

Ensayos de laboratorio para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* en tubérculos de patata

C. NOVAL, S. LLAMAS, M. T. SEISDEDOS y R. MARQUINEZ

La detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IF), hibridación molecular e inoculación de berenjenas fue estudiada sobre extractos procedentes de tubérculos de patata muy contaminados, poco contaminados y patatas sanas. Las tinciones de IF fueron realizadas con anticuerpo monoclonal y policlonal y la especificidad de ambos antisueros fue comparada.

C. NOVAL, S. LLAMAS, M. T. SEISDEDOS. Subdirección General de Sanidad Vegetal - Madrid.

R. MARQUINEZ. Servicio de Semillas y Plantas de Vivero - Gobierno vasco. Vitoria.

Palabras clave: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Solanum tuberosum*, bacterias.

INTRODUCCION

La Podredumbre anular de la patata es una enfermedad causada por la bacteria corineforme *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (SPIECKERMANN et KOTTHOFF) DAVIS *et al* 1984 (Cms). Descrita por primera vez en Alemania (APPEL, 1906) aparece en numerosas regiones productoras de patata (C. M. I., 1983), incluidas algunas de la Comunidad Europea. España se mantiene libre de esta bacteriosis cuya introducción representaría un especial peligro en las zonas productoras de patata de siembra.

La enfermedad ocasiona, en campos y almacenes, importantes pérdidas económicas, tanto en patatas de siembra como de consumo, por lo que la bacteria Cms figura listada como organismo de cuarentena en las Legislaciones Fitosanitarias de la mayoría de los países.

La Podredumbre anular se difunde principalmente al sembrar patatas contaminadas. En el campo la infección de los tubérculos suele deberse a bacterias procedentes de la planta madre que a través del estolón pene-

tran por el ombligo y, poco a poco, colonizan el sistema vascular. El peligro de contaminación de los tubérculos no se limita al campo, y así, por ejemplo, cuando se recolectan con la misma maquinaria varias parcelas y una de ellas está infectada es muy probable que, por contacto, las partidas recolectadas posteriormente resulten también infectadas. De forma similar, los almacenes, materiales de embalaje, aperos de labranza o herramientas de corte, actúan, una vez contaminados, como fuentes de inóculo (CLAYTON *et al.*, 1988; NOVAL *et al.*, 1987).

Las medidas de lucha, tendentes a impedir el establecimiento del patógeno o a erradicar la enfermedad, se basan de forma principal en el uso de tubérculos de siembra sanos. Las inspecciones visuales de campos y almacenes no son efectivas ya que la manifestación de síntomas depende de una serie de factores como pueden ser las condiciones ambientales, la resistencia varietal o el grado de contaminación (BISHOP y SLACK, 1987; MANZER *et al.*, 1987; NELSON, 1982). Por ello resulta imprescindible realizar, como medida básica para evi-

tar siembras de tubérculos contaminados, análisis fitosanitarios en laboratorios con técnicas que ofrezcan la más alta fiabilidad.

Aunque existe un método oficial (ANÓNIMO, 1987) aplicado en todos los países de la CE para analizar lotes de tubérculos de patata asintomáticos, el Grupo de expertos en bacteriología de la CE, consciente de las dificultades que entraña el mismo y ante la posibilidad que el desarrollo científico permita elaborar una metodología más perfecta, estudia, por medio de un Proyecto comunitario, las técnicas modernas de diagnóstico con vistas al perfeccionamiento y simplificación de los análisis. Los resultados que hemos obtenido al hibridar cultivos puros con sondas no radioactivas de DNA, empleadas para la detección de Cms, han sido expuestas previamente (LLAMAS *et al.*, 1993).

Nuestro objetivo en esta parte del Proyecto era detectar Cms en lotes de tubérculos de patata con distinto grado de contaminación (muy contaminados, poco contaminados y sanos) mediante Inmunofluorescencia indirecta (IF), hibridación molecular e inoculación de berenjenas. Paralelamente fue ensayado un antisuero monoclonal para la tinción de IF.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de patatas

Ocho lotes de patatas (M-51, M-52, M-53, M-54, M-55, M-56, M-57 y M-58), constituidos por 100 tubérculos cada uno, fueron procesados. Las muestras, remitidas al laboratorio desde Bélgica en perfectas condiciones de embalaje, habían sido infectadas experimentalmente con Cms por lo que fueron manipuladas con especiales medidas de seguridad al objeto de impedir no sólo una recontaminación entre partidas, que interferiría en los resultados de los análisis, sino también cualquier otra posible dispersión del patógeno.

Cultivos bacterianos

Cuarenta y seis aislados bacterianos fueron utilizados a lo largo de estos estudios.

La cepa de Cms NCPPB (1) 2140 (cepa de referencia equivalente a PD (2) 323) fue usada como control positivo en todos los experimentos; ocho cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (McCulloch) DAVID *et al.*, 1984 (Cmi), siete del género *Arthrobacter* y treinta saprofitos aislados de patata fueron ensayados para determinar la especificidad de dos antisueros. Diversas características de estos cultivos, incluida la capacidad de hibridación con sondas de DNA utilizadas en la detección de Cms, han sido expuestas en un trabajo previo (LLAMAS *et al.*, 1993).

La cepa de Cms 2140 se mantuvo conservada en tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M (pH 7.2) cuya composición es: PO₄HNa.12H₂O, 2,7 g; PO₄H₂Na. 2 H₂O, 0,4 g; ClNa, 8,0 g; H₂O destilada, 1 l., al que se le había añadido un 10 % de glicerol con el fin de prolongar la capacidad de supervivencia de las células virulentas (JANSE y VAN VAERENBERGH, 1987). Diluciones en agua destilada estéril que contenían entre 10⁶ y 10⁸ cel/ml fueron utilizadas para las tinciones de IF e inoculaciones de berenjenas.

Las restantes bacterias fueron rutinariamente cultivadas a 21.º C en Y. P. G. A., pH 7.2, conteniendo (g/l): Extracto de levadura Bacto Difco, 5 g.; Peptona Bacto Difco, 5 g.; D (+) Glucosa (monohidrato), 10 g.; Agar purificado Difco, 15 g. Diluciones en agua destilada estéril de 10⁷ bact/ml fueron preparadas para realizar tinciones de IF.

Antisueros

Dos antisueros fueron utilizados. El policlonal CS 2050, preparado en Francia contra Cms CFBP (3) 2050 (= NCPPB 2140) por el Institute National de la Recherche Agronomique de Angers (SAMSON y POUTIER, 1979) y comercializado por Sanofi, que es el habitualmente empleado en nuestro laboratorio para análisis de patatas relativos a Cms. La dilución de uso fue 1/400 en 0,01

(1) NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (UK).

(2) PD: Culture Collection of Plant Protection Service, Wageningen (NL).

(3) CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (FR).

M PBS. Como conjugado con isotiocianato de fluoresceína fue empleado el Pasteur 74561 a la dilución 1/100 en 0,01 M PBS.

El otro anticuerpo ensayado fue McAb 9A₁ (9A₁) designado inicialmente McAb5 (DE BOER y WIECZORECK, 1984) monoclonal desarrollado en el Agriculture Canada Research Station, Vancouver, BC contra un antígeno de la pared celular de Cms. Está comercializado por Adgia y nos fue proporcionado para estos ensayos por el Servicio de Semillas y Plantas de Vivero de Vitoria. La dilución de uso fue 1/100 en 0,01 PBS. Por razones de suministro dos conjugados con isotiocianato de fluoresceína fueron empleados: el comercializado por Adgia (suero de cabra polivalente anti IgC + IgM de ratón) y el F 1010 de Sigma (suero de cabra polivalente anti IgG + IgA + IgM de ratón). Las diluciones de uso 1/100 y 1/300 en 0,01 M PBS fueron respectivamente utilizadas.

Sonda

La sonda utilizada fue Diagen para Cms obtenida en Dusseldorf (Alemania) por la compañía Diagen. Fue marcada de manera no radioactiva con biotina mediante el kit «BioNick™ Labelling System» de la casa comercial BRL, siguiendo el protocolo recomendado por ésta.

Cultivo de berenjenas

Semillas de berenjenas (*Solanum melongena* L. cv. Black Beauty) fueron utilizadas. En invernaderos, acondicionados especialmente para los bioensayos y cedidos por el Centro de Investigación y Mejora Agraria (C. I. M. A.) de Vitoria, se procedió a la siembra de semilleros y al cuidado de las plantas, de acuerdo con las condiciones óptimas requeridas para su desarrollo (LELLIOT y SELLAR, 1976).

Aproximadamente al mes y medio de efectuadas las siembras, las plantas presentaban 2-3 hojas verdaderas completamente expandidas.

Obtención de extractos bacterianos

A partir de los ocho lotes de patatas los

extractos bacterianos fueron preparados según el protocolo establecido para análisis masales en el método oficial (ANÓNIMO, 1987). Los precipitados obtenidos después de la centrifugación fueron resuspendidos en 1 ml. de 0,01 M PBS y distribuidos en alicuotas a razón de 200 µl para IF con antisuero policlonal, 200 µl para IF con anticuerpo monoclonal, 200 µl para hibridación de DNA, 200 µl para inocular berenjenas y 200 µl para posibles referencias.

Los extractos destinados a IF con antisuero policlonal y a hibridación fueron utilizados directamente, mientras que los restantes fueron conservados a -20.º C después de añadirles un 10 % de glicerol.

Un error cometido en el procesamiento de la muestra M-53, al ser excluido del análisis masal un tubérculo descompuesto, motivó la preparación de dos nuevos extractos para subsanar, dentro de lo posible, los resultados de los análisis. Ambos extractos se obtuvieron por introducción en 0,01 M PBS de pequeños fragmentos de patata, que incluían preferentemente tejidos vasculares próximos al talón, lugar donde existen más probabilidades de encontrar la bacteria (LELLIOT y SELLAR, 1976); después de ser mantenidos en agitación durante 1 hora, 1 ml. de la suspensión resultante fue recogido y dividido en alicuotas de 200 µl como en el proceso precedente. El extracto designado como E-53 P procedía de varios tubérculos de la muestra M-53 que presentaban un ligero amarilleamiento de vasos y fue utilizado en todos los ensayos. El segundo extracto, designado como E-53 procedía exclusivamente de tejidos del tubérculo no procesado en el análisis masal, y se utilizó únicamente para hacer la hibridación del DNA.

Tinción de inmunofluorescencia

A partir de cada suspensión de los extractos, tres diluciones decimales en agua destilada fueron preparadas para ser, juntamente con la concentrada, sometidas a la tinción de inmunofluorescencia indirecta.

Con el antisuero policlonal CS 2050 se procedió de acuerdo con el método Oficial.

En el caso del monoclonal 9A₁ se siguieron las recomendaciones indicadas por la casa

distribuidora, modificando únicamente el fluido de montaje de los portaobjetos para el que se empleó 0,1 M tampón fosfato glicerina, pH 7.6 ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3,2 g.; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g.; glicerol, 50 ml.; H_2O destilada, 100 ml.).

Gotas de 20 μl de las suspensiones bacterianas y del control 0,01 M PBS, fueron depositadas sobre pocillos de 6 mm. de diámetro en portaobjetos múltiples (10 pocillos/portaobjetos).

A fin de evitar posibles interferencias, las diluciones de cada extracto de patata y del testigo positivo fueron colocadas en portaobjetos diferentes. Sin embargo, para los ensayos de especificidad de los antisueros frente a los aislados de Cmi, *Arthrobacter* y saprofitos, en cada portaobjetos se distribuyeron por duplicado las suspensiones correspondientes a tres organismos diferentes, depositándose PBS en los pocillos intermedios.

Características de fluorescencia, tamaño y forma de las bacterias fueron anotadas. En

las observaciones correspondientes a muestras de extractos de patatas procesadas con el antisero policlonal CS 2050, la población de células fluorescentes por ml. de precipitado con morfología típica corineforme fue determinada y en ausencia de células fluorescentes el resultado de la tinción fue considerado negativo.

Hibridación

A cada vial conteniendo 200 μl de los correspondientes extractos fueron incorporados 800 μl de 0,01 M PBS, excepto para E-53 PP con el que se utilizó el mililitro de extracto disponible. La extracción de los ácidos nucleicos, su fijación a la membrana de nylon, prehibridación, hibridación y detección se realizó según publicación precedente (LLAMAS *et al.*, 1993). La distribución de las muestras sobre la membrana figura en el Cuadro 1; la temperatura de lavado con 0,1 X SSC, conteniendo 1 % SDS, fue de 60.° C.

Cuadro 1.—Distribución de los extractos de patata en la membrana y resultados de la hibridación

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B		E-51		E-52		E-53		E-53 P		E-53 PP	
		+		-		-		-		+	
C											
D		E-54		E-55		E-56		E-57		E-58	
		-		+		+		-		-	
E											

+: Señal de hibridación positiva

-: Señal de hibridación no patente

Inoculación de berenjenas

Once grupos, constituidos cada uno por 25 plantas de berenjena en estado de 2-3 hojas expandidas, fueron formados.

Con ayuda de un escalpelo estéril, una incisión longitudinal de 0,5-1 cm. y una profundidad próxima a 3/4 del diámetro del tallo, fue realizada entre los cotiledones y la 1.ª hoja. En la herida, mantenida abierta con la punta del escalpelo, fue introducido el inóculo mediante un pequeño pincel impregnado de las suspensiones. El primer grupo de plantas constituyó el control negativo y

fue inoculado con 0,05 M PBS pH 7.0 (PO_4HNa_2 , 4,26 g.; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 2,72 g.; ClNa , 8,0 g.; H_2O destilada, 1 l). A continuación se procedió a aplicar cada uno de los extractos bacterianos en el siguiente orden: E-52, E-54, E-57, E-58, E-56, E-51, E-55, E-53 y E-53 P. El último grupo de berenjenas, testigo positivo, fue inoculado con una dilución en agua destilada estéril de Cms 2140.

Las plantas, se mantuvieron durante 43 días en las siguientes condiciones: temperatura diurna entre 20 y 24.° C, temperatura nocturna de 15.° C y fotoperiodo de 14 horas.

Ocho días después de la inoculación, la aparición de síntomas fue buscada periódicamente dos veces por semana.

RESULTADOS

Tinción de inmunofluorescencia

En examen microscópico las bacterias marcadas aparecen bordeadas con una ligera fluorescencia amarillo verdosa sobre fondo negro. Las células de Cms son pequeñas, ovoides y se presentan con frecuencia en grupos de dos o en empalizadas.

Extractos de tubérculos

Cms fue detectado, como se refleja en el Cuadro 2, sobre los mismos extractos al emplear los antisueros CS 2050 y 9A₁.

Cuadro 2.—Resultados de la tinción de Inmunofluorescencia indirecta sobre extractos de tubérculos

Extracto	Antisuero Policlonal CS 2050	Anticuerpo Monoclonal 9A ₁
E-51	+++	+++
E-52	-	-
E-53	-	-
E-53 P	-	-
E-54	-	-
E-55	+++	+++
E-56	+++	+++
E-57	-	-
E-58	-	-
T +	+++	+++

T+ = Control positivo (NCPPB 2140 Cms)
 - = Fluorescencia negativa
 +++ = Fluorescencia positiva; tamaño y forma similares

El cálculo de la población bacteriana en los extractos se estimó en base a las observaciones de los análisis realizados con el antisuero policlonal. La mayor concentración bacteriana se detectó en E-55 (1,5 x 10⁷ cel. / ml), seguida de E-51 (1,2 x 10⁶ cel. / ml) y por último E-56 (3,5 x 10⁵ cel. / ml). La población bacteriana de los restantes extractos fue considerada negativa.

Cultivos puros

Los resultados obtenidos al aplicar los dos antisueros a las diluciones de cultivos puros de Cmi, *Arthrobacter* y saprofitos se han reflejado en los Cuadros 3, 4 y 5 respectivamente.

Cuadro 3.—Resultados de la tinción de Inmunofluorescencia indirecta sobre cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. insidiosus

Extracto	Antisuero Policlonal CS 2050	Anticuerpo Monoclonal 9A ₁
PD 239	+	-
LMG 7323	+	-
LMG 3675	+	-
LMG 3676	+	-
LMG 7325t ₁	+	-
LMG 7325t ₂	+	-
7324r ₁	+	-
7324r ₂	+	-
T +	+++	+++

T+ = Control positivo (NCPPB 2140 Cms)
 - = Fluorescencia negativa
 ++ = Fluorescencia positiva; diferencia en tamaño y/o forma
 +++ = Fluorescencia positiva; tamaño y forma similares
 LMG = Laboratorium Microbiology Gent Culture Collection, Belgique

Cuadro 4.—Resultados de la tinción de Inmunofluorescencia indirecta sobre cepas del género *Arthrobacter*

Cepa	Antisuero Policlonal CS 2050	Anticuerpo Monoclonal 9A ₁
<i>A. oxydans</i> (NCIMB 9333)	+	-
<i>A. pascens</i> (NCIMB 8910)	+	-
<i>A. aurescens</i> (NCIMB 8912)	+	-
<i>A. ramosus</i> (NCIMB 9066)	+	-
<i>A. chrystallopoites</i> (NCIMB 9499)	+	-
<i>A. histidinovorans</i> (NCIMB 9541)	-	-
<i>A. polychromogenes</i> (NCIMB 10267)	-	-
T +	+++	+++

T+ = Control positivo (NCPPB 2140 Cms)
 NCIMB = National Collection of Industrial and Marine Bacteria Aberdeen, Schotland, U. K.
 - = Fluorescencia negativa
 + = Fluorescencia positiva; diferencia en tamaño y/o forma
 +++ = Fluorescencia positiva; tamaño y forma similares

Cuadro 5.-Resultados de la tinción de Inmunofluorescencia indirecta sobre saprofitos aislados de tubérculos

Aislado	Antisuero Policlonal CS 2050	Anticuerpo Monoclonal 9A ₁	Aislado	Antisuero Policlonal CS 2050	Anticuerpo Monoclonal 9A ₁
S-1	+	-	S-17	+	-
S-2	+	-	S-18	+	-
S-3	+	-	S-19	+	+?
S-4	-?	-	S-20	+	-
S-5	-	-	S-21	+	-
S-6	-	-	S-22	+	-
S-7	+?	-	S-23	+	-
S-8	-	-	S-24	+	-
S-9	+?	-	S-25	+	-
S-10	-	-	S-26	+++	-
S-11	-	-	S-27	+	-
S-12	+	-	S-28	+	-
S-13	+	-	S-29	+	-
S-14	+	-	S-30	+	-
S-15	-	-	T +	+++	+++
S-16	+	+?			

T+ = Control positivo (NCPPB 2140 Cms)

- = Fluorescencia negativa

+ = Fluorescencia positiva; diferencia en tamaño y/o forma

+++ = Fluorescencia positiva; tamaño y forma similares

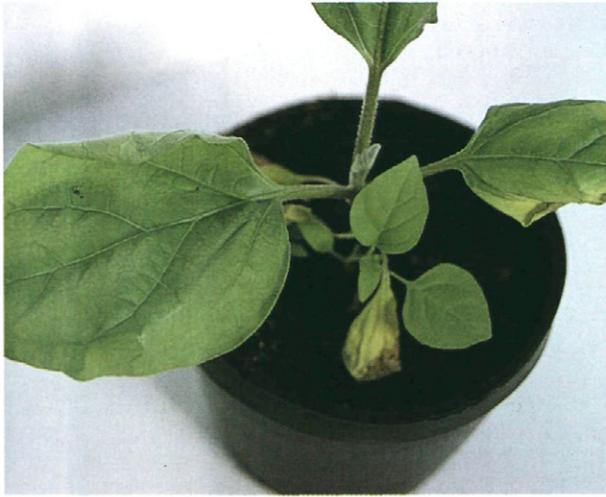
Cuadro 6.-Bioensayo de berenjenas (n.º de plantas con daños de Cms)

d	i	PBS 0,05 M	E-51	E-52	E-53	E-53 P	E-54	E-55	E-56	E-57	E-58	T +
9		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16
15		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
19		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23
21		0	2	0	0	0	0	2	7	0	0	24
23		0	2	0	0	0	0	2	7	0	0	25
27		0	9	0	0	0	0	2	10	0	0	25
30		0	10	0	0	2	0	4	15	0	0	25
33		0	10	0	0	2	0	4	17	0	0	25
36		0	17	0	0	2	0	4	20	0	0	25
40		0	21	0	0	2	0	4	25	0	0	25
43		0	25	0	0	2	0	8	25	0	0	25

i = inóculo

d = n.º de días transcurridos desde la inoculación

T + = control positivo (NCPPB 2140 Cms)



a

Hibridación molecular

No se obtuvieron señales con los extractos E-52, E-53, E-53 P, E-54, E-57 y E-58, detectándose Cms en las restantes muestras (Cuadro 1). La intensidad de la hibridación en orden decreciente fue E-53 PP > E-55 > E-51 > E-56.

Inoculación de berenjenas

Cms produce un marchitamiento que puede comenzar como una ligera flacidez de los tejidos situados entre los nervios o en la zona marginal de las hojas. Inicialmente la zona marchita puede adquirir una coloración verde oscura, aparecer moteada y tener aspecto grasiento, después se vuelve más pálida y comienza a necrosarse; los bordes de los tejidos necróticos adquieren una tonalidad amarillo brillante.

La manifestación de síntomas en las plantas inoculadas con testigo positivo apareció entre los 12 y 23 días, momento en el que todas ellas presentaban indicios de marchitamiento. Las inoculaciones con los extractos E-51, E-55 y E-56 comenzaron a mostrar síntomas a partir de los 21 días y las efectuadas con E-53 a los 30 días, mientras que ni las realizadas con las restantes muestras ni con el tampón 0,05M PBS presenta-



b

Fig.1.-Síntomas producidos por inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* en berenjenas:

- a) Clorosis, flacidez y necrosis de las hojas
- b) Cuatro diferentes estadios de evolución sintomatológica
- c) Aspecto conjunto de las 25 plantas de berenjenas inoculadas con cultivo puro de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

c



ron ningún tipo de anomalía a los 43 días, momento en que se dieron por finalizadas las observaciones. (Fig. 1).

En el Cuadro 6 aparecen recogidos los datos relativos a la evolución del número de plantas sintomáticas dentro de cada bloque.

DISCUSION

Cuando se realiza la tinción de IF para Cms, y sobre todo al aplicar antisueros policlonales, es normal la visualización de bacterias fluorescentes distintas a la buscada (CALZOLARI *et al.*, 1982; CROWLEY y DE BOER, 1982; SAMSON y POUTIER, 1979). Así, por ejemplo, algunos *Pseudomonas* sp. de los grupos IV y V de LELLIOT (LELLIOT *et al.*, 1966) aparecen con una fluorescencia más o menos intensa; aislados de *Erwinia carotovora*, frecuentes en extractos de patatas, se tiñen positivamente aunque se aprecia que sus células son de mayor tamaño; también es frecuente observar en cualquier preparación fondos con bacterias de color marrón o amarillo pálido y figuras brillantes o partículas muy fluorescentes que deambulan por los campos microscópicos. La comparación morfológica con un control positivo, y la experiencia, ayuda a resolver estos diagnósticos.

Interpretar la tinción es más complicado si están implicadas bacterias corineformes con determinantes antigénicos comunes a Cms, como es el caso del patógeno de la alfalfa, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*, de bacterias pertenecientes al género *Arthrobacter* que se desarrollan en suelos, aguas y vegetales o de diversos microorganismos endofíticos presentes en tubérculos (DE BOER y COPEMAN, 1980).

En general, si al analizar los extractos se observan bacterias corineformes fluorescentes y su densidad es superior a 10^6 cel/ml de precipitado, suele tratarse de Cms; por el contrario, si su número es inferior a 10^3 cel/ml puede suponerse que el resultado es negativo. El porcentaje de estas bacterias corineformes en los extractos está relacionada con la microflora existente en los campos

de producción de patatas y así hay zonas de cultivo en que la mayor parte de las muestras presentan rutinariamente poblaciones superiores a 10^6 bact/ml. Muchos casos dudosos los hemos resuelto por repeticiones de la tinción IF con antisuero más diluido (1/600, 1/800, 1/1200), para poner de manifiesto los fallos en la fluorescencia que se producen antes sobre los contaminantes que en la cepa homóloga. La dilución del antisuero es crítica para diferenciar organismos emparentados.

En este trabajo, al realizar las tinciones de IF con antisuero policlonal y anticuerpo monoclonal sobre los extractos de patata se detectó Cms en las mismas muestras. El cálculo del número de células corineformes por ml de precipitado, no se estimó conveniente realizarlo al aplicar el antisuero monoclonal por haberse utilizado para esta tinción extractos conservados con glicerina y, en esas condiciones, normalmente las bacterias se fijan con mayor dificultad sobre los portaobjetos, por lo que durante los lavados se pierden células y otras quedan agrupadas haciendo difícil su conteo; el efecto de la glicerina puede incidir en la observación microscópica y aparecer las células con gránulos o condensaciones más fluorescentes en sus extremos. Aunque existe igualdad en los resultados globales, la lectura e interpretación de las preparaciones se vio facilitada extraordinariamente al utilizar el anticuerpo monoclonal. En los Cuadros 3, 4 y 5 que reflejan la especificidad de ambos antisueños, se aprecia una ventaja del anticuerpo monoclonal ante los Cmi, *Arthrobacter* y saprofitos. Si bien estos organismos que presentan reacciones cruzadas con Cms no implican generalmente problemas para el diagnóstico cuando están en cultivo puro, al aparecer esporádicamente inducir a confusión y siempre distraen la atención del observador.

En el testaje de los saprofitos aislados de patatas con antisuero policlonal, aunque casi todos eran fácilmente diferenciables de Cms, ya fuese por su forma, tamaño o intensidad y distribución de la fluorescencia, encontramos un aislado, S-26, indistinguible de Cms. Su tinción con anticuerpo monoclo-

nal visualizó bacterias corineformes pero con paredes marrones. En efecto, no se trataba de Cms, sino de una bacteria Gram negativo cuya reacción de hipersensibilidad en planta de tabaco (NOVAL, 1991) era también negativa.

Como conclusión de esta fase, resaltamos la gran ayuda que puede suponer la utilización de un anticuerpo monoclonal para resolver diagnósticos que presenten dificultades con un antisuero policlonal.

También la hibridación molecular con las sondas actualmente disponibles puede servir como ayuda al diagnóstico al ser factible su aplicación sobre los extractos de patata. Sin embargo conviene tener presentes dos limitaciones de la técnica: 1) la concentración de Cms debe ser igual o superior a 10^5 - 10^6 cel/ml y 2) algunos saprofitos podrían producir señales positivas si se encontrasen a una concentración muy elevada en los extractos de patatas.

En cuanto a los resultados de inoculación en berenjenas se destaca: a) el tiempo requerido para visualizar síntomas sobre los testigos positivos, b) la detección de un nuevo extracto contaminado y c) la no correlación entre la densidad del inóculo con el número de plantas sintomáticas aparecidas en los diferentes bloques a lo largo del bioensayo.

En nuestra opinión la ligera tardanza en manifestar síntomas todos los testigos positivos pudo ser debida a que el inóculo de Cms procedía directamente de conservación, por lo que sus células estaban recubiertas con glicerina. Si las inoculaciones se hubiesen hecho utilizando un cultivo en crecimiento (bien sobre medio agarizado o en caldo nutritivo), probablemente los síntomas se hubiesen observado cuatro o cinco días antes.

La localización de un nuevo extracto contaminado confirma al bioensayo de berenjenas como el método más sensible, entre los que hemos empleado, para la detección de Cms. Es indudable, como se puso de manifiesto en los ensayos de hibridación al dar el extracto E-53 PP la señal positiva más intensa de todas las obtenidas que la muestra M-53 estaba contaminada. Sin embargo, al eliminar de los análisis el tubérculo descompuesto, se obtuvo el extracto E-53 cuyo

resultado fue negativo en todos los ensayos incluidas las berenjenas. La interpretación que puede darse a los resultados obtenidos con el extracto E-53 P es que la concentración de Cms en el mismo era inferior a los límites de detección de la técnica de hibridación (10^5 - 10^6 bac/ml) y de la IF (10^3 bact/ml). En el bioensayo tan solo dos plantas manifestaron síntomas, y además muy tardamente, a lo largo de los 43 días. El hecho de detectar Cms en el extracto E-53 P y no encontrarlo sin embargo en el E-53, puede deberse a que la patata contaminada originó, en su contacto con las restantes de la muestra, la infección de algún otro tubérculo; esta infección pudo iniciarse en cualquier lugar de la patata distinto del talón y al seleccionar diversos tejidos vasculares para obtener el extracto E-53 P debió incluirse alguna zona afectada.

La aparente discrepancia entre las proporciones de inóculo en los extractos (con resultados concordantes en IF e hibridación molecular) y el porcentaje de berenjenas atacadas puede tener diversas explicaciones. En primer lugar para evaluar y equiparar los resultados hubiera sido preciso distribuir todo el extracto entre las 25 plantas. Esto, sin embargo, es prácticamente imposible de hacer cuando se utiliza, como lo fue en nuestro caso, un pequeño pincel mojado ligeramente en el extracto para hacer la inoculación; con 200 μ l de inóculo se puede pasar «una pincelada» por muchas berenjenas. Ello implica que sólo una parte del inóculo fue utilizado.

Además de ser factible un retraso, o incluso la inhibición de síntomas por la presencia de inóculo mixto (OLSON, 1976), se debe considerar sobre todo que la detección en IF o mediante hibridación no quiere decir que las células existentes sean viables. El periodo conservación de los inóculos, probablemente contribuyó también a una pérdida de viabilidad de las células.

Otros factores a considerar en la manifestación de síntomas, además de los mencionados, son la influencia de la luz y la temperatura, y como consecuencia, el lugar de ubicación de las plantas sobre la bancada.

Aunque el bioensayo de berenjenas es, hoy en día, el método más sensible para detectar Cms y el aislamiento del patógeno se consigue con relativa facilidad a partir de plantas inoculadas, existe cada vez mayor dificultad para encontrar exactamente el cv. Black Beauty, pues ha dejado de producirse. Nuevas investigaciones se precisan con urgencia para elegir otra planta (patata, tomate, alguna malahierba: *Solanum nigra*, *S. ulcamara*, *Hyoscyamus niger*, ...) que sustituya a la actual, y todo ello debido a que la detección errónea de Cms puede traer consigo unas implicaciones muy graves. Si una falsa detección se efectúa en una zona

donde existe Cms se puede originar un perjuicio directo al agricultor, y si esa falsa detección se efectúa en un país declarado exento de la enfermedad la repercusión puede incidir, al menos momentáneamente, en todo el comercio exterior e interior de la patata.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a D.^a Isabel Aliste y a D.^a M.^a Eugenia Sanz por su cooperación y ayuda inestimable en el desarrollo de este trabajo.

ABSTRACT

NOVAL C., S. LLAMAS, M. T. SEISDEDOS y R. MARQUINEZ (1993): Ensayo de laboratorio para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* en tubérculos de patata. *Bol. San. Veg. Plagas*, **19** (2): 237-247.

Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by indirect immunofluorescence (IF), molecular hybridization and eggplants test was studied on extracts from highly contaminated, not very contaminated and healthy potato tubers.

Immunofluorescence staining was carried out with a monoclonal antibody and polyclonal antiserum and its specificity was compared.

Key words: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Solanum tuberosum*, bacteria.

REFERENCIAS

- ANÓNIMO, 1987: Scheme for the detection and diagnosis of the ring rot bacterium, *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers, 21 págs. *Publicación EUR* **11.288**.
- APPEL, O., 1906: Neuere untersuchungen uber kartoffel and tomatener kraunfungen. *Jahresber verh angew. Bot.* **3**, 122-136.
- BISHOP, A. L. and SLACK, S. A., 1987: Effect of cultivar, inoculum dose, and strain of *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* on symptom development in potatoes. *Phytopathology*, **77**: 1085-1089.
- CALZOLARI, A.; BAZZI, C. and MAZZUCCHI, U., 1982: Cross reactions between *Corinebacterium sepedonicum* and *Arthrobacter polychromogenes* in immunofluorescence staining. *Potato Research*, **25**: 239-246.
- CLAYTON, M. K. and SLACK, S. A., 1988: Sample size determination in zero tolerance circumstances and the implications of stepwise sampling. Bacterial ring-rot as a special case. *Am. Potato J.*, **65**: 711-723.
- CMI (COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE), 1983: *Distribution Maps Plants Diseases*. 5th edition.
- CROWLEY, C. F. and DE BOER, S. H., 1982: Nonpathogenic bacteria associated with potato stems cross-react with *Corynebacterium sepedonicum* in Immunofluorescence. *American Potato Journal*, **59**: 1-8.
- DE BOER, S. H. and COPEMAN, R. J., 1980: Bacterial ring-rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure. *Am. Potato J.*, **57**: 457-465.
- DE BOER, S. H. and WIECZOREK, A., 1984: Production of monoclonal antibodies to *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology*, **74**: 1431-1434.
- JANSE, J. D. and VAN VAERENBERGH, J., 1987: The interpretation of the EC method for the detection of latent ring-rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *Bulletin OEPP* **17**, 1-10.
- LELLIOT, R. A. and SELLAR, P. W., 1976: The detection of latent ring-rot (*Corynebacterium sepedonicum*) (Spieck et Koth) (Skapt et Burkh) in potato stocks. *EPPO Bull.*, **6**: 101-106.
- LELLIOT, R. A.; BILLING, E. and HAYWARD, D. C., 1966: A determinative scheme for the fluorescent

- plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bact.*, **29**: 470-489.
- LLAMAS, S.; SEISDEDOS, M. T. y NOVAL, C., 1993: Diagnóstico de *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* mediante hibridación molecular con sondas de DNA no radioactivas. *Bol. San. Veg.* **19** (1):
- MANZER, F. E.; GUDMESTAD, N. C. and NELSON, G. A., 1987: Factors affecting infection, disease development and symptoms expression of bacterial ring-rot. *Am. Potato J.*, **64**: 671-675.
- NELSON, G. A., 1982: *Corynebacterium sepedonicum* in potato: Effect of inoculum concentration on ring-rot symptoms and latent infection. *Can. J. Plant Pathol.*, **4**: 129-133.
- NOVAL, C., 1991: Comprobación del poder patógeno. **In: Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, b y nematodos fitopatógenos**, págs. 137-148. MAPA.
- NOVAL, C.; FISAC, R.; FRESNO, J. y CASTRO, S., 1987: **In** *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. y Kothth) Skapt. y Burkh. agente productor de la Podredumbre anular de la patata. *Bol. San. Veg.* Fuera de serie, n.º 9. Pág. 41-44.
- OLSSON, K., 1976: Experience of ring-rot caused by *Corynebacterium sepedonicum* in Sweden. Particular detection of the disease in its latent form. *EPPO Bull.*, **6**: 209-219.
- SAMSON, R. and POUTIER, F., 1979: Comparaison de trois méthodes d'identification de *Corynebacterium sepedonicum* dans les tubercules de pomme de terre. *Potato Res.* **22**: 133-147.

(Aceptado para su publicación: 13 octubre 1992)