *et al.*, 1993; Kaneshiro *et al.*, 2006) incluido en el kit comercializado por AGDIA Inc. (Elkhard, IN46514, EEUU). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante y se calculó el porcentaje de plantas en que se detectó serológicamente Cmm.

Diseño y análisis estadístico

En total se inocularon 120 plantas por tratamiento distribuidas en seis repeticiones de veinte plantas por unidad experimental. Se usó un diseño de bloques completos al azar y cada bloque correspondió a una misma mesa en el invernadero. En cada mesa las plantas fueron colocadas con una separación entre tratamientos de aproximadamente 0,5 m. Los datos fueron sometidos a un análisis de variancia y cuando este indicó efecto significativo del tratamiento ($P > 0,01$) se procedió a la separación de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. Previo a su análisis estadístico los datos en porcentaje fueron transformados por la fórmula $\text{arc sen } \sqrt{\%}$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa de acceso libre Infostat (www.infostat.com.ar).

Resultados

Experimento 1:

En el experimento de transmisión de Cmm a partir de una solución bacteriana los mayores porcentajes de plantas con síntomas, tanto externos como internos, se observaron en el testigo sin desinfectar y en el tratamiento con el desinfectante a base de iodo, siendo superiores al 85 %. El tratamiento con hipoclorito de sodio no difirió estadísticamente del testigo sin inoculación no presentando síntomas externos y solamente 3 % de plantas con haces vasculares necrosados. Los tratamientos con Sporekill® y Virkon S® exhibieron valores intermedios en la evaluación de síntomas (Cuadro 2).

En el 20 % de las plantas del testigo sin inocular y en el 50 % de las correspondientes a la desinfección con Virkon S® se aislaron colonias bacterianas similares a Cmm que no reaccionaron serológicamente con el antisuero específico para este patógeno. En el 95 % de las plantas correspondientes al testigo sin tratar y a la desinfección con el desinfectante a base de yodo se aislaron bacterias similares a Cmm y en el 100 % de las plantas se detectó al patógeno mediante serología. Estos valores no se diferenciaron estadísticamente del 45 % de plantas con detección serológica de Cmm encontrado en el tratamiento con hipoclorito.

En el testigo sin inocular y en las plantas con desinfección con Virkon S® no se detectó serológicamente Cmm no existiendo diferencias significativas con el 10 % de detección en el tratamiento con Sporekill®.

Cuadro 2. Porcentaje de plantas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) transmitido mediante tijeras infectadas con una solución bacteriana estimado a través de la presencia de síntomas y serología¹.

Tratamiento	Plantas con síntomas de Cmm(%)		Plantas con aislamiento de colonias bacterianas (%) ⁴	DAS-ELISA positivo para Cmm (%) ⁵
	Externos ²	Haces vasculares ³		
1. Sin inoculación	0 a ⁶	0 a	20 a	0 a
2. Sin desinfección	87 c	90 d	95 c	100 c
3. Hipoclorito de sodio	0 a	3 ab	15 a	45 b
4. Virkon S	57 b	17 bc	50 b	0 a
5. Desinfectante a base de yodo Perrin	100 c	97 d	95 c	100 c
6. Sporekill	17 b	27 c	25 ab	10 a
CV (%)	32	35	35	30

¹ Todos los datos en porcentajes fueron corregidos por la fórmula $\arcsin \sqrt{v}$ para su análisis estadístico.

² Síntomas externos asociados con Cmm (marchitamiento, necrosis foliar, raíces aéreas, amarillamiento).

³ Deterioro de los haces vasculares y/o médula en corte longitudinal.

⁴ Aislamiento de colonias similares a Cmm a partir de la sección longitudinal de los 5 cm siguientes al corte usado en la inoculación.

⁵ Detección de Cmm mediante la prueba DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) en las muestras vegetales.

⁶ Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

En el experimento de transmisión a partir de plantas, los mayores porcentajes de transmisión también se observaron en el testigo sin desinfectar y en el tratamiento con el desinfectante a base de yodo. El porcentaje de plantas con síntomas fue superior al 85 % diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos. Nuevamente, el tratamiento con hipoclorito de sodio no fue significativamente diferente del testigo sin inocular expresando solo 3 % de plantas con haces vasculares necrosados. Los tratamientos con Sporekill® y Virkon® tuvieron valores intermedios con 17-27 % de las plantas con síntomas pero diferenciándose significativamente del testigo sin desinfección (Cuadro 3).

En el 100 % de las plantas del testigo sin desinfección y en las del tratamiento desinfectante a base de iodo se detectó Cmm mediante análisis serológico. No se detectó Cmm por serología en las plantas sin inocular y en las con desinfección por hipoclorito, mientras que en los tratamientos con Virkon S® y Sporekill® Cmm fue detectado en el 35 y 15 % de las plantas diferenciándose estadísticamente entre sí (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de plantas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) transmitido mediante tijeras infectadas a partir de plantas enfermas estimado a través de la presencia de síntomas y serología¹.

Tratamiento	Plantas con síntomas de Cmm (%)		DAS-ELISA positivo para Cmm (%) ⁴
	Externos ²	Haces vasculares ³	
1. Sin inoculación	0 a ⁵	0 a	0 a
2. Sin desinfección	87 c	90 d	100 d
3. Hipoclorito de sodio	0 a	3 ab	0 a
4. Virkon S	23 b	17 bc	35 c
5. Desinfectante a base de iodo Perrin	100 c	97 d	100 d
6. Sporekill	17 b	27 c	15 b
CV (%)	32	35	22

¹ Todos los datos en porcentajes fueron corregidos por la fórmula $\arcsin \sqrt{\%}$ para su análisis estadístico.

² Síntomas externos asociados con Cmm (marchitamiento, necrosis foliar, raíces aéreas, amarillamiento), 14 días después de la inoculación.

³ Deterioro de los haces vasculares y/o médula en corte longitudinal, 42 días después de la inoculación.

⁴ Detección de Cmm mediante la prueba DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) en las muestras vegetales, 42 días después de la inoculación.

⁵ Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

Discusión

Los resultados obtenidos confirman la importancia de la transmisión de esta enfermedad mediante los elementos de corte normalmente utilizados en el cultivo. En ambos experimentos se obtuvo una infección cercana al 100 % al utilizar tijeras contaminadas con el patógeno. En algunos casos este porcentaje se redujo si las tijeras fueron sumergidas en las soluciones desinfectantes previo al corte de plantas sanas. La transmisión obtenida utilizando una solución bacteriana o una planta enferma como fuente de inóculo fue muy similar.

Ninguno de los desinfectantes evaluados logró prevenir totalmente la transmisión de Cmm. Eso concuerda con lo expresado por Kleinhempel *et al.* (1987) quienes sostienen que aún los mejores métodos de desinfección y limpieza son inefectivos para eliminar totalmente bacterias de las herramientas de corte. Según estos autores en las superficies de la hoja de corte existen orificios microscópicos de los cuales el exudado bacteriano no puede ser quitado. Otro aspecto

que pudo haber perjudicado el desempeño de los desinfectantes en este trabajo fue el tiempo de contacto con el material a desinfectar, el cual debe ser por lo menos de diez minutos (Mebalds *et al.*, 1997; van der Wolf *et al.*, 2005; Teviotdale *et al.*, 1991). Por ello, una desinfección rápida como la que se realiza entre plantas durante las labores de desbrote y deshoje en un cultivo comercial no sería suficiente para prevenir la trasmisión.

Sin embargo, en este trabajo se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de desinfección entre los tratamientos evaluados. Al respecto se destacan los tratamientos en los que la desinfección de herramientas fue efectuada con hipoclorito de sodio, Virkon S® y Sporekill®. Los tres tratamientos presentaron los menores porcentajes de plantas con síntomas externos e internos y de presencia de Cmm detectada por la prueba DAS-ELISA frente al testigo sin desinfección coincidiendo con lo observado por Baysal-Gurel *et al.*, 2010.

Si bien la prevención de la trasmisión no fue total y se mantiene el riesgo de diseminación de la enfermedad, se debe tener en cuenta que en este trabajo se utilizaron fuentes de inóculo con alta concentración de bacterias. Según Thyr, 1968, Meletzus *et al.* 1993 y Garteman *et al.*, 2003, la aparición de síntomas depende de la población bacteriana colonizando el huésped. Cmm puede vivir como endófito en la planta de tomate pero para ocasionar síntomas debe superar una población de 10^8 cfu/g de tejido además de poseer algunos plásmidos involucrados en la patogenicidad (Meletzus *et al.* 1993). A ese nivel la bacteria es capaz de provocar la alteración física del xilema lo cual junto a la producción de extrapolisacáridos impide la normal circulación de agua.

En un cultivo comercial las plantas con síntomas seguramente son eliminadas previamente al deshoje o desbrote o no se realizan labores en el resto del cultivo usando la misma herramienta.

A pesar de que en trabajos se obtuvieron buenos resultados utilizando desinfectantes a base de iodo para *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Koponen *et al.*, 1992), en nuestro estudio la solución de iodo jabonosa empleada no tuvo efecto en la prevención de la trasmisión. Los valores obtenidos fueron muy similares a los del testigo sin desinfección, por lo que su uso no sería recomendable en cultivos comerciales para ese fin. Probablemente la diferencia radique en la naturaleza química de los compuestos a base de iodo evaluados.

De acuerdo a los resultados obtenidos de mantenerse las condiciones de uso (tiempo de acción) el mejor desinfectante para evitar la trasmisión por tijeras es la solución de hipoclorito de sodio. Sin embargo, en las condiciones de campo deberán tenerse en cuenta la pérdida de su efectividad por fotodegradación o por acumulación de materia orgánica, aspectos que no son mencionados como limitantes para los otros productos evaluados. Una alternativa para mejorar el desempeño de esta medida puede ser el uso de múltiples tijeras de forma de aumentar el tiempo de permanencia en la solución desinfectante.

De todas formas la falta de prevención total de la trasmisión hace imprescindible que esta medida sea incluida como parte de un manejo integrado de la enfermedad y no en forma aislada.

En este trabajo se encontraron diferencias entre los porcentajes de infección con Cmm estimados mediante el aislamiento en medio de cultivo, serología y presencia de síntomas. La utilización de medios de cultivo que no fueron semiselectivos, tal como se recomienda para la detección de este patógeno (OEPP/EPP, 2003), permitió el aislamiento de bacterias con colonias similares a Cmm pero que no correspondían al patógeno en estudio, aún en el tratamiento testigo sin infectar. Kaneshiro *et al.* (2006) mencionan varias bacterias similares a Cmm aisladas de tomate que no reaccionan con el antisuero monoclonal Cmm1 (*Microbacterium saperdae*, *M. laevaniformans*, *Sanguibacter keddieii*, *Curtobacter citreum*, *C. pusillum*).

El hecho de que los porcentajes de detección de Cmm por ELISA fueran mayor que los porcentajes de plantas con síntomas visibles en los tratamientos puede ser debido a la ocurrencia de un período de latencia prolongado (Tsiantos, 1987, Chang *et al.* 1992) y/o a su presencia como endófito sin llegar a concentraciones que hayan causado síntomas (Thyr, 1968, Meletzus *et al.* 1993 y Garteman *et al.*, 2003).

Bibliografía

Alvarez, A, Derie, M, Benedict, A, Gabrielson, R. 1993. Characteristics of a monoclonal antibody to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 83:1405.

Ark, PA. 1944. Studies on bacterial canker of tomato. *Phytopathology*, 34:394-400.

Baysal-Gurel, F, Xu, X, Rajashekara, G, Miller, SA. 2010. Effect of disinfectants on transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during grafting. *Phytopathology* 100:S13.

Carlton, WM, Gleason, ML, Braun, EJ. 1994. Effects of pruning on tomato plants supporting epiphytic populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 78:742-745.

Chang, RJ, Ries, SM, Pataky, JK. 1992. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Disease*, 76:1150-1155.

Chang, RJ, Ries, SM, Pataky, JK. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81:1276-1281.

Davis, MJ, Gillespie, AG, Vidaver, AK, Harris, RW. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 107- 117.

Gartemann, KH, Kirchner, O, Engemann, J, Gräfen, I, Eichenlaub, R, Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106: 179-191

Gitaitis, RD, Beaver, RW, Voloudakis, AE. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, 75:834-838.

Gleason, ML, Braun, EJ, Carlton, WM, Peterson, RH 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81:1519-1523.

Kaneshiro W, Mizumoto C, Alvarez A. 2006. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 45 – 56

Kleinhempel, H, Nachtigall, M, Ficke, W, Ehrig, F. 1987. Disinfection of pruning shears for the prevention of the fire blight. *Acta Horticulturae*, 217:211-218.

Koponen, H, Manninen, M, Harji, P, Avikainen, H, Rahvonen, R. 1992. The effect of disinfectants on *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* on different surface materials. *Agricultural Science in Finland*, 1(6): 597-602.

Lelliot R, Stead D. 1987. Methods in Plant Pathology : Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Vol. 2. Oxford : Blackwell Scientific Publications. 216p.

Mebalds, M, Tregua W, van der Linden, A. 1997. Disinfection protocols for equipment used in the nursery industry. Horticultural Research & Development Corporation. Australia. NY 612. 65 p.

Meletzuz, D, Bermpohl, A, Dreier, J, Eichenlaub, R. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Journal of Bacteriology 175 (7): 2131-2136.

OEPP/EPPO. 2003. Quarantine pest Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003 Data Sheets on Quarantine Pests. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Consultado agosto 2011. Disponible en: http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf.

Strider, DL. 1969. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 193.

Teviotdale, BL, Wiley, MF, Harper, DH. 1991. How disinfectants compare in preventing transmission of fire blight. California Agriculture, 45:21-23.

Thyr, BD. 1968. Bacterial canker of tomato: Inoculum level needed for infection. Plant Disease Reporter 52:741-743.

Thomas, RC. 1930. The canker disease of tomato. Ohio Agricultural Experiment Station Bulletin, 145:116-122.

Tsiantos J. 1987. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *Journal of Phytopathology*, 119: 142 - 146.

van der Wolf, JM, Elphinstone, JG, Stead, DE, Metzler, M, Müller, P, Hukkanen, A and Karjalainen, R. 2005. Plant research international Wageningen Report 95. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. [En línea] Consultado 6 junio 2014. Disponible en: <http://edepot.wur.nl/39352>