

# Sensibilidad de la prueba de InmunoStrips® en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate

Sensitivity of ImmunoStrips® test in the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato

María Claudia Rueda-Barrientos<sup>1</sup>, Edgar Martínez-Fernández<sup>2\*</sup>, Oscar Gabriel Villegas-Torres<sup>1</sup>, Manuel de Jesús Sainz-Aispuro<sup>1</sup>, Guadalupe Peña-Chora<sup>2</sup>, Víctor M. Hernández-Velazquez<sup>3</sup>, Jesús Hernández-Romano<sup>4</sup>

## RESUMEN

El objetivo fue evaluar la sensibilidad de la prueba de inmunostrips® en la detección de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causante del cancro bacteriano, con diferentes concentraciones bacterianas en presencia y ausencia de tejido de hoja o semilla de tomate. El diseño experimental fue un factorial, las variables evaluadas fueron composición de la muestra, concentración de la bacteria, tiempo de reacción e inhibición de la reacción. La prueba de InmunoStrips® detectó hasta 100 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$  por lo cual es 100 veces más sensible de lo reportado; además mostró resultados más claros sin presencia de tejido. El resultado de la reacción inmunocromática fue directamente proporcional a la concentración de la bacteria. El tiempo de reacción se vio directamente influido por la composición de la muestra y por la concentración de bacteria. En ninguno de los casos positivos fue necesario más de dos minutos de espera para observar la reacción cromática.

## PALABRAS CLAVE

cancro, bacteria, marchitez, diagnóstico, semilla

## ABSTRACT

The objective was to evaluate the sensitivity of the InmunoStrips® test in the detection of the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causing bacterial canker, with different bacterial concentrations in the presence and absence of leaf tissue or tomato seed. The experimental design was a factorial. The variables evaluated were sample composition, bacterium concentration, reaction time, and inhibition of the reaction. The InmunoStrips® test detected up to 100 CFU  $\mu\text{L}^{-1}$ , making it 100 times more sensitive than reported, and showed clearer results with no tissue present. The result of the immunochromatic reaction was directly proportional to the concentration of the bacterium. The reaction time was directly influenced by the composition of the sample and by the concentration of bacterium. In none of the positive cases it took more than two minutes of waiting to observe the chromatic reaction.

## KEYWORDS

canker, bacterium, wilting, diagnostic, seed

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

<sup>4</sup> Área de Biotecnología, Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

\* Autor para correspondencia. Av. Universidad 1001, col. Chamilpa. 62210 Cuernavaca, Morelos, México. Correo electrónico: edgar@uaem.mx

**Recibido:** 11 de julio de 2017

**Aceptado:** 7 de agosto de 2017

## INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza de mayor importancia en México debido a su elevado consumo y a que es la mayor generadora de divisas por exportación: representa ingresos anuales de 1 200 millones de dólares, sobre todo en los ciclos de invierno (Velasco *et al.*, 2011). Los problemas fitosanitarios son uno de los principales factores que afectan el rendimiento de este cultivo, el cual es atacado por diferentes insectos, bacterias, hongos y virus; sin embargo, en años recientes las enfermedades de origen bacteriano han cobrado especial importancia al incrementar su incidencia en este cultivo. Una de las bacterias más importantes es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) (Davis *et al.*, 1984), causante del cancro bacteriano, junto con *Ralstonia solanaceum*, causante de la marchitez del tomate y *Xanthomonas campestris*, causante de la mancha o peca del tomate (Jones *et al.*, 2008).

El grado de afectación en unidades de producción de tomate por el cancro bacteriano va de 1 a 100%, y provoca importantes pérdidas económicas. En 2011, México registró 56,025 ha de tomate, con una producción de 1,670,456 t y un valor de producción de 14,887,127.57 dólares; sin embargo, cada año, un porcentaje de ingresos está en riesgo dependiendo del grado de afectación. Para 2015, se reportaron 50,596 ha sembradas, con una producción de 3,098,329 t y un aumento de 99.67% en el valor de la producción (SIAP, 2017).

La bacteria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es un bacilo Gram positivo, no móvil, que en agar nutritivo desarrolla colonias de color amarillo claro a naranja de tipo mucoide (Schaad *et al.*, 2001). Los síntomas de la infección se manifiestan como marchitez unilateral de la planta, manchas de color café con aspecto de quemadura, lesiones en el tallo y los peciolo, además de manchas redondas y acuosas en el fruto, con el centro levantado y corchoso de color claro, a lo que se le conoce como ojo de pájaro o de pavo (Jones *et al.*, 2008).

El control del cancro bacteriano es difícil y problemático: una vez establecida la enfermedad, avanza rápidamente y no existe control. Con el fin de combatirla, se han utilizado antibióticos como la estreptomycin y oxitetraciclina sin resultados favorables (Jaehyuk *et al.*, 2014). Por lo anterior, se recomienda el uso de medidas preventivas como la desinfección de herramientas e instalaciones, la rotación de cultivos y el tratamiento de semilla con agua caliente a 60 °C durante 40 min, lo cual ha dado resultados positivos

(Dhanvantary, 1989). La bacteria puede sobrevivir hasta por 24 meses sobre la superficie del suelo y siete meses en restos vegetales (Gleason *et al.*, 1991). Se ha reportado que una forma de diseminación de la bacteria es el manejo de la plántula anterior al trasplante y que los síntomas pueden aparecer hasta 20 días después del trasplante de plántulas provenientes de semilla infectada (Chang *et al.*, 1991). Por lo tanto, es fácil dispersar la bacteria desde los almácigos hasta las aéreas de producción sin tener conocimiento de ello debido a que las plantas aún no han expresado síntomas (Werner *et al.*, 2002).

En este contexto, es importante la detección temprana de la bacteria para planear las actividades de manejo. La prueba de diagnóstico InmunoStrips® (Agdia®) es una prueba inmunológica de reacción rápida y manejo simple que puede ser realizada en el área de cultivo en cuanto aparezcan los primeros síntomas o de manera preventiva en plantas asintomáticas. También es factible realizar la prueba en semillas para detectar lotes contaminados antes de sembrar y, de esta manera, también evitar pérdidas económicas. Por lo anterior, el objetivo fue evaluar la sensibilidad de la prueba de InmunoStrips® para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con diferentes concentraciones bacterianas en presencia y ausencia de tejido de hoja y semilla de tomate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa bacteriana y prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. Se utilizó una cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, nativa del estado de Morelos, con clave CMM-C, aislada y donada por la Universidad Politécnica del Estado de Morelos. La bacteria se mantuvo en medio de cultivo NBY sólido (Schaad *et al.*, 2001) a temperatura media de 26 °C. Para evaluar la patogenicidad de la cepa, se inocularon plantas de tomate tipo saladette 'El Cid F1' (Harris Moran®), de 35 días después de la emergencia y establecidas en invernadero en macetas individuales de seis pulgadas, con una mezcla de sustrato 2:1 de turba comercial y perlita. Se regó manualmente con 300 mL de solución nutritiva por día por la mañana, y un riego de lavado por la tarde para reducir la acumulación de sales. Para evitar la contaminación del suelo, se recolectaron los lixiviados. La composición

de la solución nutritiva se hizo con base en el análisis químico del agua (Bautista *et al.*, 2010) usando la mezcla propuesta por Velasco *et al.* (2011) para etapa vegetativa.

### Preparación del inóculo e inoculación

Un cultivo bacteriano de seis días se diluyó en medio NBY líquido, para conseguir una suspensión bacteriana de  $300 \times 10^6$  UFC  $\mu\text{L}^{-1}$  (unidad formadora de colonia), que presentó una absorbancia de 0.100 a 600 nm, medida en un espectrofotómetro HACH® DR 5000 (México). La inoculación de la bacteria se realizó a 10 cm por encima de la base del tallo de la planta, en la parte media de la sección del tallo, que se encontraba entre la primera y la segunda hoja verdaderas, cuando la planta presentaba cuatro hojas verdaderas completas. Se utilizaron 20 plantas a las que se les realizó una perforación previa con una jeringa hipodérmica calibre 21, y se depositaron 5  $\mu\text{L}$  ( $1500 \times 10^3$  UFC) dentro del punto de inoculación. Se utilizaron 10 plantas inoculadas con agua bidestilada estéril como testigo.

### Diseño experimental y variables evaluadas

Se utilizó un diseño experimental factorial 3x5, con cuatro repeticiones, donde el primer factor fue la composición de la muestra utilizando bacteria cultivada en medio, tejido de hoja y semillas de tomate. El segundo factor fue la concentración de bacterias, en donde se consideraron cinco concentraciones 50, 100, 500, 1,000 y 10,000 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ . Las variables evaluadas fueron tiempo de reacción, medido en segundos (s); tipo de reacción (+,-) en porcentaje, y presencia o ausencia de inhibición en porcentaje. El valor de la concentración de la bacteria se obtuvo con el espectrofotómetro, y el tiempo de reacción con un cronómetro digital Hanhart® (México) modelo Specron. La reacción positiva o negativa se midió observando la reacción cromática y considerando los controles de la prueba + y - de InmunoStrips®. Para medir inhibición se consideró como base la prueba donde se utilizaron colonias bacterianas y se comparó con las muestras que contenían tejidos.

### Sensibilidad de InmunoStrips®

Las pruebas de inmunocromáticas InmunoStrips® son conocidas también como pruebas RIPA (Rapid Immunofilter Paper Assay), mencionadas por Shohara

*et al.* (1999). Éstas utilizan anticuerpos de bacterias o virus unidos a partículas de látex blanco (conjugados) inmovilizadas en una tira de papel filtro blanco. El conjugado tiene un colorante que se activa con la presencia del antígeno, generalmente rojo o rosa, para hacer visible la reacción positiva; en virus detecta hasta 50 ng  $\text{mL}^{-1}$  de partículas.

### Diluciones bacterianas

Se evaluó la sensibilidad de InmunoStrips® utilizando diferentes concentraciones de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* cultivada en medio NBY líquido por tres días. Se realizaron diluciones a partir de una suspensión de bacteria con absorbancia 0.100 nm medida con el espectrofotómetro antes mencionado, a partir de una concentración de 300 000 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ . Para detener la reproducción bacteriana, una vez medida la concentración, las diluciones se mantuvieron inmersas en hielo. En cada una de las bolsas de muestra previamente descongelada, la cual contenía 3 mL de solución Buffer, se agregaron concentraciones bacterianas; se mezcló el contenido con una varilla de vidrio y se colocó el InmunoStrips® a 0.5 cm de profundidad en la mezcla, asegurándose de mantener la bolsa de prueba en posición vertical y en una superficie plana; posteriormente, se esperó la reacción colorimétrica por 30 minutos, como máximo.

### Preparación del tejido foliar para InmunoStrips®

Se evaluaron concentraciones (50, 100, 500, 1,000 y 10,000 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, mismas utilizadas con tejido foliar, con cuatro repeticiones, cada una para determinar si la reacción antigénica mostraba inhibición en presencia de tejido foliar o diferencias en el tiempo y tipo de reacción. Se agregaron 0.15 g de tejido foliar sano de tomate directamente dentro de la bolsa con solución Buffer; se maceró raspándolo contra la malla integrada en la bolsa de prueba; luego, se agregó bacteria en la concentración correspondiente, se mezcló perfectamente y se colocó el InmunoStrips®. Se esperó 30 minutos como tiempo máximo de reacción para observar el resultado. Cada una de las bolsas de prueba permaneció en posición vertical.

### Semilla de tomate para InmunoStrips®

Se evaluaron las concentraciones de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* con macerado de semilla sana

para determinar si la reacción antigénica es afectada por presencia de los componentes de la semilla, como almidones. Se agregaron 0.15 g de macerado de semillas previamente lavadas, desinfectadas e hidratadas en agua bidestilada estéril, directamente dentro de cada bolsa con Buffer. Se maceraron las muestras en mortero con pistilo; después, se agregaron las concentraciones (50, 100, 500, 1,000 y 10,000 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de bacteria, con cuatro repeticiones cada una; se mezcló perfectamente cada muestra, se colocaron los InmunoStrips® y se esperó un tiempo de reacción de 30 minutos.

**InmunoStrips® para detección en tejido infectado**

Se empleó la prueba de InmunoStrips® para detectar *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejido infectado (hoja y tallo) con síntomas característicos como haces vasculares de coloración café, lesiones grisáceas a lo largo del tallo y semillas de frutos infectados que presentaban el síntoma de ojo de pájaro, obtenidos del ensayo de patogenicidad, colectadas 10 días antes de las pruebas y mantenidas en refrigeración a 4 °C. Se pesaron 0.15 g de cada una de las muestras de tejido vegetal y se maceraron raspándolas con la malla integrada en la prueba dentro de la bolsa de Buffer. Para la semilla, se llevó a cabo el procedimiento de macerado descrito anteriormente; después se colocó el InmunoStrips® a 0.5 cm de profundidad en el contenido del Buffer y se esperó la reacción por 30 minutos como máximo. Se realizaron cuatro repeticiones para cada tipo de tejido.

**Análisis de datos**

Para analizar los datos se realizó un análisis de varianza, una prueba de comparación de medias por DMS ( $p \leq 0.05$ ) con el programa estadístico SAS 9.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Prueba de patogenicidad**

En la prueba de patogenicidad, el resultado fue positivo a partir del día nueve; las plantas desarrollaron síntomas asociados al cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. La enfermedad comenzó con una marchitez localizada en la tercera hoja verdadera de la planta empezando por el foliolo del ápice de la hoja y avanzando hacia los demás foliolos. Presentó un halo amarillo en la



Figura 1. Síntomas iniciales del cancro bacteriano en hoja de tomate a los seis días después de la inoculación.

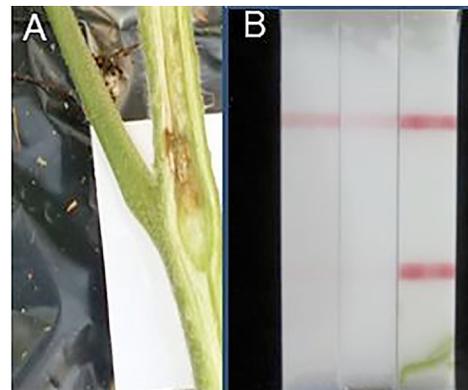


Figura 2. (A) Necrosamiento en haces vasculares en tallo de tomate infectado con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seis días después de la inoculación y (B) InmunoStrips® positivo en tallo.

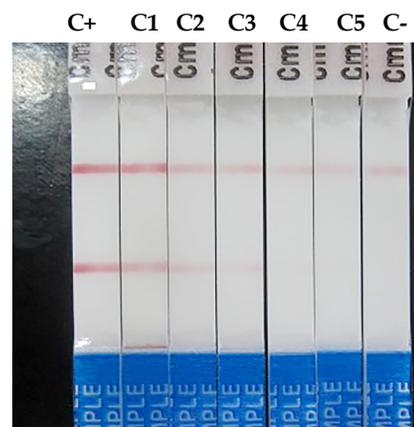


Figura 3. Resultado cromático de InmunoStrips® en cinco concentraciones de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; C1:10 000, C2:1000, C3:500, C4:100 y C5:50 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ .

zona de avance, lo cual coincide con lo reportado por Jones *et al.* (2008).

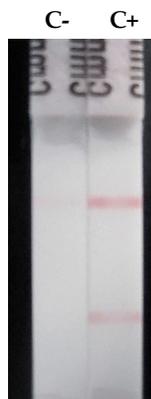


Figura 4. Controles (-) y (+) de la prueba ImmunoStrips® utilizada para el diagnóstico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el cultivo de tomate.

Se observaron manchas de color café con aspecto de quemadura en las hojas, con presencia de una sección clorótica en la zona de avance y marchitez localizada (figura 1). Las hojas enfermas se tornaron de un color verde pardo y después cambiaron a color café con aspecto de quemadura y marchitez progresiva, síntomas que coinciden con los reportados por Masao (1992). La enfermedad avanzó del punto de inoculación en sentido acropétalo causando la marchitez de hojas completas o zonas localizadas; los folíolos tendieron a curvarse en las puntas afectadas, generalmente hacia abajo o de lado, lo que produjo un enchinamiento. En el tallo se desarrollaron lesiones grisáceas a partir del punto de inoculación en la parte externa y coloración café oscura en los haces vasculares (figura 2A), lo cual coincide con los síntomas desarrollados por plantas infectadas por la bacteria en Jones *et al.* (2008). Las plantas control no desarrollaron ningún síntoma.

### Sensibilidad de ImmunoStrips®

En las bandas de ImmunoStrips® se observaron claramente las reacciones inmunocromáticas semejantes al control positivo de la prueba cuando se usaron sólo suspensiones bacterianas hasta 100 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ , pero la cloración de las bandas presentó menor intensidad de color rosa a medida que la concentración bacteriana descendió (figura 3). En esta prueba de detección se recomienda esperar un tiempo de reacción de 30 minutos; sin embargo, las reacciones positivas en todas las muestras aparecen en no más de dos minutos. Es importante señalar que, en todos los casos, el control negativo presentó reacción cromática muy ligera en la primera banda, lo

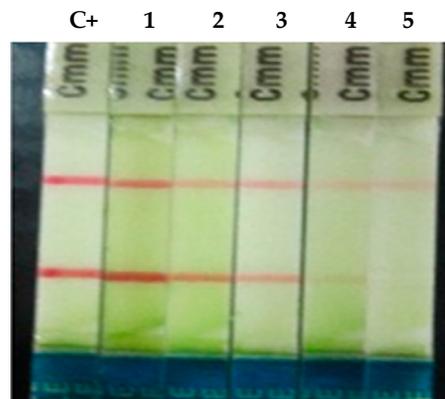


Figura 5. Resultado cromático de ImmunoStrips® en hoja de tomate infectada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; 1:10 000, 2:1000, 3:500, 4:100 y 5:50 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ .

cual ocurre normalmente en pruebas de detección por ImmunoStrips®, como se puede observar en la figura 4.

### Tejido foliar en ImmunoStrips®

La prueba de ImmunoStrips® en tejido de hoja aparentemente no presenta ninguna inhibición de la reacción y se comporta de manera muy similar en cuanto a la reacción cromática y tipo de reacción, con respecto a las muestras de bacteria, lo que demuestra que la presencia de tejido de hoja no disminuye la sensibilidad de la prueba. A pesar de la coloración verde por el tejido acumulado en los ImmunoStrips®, la prueba detectó la misma concentración bacteriana (figura 5). El tiempo de reacción presentó una media de 38.6 s con diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) respecto a las muestras de bacteria y semilla (cuadro 1).

Cuadro 1. Comportamiento de diferentes tipos de muestra utilizada para el diagnóstico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*.\*

MUESTRA PROBADA	TIEMPO DE REACCIÓN (S)	REACCIÓN POSITIVA (%)	INHIBICIÓN DE REACCIÓN (%)
Bacteria	35.8 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
Hoja	38.6 <sup>b</sup>	80 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
Semilla	41.2 <sup>c</sup>	80 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>

\* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (DMS  $p \leq 0.05$ )

### ImmunoStrips® en semilla

Los resultados de sensibilidad de prueba de ImmunoStrips® para detectar a *Clavibacter michiganensis*

subsp. *michiganensis* en semillas mostraron una reacción cromática positiva, como se observan en la figura 6. El tiempo de reacción aumentó ligeramente con una media de 41.2 s, la cual fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) a las muestras de bacteria y hoja (cuadro 1). Blakemore *et al.* (1992) reportan que, en pruebas inmunológicas donde se involucran enzimas, los carbohidratos complejos de la semillas pueden ser un elemento de influencia en la reacción; también mencionan que existe la posibilidad de presencia de inhibidores por la cantidad o tipo de tejido adicionado a la muestra. Sin embargo, en este estudio no hubo inhibición de la reacción al realizar la prueba con semillas de tomate, lo cual es relevante debido a que la semilla contaminada y plántula infectada son causas de dispersión del patógeno (Frenkel *et al.*, 2016). Los resultados muestran que la reacción positiva e inhibición de la reacción están directamente relacionadas con el factor concentración de la bacteria (cuadro 2).

**Cuadro 2. Comportamiento de diferentes concentraciones de bacterias en la prueba InmunoStrips® utilizada para el diagnóstico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.\***

CONCENTRACIÓN (UFC $\mu\text{L}^{-1}$ )	TIEMPO DE REACCIÓN (s)	REACCIÓN POSITIVA (%)	INHIBICIÓN DE REACCIÓN (%)
50	0.0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
100	64.2 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
500	52.3 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
1000	46.0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
10000	30.0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

\* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (DMS  $p \leq 0.05$ )

El análisis de la combinación de muestra probada y concentración mostró que el menor tiempo de reacción se obtuvo con la concentración de 10,000 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$  sin diferencia significativa entre hoja y semilla de tomate, con una diferencia de 15.6% comparada con bacteria, lo cual sugiere que la prueba puede realizarse en hoja o semilla. Se han reportado posibilidades de detección de una concentración hasta de 10,000 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ ; sin embargo, se encontró que la prueba presenta mayor sensibilidad. Puesto que la prueba de InmunoStrips® mostró 100% de reacción positiva en todas las concentraciones  $\geq 100$  UFC  $\mu\text{L}^{-1}$  e inhibición de la reacción en la concentración de 50 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ . Estos resultados fueron más claros cuando la muestra se compuso sólo de bacteria (cuadro 3).

**Cuadro 3. Efecto de la prueba de InmunoStrips® en los tratamientos evaluados.**

TRATAMIENTOS	TIEMPO DE REACCIÓN (s)	REACCIÓN POSITIVA (%)	INHIBICIÓN DE REACCIÓN (%)
Bacteria + 50 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	0 <sup>a*</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
Hoja + 50 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
Semilla + 50 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
Bacteria + 100 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	60 <sup>h</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Hoja + 100 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	65 <sup>i</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Semilla + 100 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	67 <sup>j</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Bacteria + 500 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	49 <sup>f</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Hoja + 500 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	50 <sup>f</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Semilla + 500 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	58 <sup>g</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Bacteria + 1 000 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	43 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Hoja + 1 000 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	46 <sup>e</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Semilla + 1 000 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	49 <sup>f</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Bacteria + 10 000 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	27 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Hoja + 10 000 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	32 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>
Semilla + 10 000 UFC $\mu\text{L}^{-1}$	31 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

\* Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (DMS  $p \leq 0.05$ )

**InmunoStrips® para detección en tejido infectado**

Cuando se utilizó la prueba de InmunoStrips® para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en tallo, hoja y semilla infectados, los mejores resultados se observaron en tallo, posiblemente por una concentración alta de bacterias que provocó una fuerte reacción positiva, la cual fue superior a la observada con la máxima concentración de 10,000 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$  (figura 2b). Se infiere que la bacteria, al ser un patógeno vascular, se encuentra en mayor concentración en tejidos que contengan haces vasculares (Jones *et al.*, 2008). Mientras que en semilla y hoja no hubo



Figura 6. Resultado cromático de InmunoStrips® en semilla infectada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; 1:10 000, 2:1000, 3:500, 4:100 y 5:50 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ .

resultados cromáticos claros, es posible que el tiempo transcurrido desde el muestreo hasta la realización de la prueba haya influido.

La prueba de InmunoStrips® para *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis* no detecta un antígeno de la célula bacteriana, sino los polisacáridos adheridos alrededor de la bacteria (Agdia®, 2013). Por lo tanto, se necesita mayor cantidad de bacterias que tengan la capa de polisacáridos (figuras 3, 5 y 6). Apparentemente, la cantidad del patógeno influyó directamente en la reacción cromática, como lo señalan Shohara *et al.* (1999) para el caso de virus. Existieron claras diferencias en el tiempo de reacción en bacteria, hoja y semillas de tomate al emplear la prueba de InmunoStrips® (figura 7).

## CONCLUSIONES

La prueba de diagnóstico de InmunoStrips® puede ser una herramienta para detectar de forma rápida y sencilla a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejido de hoja y semilla. La prueba detectó hasta 100 UFC  $\mu\text{L}^{-1}$ , lo que representa que es 100 veces más sensible de lo reportado convencionalmente; por lo tanto, se considera una prueba de diagnóstico *in situ* con suficiente sensibilidad.

El resultado de la reacción inmunocromática fue directamente proporcional a la concentración de la bacteria. El tiempo de reacción se vio directamente influido por el material biológico utilizado como muestra y por la concentración de bacteria; sin embargo, en ninguno de los casos positivos fueron necesarios más de dos minutos para observar la reacción cromática.

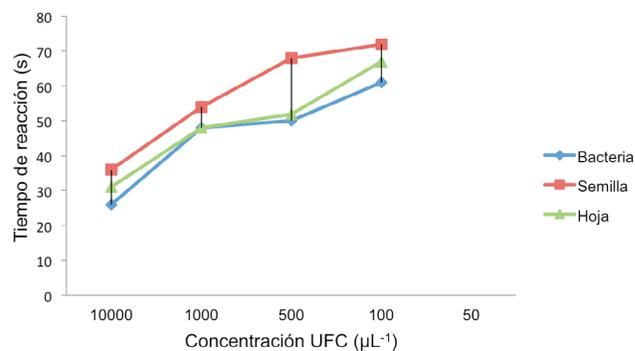


Figura 7. Tiempo de reacción de la prueba en diferentes tipos de muestra para el diagnóstico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt de México, por el apoyo para realizar estudios de posgrado de MCR-B (becario núm. 96505). Por su parte, FOMIX Morelos-Conacyt (MOR-2010-C01-148777) aportó financiamiento al desarrollo de este proyecto. La Universidad Autónoma del Estado de Morelos otorgó facilidades para el desarrollo de la presente investigación.

## LITERATURA CITADA

- Agdia®. 2013. Nota técnica e instructivo. ImmunoStrip® test for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Catalog. STX44001.
- Bautista M. N., C. Chavarín P., F. Valenzuela E. 2010. Jitomate. Tecnología para su Producción en Invernadero. Segunda edición. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 214 pp.
- Blakemore, E. J. A., J. C. Reeves, F. L. Ball. 1992. Polymerase chain reaction used in the development of DNA probe to identify *Erwinia stewartii*, a bacterial pathogen of maize. *Seed Science and Technology* 20(2): 331-335.
- Davis, M. J., A. J. Jr. Gillespie, A. K. Vidaver, R. W. Harris. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp., nov. & *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34(2): 107-117.
- Chang, O. R. J., S. M. Ries, J. K. Pataky. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* 81(11): 1276-1281.
- Dhanvantary, B. N. 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 400-408.
- Foster, R. L., E. Echandi. 1973. Relation of age of plants, temperature and inoculum concentration to bacterial canker development in resistance and susceptible *Lycopersicon* spp. *Phytopathology* 63: 773-777.
- Frenkel, O., M. Bornstein, R. Shulhani, D. Shtienberg. 2016. Secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in nurseries and the conditions leading to infection of tomato seedlings. *Europa Journal of Plant Pathology* 144: 169-179.
- Gleason, M. L., E. J. Braun, W. M. Carlton, R. H. Peterson. 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 81: 1519-1523.
- Jaehyuk, C., H. B. Kwang, M. Eunpyo. 2014. Antimicrobial Effects of a Hexapeptide KCM21 against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *The Plant Pathology Journal* 30(3): 245-253.
- Jones, J. B., T. A. Zitter, T. M. Momol, S. A. Miller. 2008. *Compendium of Tomato Diseases*. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, USA. 176 pp.
- Masao, G. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press. San Diego, USA. 342 pp.
- Schaad, N. W., J. B. Jones, W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. Bacteriology Committee of the American Phytopathological Society. APS Press. St Paul, USA. 373 pp.
- Shohara, K., L. V. Williams, D. A. Duchase, L. P. Lopez. 1999. RIPA (Rapid Immunofilter Paper Assay). pp. 107-110. Decampo, D. M., S. L. Lenordón (eds.) *Métodos para Detectar Patógenos Sistémicos*. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA-JICA. Córdoba, Argentina.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación (SIAP). 2017. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>, consultado el 10 de junio de 2017.
- Velasco, H. E., R. Nieto Á., E. R. Navarro L. 2011. *Cultivo de Tomate en Hidroponía e Invernadero*. Tercera edición. Editorial Mundi-Prensa. México, D. F. 128 pp.
- Werner, N. A., D. W. Fullbright, R. Podolsky, J. Bell, M. K. Hausbeck. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Disease* 86(5): 535-542.