

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción Agrícola y Animal
Licenciatura en Agronomía

Informe de Servicio Social

Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.)

Prestador de servicio social:

Salvador Montoya Campos

Matricula: 2143024688

Asesor: Dr. Daniel Ruiz Juárez

No. Económico: 29691

Asesor Externo: M. en C. Mónica Gutiérrez Rojas

Cédula Profesional: 3792352

Lugar de realización:

Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario, Laboratorio de Bacterias.

Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Dirección General de Sanidad Vegetal

Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, Tecámac, 55740 México.

Fecha de inicio: 1º marzo de 2019, fecha de término: 1º de septiembre de 2019.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1 Generalidades del cultivo de tomate.....	3
3.1.2 Etapas fenológicas del cultivo.....	3
3.2 Generalidades del cultivo de chile.....	4
3.2.1 Fenología del cultivo de chile.....	4
3.3 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm).....	5
3.3.1 Taxonomía.....	5
3.3.2 Síntomas.....	5
3.4 Técnicas moleculares.....	6
3.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	6
3.4.2 PCR tiempo real.....	6
IV. OBJETIVOS.....	6
4.1 Objetivo general.....	6
4.2 Objetivos específicos.....	7
V. METODOLOGÍA.....	7
5.1 Sitio de estudio.....	7
5.2 Preparación del inóculo.....	7
5.3 Preparación del material vegetal.....	8
5.4 Pruebas de patogenicidad.....	8
5.5 Técnicas moleculares.....	8
5.5.1 Extracción de DNA total con el método CTAB 2%.....	9
5.5.2 Verificación de la calidad del DNA mediante espectrofotometría.....	9
5.5.3 PCR punto final.....	9
5.5.4 Verificación de la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa.....	10
5.5.5 PCR tiempo real.....	10
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
6.1 Extracción de DNA de semillas.....	11
6.2 Detección de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> por PCR punto final en semillas y plántulas.....	11

6.3 Detección de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> por PCR tiempo real en semillas y plántulas	14
VII. CONCLUSIONES.....	16
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	17

RESUMEN

El cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (*Cmm*) es una de las principales enfermedades de importancia económica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.) a nivel mundial. México ocupa la décima posición en la producción de estas hortalizas, no obstante, se ha visto afectada a causa de esta enfermedad. La bacteria *Cmm* puede ser identificada por métodos microbiológicos, bioquímicos y serológicos, sin embargo, estos métodos no han sido específicos como las pruebas moleculares. Por lo que el objetivo de ésta investigación consistió en estandarizar la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real para la identificación de *Cmm* en semillas de tomate y chile. Se reactivó la cepa pura de *C.michiganensis* subsp. *Michiganensis*, la cepa se ocupó para infectar artificialmente a las semillas, así mismo, las semillas infectadas se germinaron para adquirir síntomas en planta. Se realizaron pruebas de PCR utilizando primers específicos para *Cmm*, RZ_ptssk10 (sentido), RZ_ptssk11 (antisentido) y RZ_ptssk 12 (sonda). Se comprobó la presencia de *Cmm* por medio de la PCR tiempo real en el DNA de las semillas infectadas. La presencia de la bacteria en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.) representa un riesgo económico que se debe identificar en tiempo y forma para controlar y evitar la diseminación de la misma.

I. INTRODUCCIÓN

El tomate (*L. esculentum* L.) y chile (*C. annuum* L.) son de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial, con una producción mundial de 182´301,395 toneladas de jitomate (t) y de chile 36´092,631 (t) (FAOSTAT, 2018).

Entre los principales países productores de tomate se encuentra China, India, Turquía y Nigeria (20.9, 18.8, 6.6 y 5.8 % respectivamente). De la producción mundial, México ocupa la décima posición, con el 1.9% de superficie cosechada de esta hortaliza. En

este contexto, Sinaloa, Michoacán, San Luis Potosí, Baja California y Jalisco son los estados con mayor rendimiento en estos cultivos (27.4, 7.2, 7.2, 7.1 y 5.2 % respectivamente) (SIAP, 2018).

Sin embargo, estos cultivos se encuentran amenazados por enfermedades causadas por microorganismos (Ramírez, 2010), entre las que destaca el Cáncer del Tomate causado por la bacteria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* misma que se transmite por semilla (Ramírez, 2010), enfermedad que, si no se detecta y controla en tiempo y forma, puede devastar los cultivos entre los 20 o 40 días después del trasplante, con una incidencia del 26 a 65% (Chang, 1991). La rápida detección del patógeno en semillas es una alternativa para prevenir la diseminación del mismo (Borboa *et al.*, 2009). En la planta el síntoma principal es el marchitamiento y finalmente la muerte de la planta, lo que ocasiona pérdidas económicas para el productor (Gleason *et al.*, 1993; CABI, 2014). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ha causado pérdidas en cultivos de tomate que oscilan entre 20 y 100 t/ ha, con un valor de \$150,000 a \$500,000 pesos, tanto en campo como en invernadero (CESAVEG, 2011). Por lo que en esta investigación se propuso estandarizar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real para la identificación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate (*S. lycopersicum*) y chile (*C. annuum*).

II. JUSTIFICACIÓN

C. michiganensis subsp. *michiganensis* es una bacteria que se disemina por semillas infectadas en el episperma y endosperma (Tancos *et al.*, 2013). El diagnóstico de *Cmm* se realiza por métodos microbiológicos, serológicos y moleculares (EPPO, 2016). En los métodos microbiológicos es difícil identificar la bacteria, se aísla en medios de cultivo específicos y se analizan morfológicamente las colonias, estas pruebas conllevan tiempo y poca especificidad (EPPO, 2016). En los métodos serológicos se utilizan pruebas inmunoenzimáticas como la técnica ELISA, sin embargo, esta técnica no aporta la viabilidad total sobre el patógeno (De León *et al.*, 2011).

A diferencia de los métodos microbiológicos y serológicos, las pruebas moleculares se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnicas específicas y sensibles que se realizan de manera rápida. La Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR) tiempo real es un tipo de PCR que permite cuantificar una porción del ADN o ARN presente en la muestra, además tiene mayor sensibilidad y disminuye el riesgo de falsos positivos (De León *et al.*, 2011).

La identificación de *Cmm* debe ser inmediata por ser un patógeno que se transmite por semilla, es por ello que se deben utilizar métodos y tecnologías altamente específicas para lograr su detección oportuna, una estandarización de PCR tiempo real o cuantitativa consta de las características que se necesitan para identificar oportuna y rápidamente a *Cmm* y con ello evitar que se propague la enfermedad (De León *et al.*, 2011).

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Generalidades del cultivo de tomate

El tomate es originario de América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Pertenece a la familia *Solanaceae*. Su domesticación fue llevada a cabo en México. El nombre de jitomate procede del náhuatl (xictli, ombligo y tomatl tomate), que significa tomate de ombligo (Ramírez, 2010).

3.1.2 Etapas fenológicas del cultivo

La fenología del cultivo es parte de las etapas de desarrollo que lo conjuntan a lo largo de su proceso de crecimiento, dependiendo de la etapa fenológica de la planta, es la respuesta con el medio ambiente, con sus necesidades hídricas y la convivencia de las distintas plagas y enfermedades que le atacan (Escobar y Lee, 2009).

Inicial

La etapa se produce desde la germinación y emergencia de la plántula hasta la aparición del primer racimo floral, el primer racimo floral surge después de la formación de 5 a 10 hojas, cuando la planta tiene altura mayor a 40 cm (Escobar y Lee, 2009).

Vegetativa

En esta etapa la planta presenta más de 20 días a partir de la germinación y dura de 25 a 30 días antes de la floración. El crecimiento es simultáneo entre vegetativo y reproductivo con la aparición de nuevas hojas y racimos florales a partir de los cuales

se van formando progresivamente los frutos. Además, demanda mayor concentración de nutrientes para todos los tejidos nuevos (Escobar y Lee, 2009).

Reproductiva

Inicia durante la fructificación y dura entre 40 y 50 días, los frutos comienzan a desarrollarse hasta alcanzar el índice de cosecha. En el tiempo en el que se cosechan los frutos, la planta sigue desarrollando hojas y nuevos racimos florales hasta que naturalmente se llega a un estado donde la planta detiene su crecimiento, y solamente los frutos en desarrollo siguen su crecimiento (Escobar y Lee, 2009).

3.2 Generalidades del cultivo de chile

El género *Capsicum* incluye un promedio general de 25 especies, todas estas son originarias de América. El chile fue parte de la cultura alimentaria mesoamericana, siendo México su país de origen (Partida y Quezada, 2012).

3.2.1 Fenología del cultivo de chile

Germinación

El periodo de germinación en el cultivo de chile varía de 8 a 12 días, dependiendo de la temperatura en la que se encuentre, en esta etapa casi cualquier daño físico, biológico o químico que le pueda ocurrir al cultivo traerá consecuencias letales convirtiendo esta etapa en la que se presenta mayor mortalidad (Moreno *et al.*, 2011).

Vegetativa

Posterior al desarrollo de las hojas cotiledonales, inicia el crecimiento de hojas verdaderas, que son alternas y más pequeñas que las hojas de una planta adulta, en esta etapa se nota un crecimiento lento en la parte aérea, sin embargo, el sistema radicular sigue desarrollándose para obtener raíces secundarias (Moreno *et al.*, 2011).

Reproductiva

Inicia a partir de la floración donde empezarán a desarrollar los primeros frutos, los frutos de mayor tamaño se producen durante el primer ciclo de fructificación, aproximadamente entre los 80 y 100 días de crecimiento, los ciclos posteriores tienden a producir menos frutos o de menor calidad (Moreno *et al.*, 2011).

3.3 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

Cmm es una bacteria que causa la enfermedad llamada “Cancro del tomate” y tiene diversos hospederos, donde destacan los pimientos, quienes son severamente afectados por la bacteria (Borboa *et al.*, 2009).

Es un bacilo Gram positivo, sin flagelos, aeróbico, productor de cápsula, pero no esporas, negativo para las pruebas oxidasa y ureasa. Puede ser cultivado de 48-72 h en caldo nutritivo con extracto de levadura más agar forma colonias de 2-3 mm de diámetro, convexas, lisas, con borde entero, de color amarillo pálido a naranja, opaco y mucoides; con el tiempo la intensidad de la pigmentación de las colonias amarillas aumenta (Ramírez, 2010).

3.3.1 Taxonomía

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Familia: Microbacteriaceae

Género: *Clavibacter*

Especie: *michiganensis*

Subespecie: *michiganensis*

Nombres comunes: Cancro, marchitez u ojo de pájaro del tomate

3.3.2 Síntomas

En el follaje aparecen quemaduras en los márgenes de los folíolos, también se aprecia necrosis en el follaje, el síntoma generalmente se aprecia alrededor de la hoja y avanza hasta cubrir completamente la hoja y causar la muerte en el fruto, en éste, se presentan manchas oscuras con un halo blanco intenso que es conocida como “mancha de ojo de pájaro” (Ramírez, 2010).

En un corte longitudinal del tallo de una planta infectada, se observan manchas amarillas a rojizas, en medida que la enfermedad avanza, pueden desarrollarse lesiones cancerosas en peciolo y parte inferior del follaje (Ramírez, 2010).

3.4 Técnicas moleculares

3.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa, fue descrita por Kary Mullis en 1985, y desde entonces ha revolucionado en las ciencias biológicas en general. Es una de las técnicas más usadas por su gran especificidad y sencillez (López *et al.*, 2003), la PCR es una reacción enzimática en la cual un segmento de DNA de una región específica del genoma de la bacteria se amplifica de manera cíclica en una mezcla de reacción *in vitro* (Espinosa, 2007). Esto permite un aumento exponencial del segmento seleccionado de DNA, llegando a obtener millones de copias que por cantidad es posible visualizar aun cuando la secuencia que se busca se encuentre en concentraciones muy bajas (SENASICA, 2015, 2018).

3.4.2 PCR tiempo real

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia (Agindotan *et al.*, 2007). Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior (Agindotan *et al.*, 2007).

La PCR cuantitativa o tiempo real tiene tan alta especificidad gracias a las sondas fluorescentes que se ocupan, mismas que hibridan únicamente la secuencia del DNA blanco. Particularmente, la sonda Taqman® es un oligonucleótido con fluorocromos en los dos extremos que hibrida en regiones internas y específicas de los productos de PCR pertenecientes a *Cmm* (López, 2003).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estandarizar la prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, para la identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y chile (*Capsicum annuum*).

4.2 Objetivos específicos

- Identificar por métodos moleculares al agente causal del cáncer bacteriano en semilla y plántulas, utilizando los primers específicos para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Establecer un protocolo de diagnóstico confiable y rápido que permita identificar a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas y plántulas de tomate y chile.

V. METODOLOGÍA

5.1 Sitio de estudio

La parte experimental se realizó en la Dirección General de Sanidad Vegetal del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, en el Área de Diagnóstico Fitosanitario en el laboratorio de bacteriología.

5.2 Preparación del inóculo

Se reactivó una cepa bacteriana de *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis* en medio B de King, la siembra se realizó por estría cruzada, enseguida se realizaron pruebas de patogenicidad y tipificación molecular.

A partir de cepas puras se prepararon suspensiones bacterianas en tubos Eppendorf® de 2 ml con agua destilada estéril y en condiciones asépticas, a distintas concentraciones (1×10^2 UFC/mL, 1×10^5 UFC/mL, 1×10^6 y 1×10^8 UFC/mL) (Madigan *et al.*, 2006).

De un total de 1037 semillas de chile y 708 semillas de tomate proporcionadas por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, se tomó el 10% del total de cada una de las semillas.

Las semillas de chile y tomate se distribuyeron homogéneamente en cuatro cajas Petri. A cada una de las cajas Petri se les agregó 2.5 ml de la suspensión bacteriana y se incubaron por 5 y 24 horas a 28°C para observar si las horas de incubación intervenían en la infección (Madigan *et al.*, 2006) (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de la suspensión bacteriana en semillas de chile y tomate.

Concentración	Cajas Petri		Horas de incubación/Temperatura
	Semillas de chile	Semillas de tomate	
1 x 10 ² UFC/mL	C-1	C-1	24 horas/ 28°C
1 x 10 ⁵ UFC/mL	C-2	C-2	24 horas/ 28°C
1 x 10 ⁶ UFC/mL	C-3	C-3	5 horas/ 28°C
1 x 10 ⁸ UFC/mL	C-4	C-4	5 horas/ 28°C

C. Caja

5.3 Preparación del material vegetal

Las semillas de Tomate y chile, fueron infectadas con las diferentes suspensiones bacterianas, estas se dividieron en dos, una parte se ocupó para realizar las pruebas de PCR y a las semillas restantes se les dieron las condiciones para germinar y observar si las plantas expresaban los síntomas típicos durante el proceso de crecimiento. Para confirmar la presencia de la bacteria, se tomaron muestras de las plantas y se realizó PCR.

5.4 Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron contenedores con sustrato inerte a base de peat-moss y se colocaron tres semillas por contenedor. A cada combinación se le realizó una repetición, obteniendo un total de 16 contenedores, ocho con semillas de chile y ocho con semillas de tomate.

La emergencia se observó entre los 5 y 8 días después de haberse sembrado, las evaluaciones se realizaron a los 15 días después del establecimiento, sin embargo, las plántulas no se desarrollaron como se esperaba, obteniendo plántulas de aproximadamente 7 centímetros de largo con pequeñas hojas, por esta razón, no se apreciaron los síntomas característicos, para determinar la presencia de este material vegetal se tomaron muestras para realizar PCR en tiempo real y punto final.

5.5 Técnicas moleculares

Con base en el Protocolo de Diagnostico Fitosanitario del Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal de la SADER se realizaron los análisis moleculares para el diagnóstico e identificación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (DGSV, 2019).

5.5.1 Extracción de DNA total con el método CTAB 2%

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó con el método CTAB al 2%, se utilizaron 300 y 500 mg de semilla y plántula respectivamente, las muestras se maceraron con nitrógeno líquido en morteros congelados a -80 °C hasta obtener una consistencia de polvo. El polvo se colocó en tubos de 2 ml y se agregó 1.5 ml de CTAB 2% y 100 µl de SDS 10%, posteriormente en baño María se incubaron a 80°C, a continuación, se centrifugaron 15 minutos a 13000 RPM. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de 2 ml y se agregó fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para centrifugar a 13000 RPM, durante 15 minutos. A partir del sobrenadante se transfirió 600 µl a un tubo estéril de 1.5 ml y se adicionó 300 µl de etanol:metanol:ácido acético glacial y se centrifugó a 13000 RPM por 10 minutos. Enseguida, el sobrenadante se decantó sin tirar la pastilla, la pastilla se lavó con 500 µl de etanol:agua metanol:acetato de sodio y se centrifugó a 13000 RPM durante 5 minutos. Nuevamente, el sobrenadante se decantó sin perder la pastilla, ésta se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 13000 RPM durante 5 minutos. Finalmente, la pastilla se secó en una centrifuga por 20 minutos a 30° C y se re suspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas.

5.5.2 Verificación de la calidad del DNA mediante espectrofotometría

La calidad y cantidad de Ácidos Nucleicos extraídos se analizó con un espectrofotómetro de luz, Thermo Scientific®. Se colocaron 2 µL de DNA extraído de cada muestra y se realizaron diluciones correspondientes para llevar la concentración del DNA de 20-30 ng/µL verificando que la calidad del DNA se encuentre entre 1.7 y 2.0 de absorbancia.

5.5.3 PCR punto final

De acuerdo con las especificaciones de Dreier *et al.* (1995) se utilizaron los iniciadores CMM-5 y CMM-6. Se realizaron las preparaciones de la mezcla de reactivos (mix) de acuerdo a la Tabla 2, se agregaron 20 µL de mix a tubos estériles de 0.2 mL y posteriormente se agregaron 5 µL de DNA de cada muestra, así mismo, los controles positivos (DNA bacteria) y negativos (material vegetal sano).

Tabla 2. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR punto final

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
Mezcla de dNTP's	10 mM	200 μM	0.5
Primer F	10 μM (10 pmol)	0.4 μM	1
Primer R	10 μM (10 pmol)	0.4 μM	1
Taq DNA polimerasa	5 U/ μL	0.06 U/ μL	0.3
DNA	20 ng/ μL	100 ng	5
Agua grado PCR	-----	-----	13.95
		Volumen final	25

5.5.4 Verificación de la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa se preparó al 1.5% y cada pozo se cargó con 5 μL de DNA mezclado con 3 μL de buffer de corrida (naranja G 6X) previamente teñido con el colorante GelRed™. La electroforesis se corrió a 95 volts durante 63 minutos y el gel se observó bajo luz UV.

5.5.5 PCR tiempo real

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional, por lo que se aplicó el mismo principio, con la diferencia de usar una sonda, la cual cuantificará la fluorescencia de las moléculas en tiempo real. Donde se emplearon los primers o iniciadores propuestos por Oosterhof & Berendsen (2011) (Tabla 3).

Tabla 3. Primers RZ_ptssk 10/ RZ_ptssk 11 para PCR tiempo real propuestos por Oosterhof & Berendsen (2011)

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	RZ_ptssk 10	5'-GGGGCCGAAGGTGCTGGTG-3'	
Antisentido	RZ_ptssk 11	5'-CGTCGCCCGCCCGCTG-3'	
Sonda	RZ_ptssk 12	6-FAM-TGGTCGTCCTCGGCG-IBFQ	sonda Taqman

Para la preparación de la mezcla Mix, en la Tabla 4 se enlistan los reactivos

Tabla 4. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tiempo real

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer de PCR	10X	1X	2.2
MgCl ₂	50 mM	4 mM	1.76
Mezcla de dNTP's	10 mM	0.30 μM	0.6
Iniciador F	10 pmol/ μL	0.30 μM	0.6
Iniciador R	10 pmol/ μL	0.30 μM	0.6
Taq DNA polimerasa	5 U/ μL	0.09 U/ μL	0.4
Sonda	10 pmol/ μL	0.09 μM	0.2
DNA	20 ng/ μL	80 ng/ μL	4
Agua grado PCR			11.64
		Volumen final	22

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción de DNA de semillas

El DNA tiene una absorbancia máxima de 260 nm, las proteínas, son las impurezas más comunes en el DNA y tienen una absorbancia de 280 nm. Éstas longitudes de onda son utilizadas para verificar la pureza del DNA, si la relación 260/280 está entre 1.7 y 2.0, en este sentido la muestra de DNA se considera pura (DGSV, 2019). El DNA extraído de las semillas cumplió con los parámetros de pureza establecidos, con un promedio de 1.87 nm.

6.2 Detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* por PCR punto final en semillas y plántulas

La presencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* fue identificada en las semillas mediante la PCR convencional. La presenciade *Cmm* se detectó e identificó por la amplificación de fragmentos de 614 pares de bases, utilizando los primers CMM-5 y CMM-6 (Dreier *et al.*, 1995).

En la Tabla 5 y en las figuras 1 y 2 se observan los resultados obtenidos en el gel de electroforesis. Se obtuvieron diez muestras positivas; seis muestras positivas de las combinaciones de semillas de chile, las cuales fueron las cuatro combinaciones iniciales más dos repeticiones y cuatro muestras positivas de las combinaciones iniciales de las semillas de tomate.

Tabla 5. Resultados de la PCR punto final en las semillas

Semillas de chile	Semillas de tomate
(+) Chile combinación 1×10^2 incubado 24h.	(+) tomate combinación 1×10^2 incubado 24h
(+) chile combinación 1×10^5 incubada 24h	(+) tomate combinación 1×10^5 incubado 24h
(+) chile combinación 1×10^6 incubada 5h	(+) tomate combinación 10^6 incubado 5h
(+) chile combinación 1×10^8 incubada 5h	(+) tomate combinación 10^8 incubado 8h
(+) chile combinación 1×10^2 incubada 24 h repetición 1	
(+) chile combinación 1×10^8 incubada 5h repetición	
(+) Positivas	

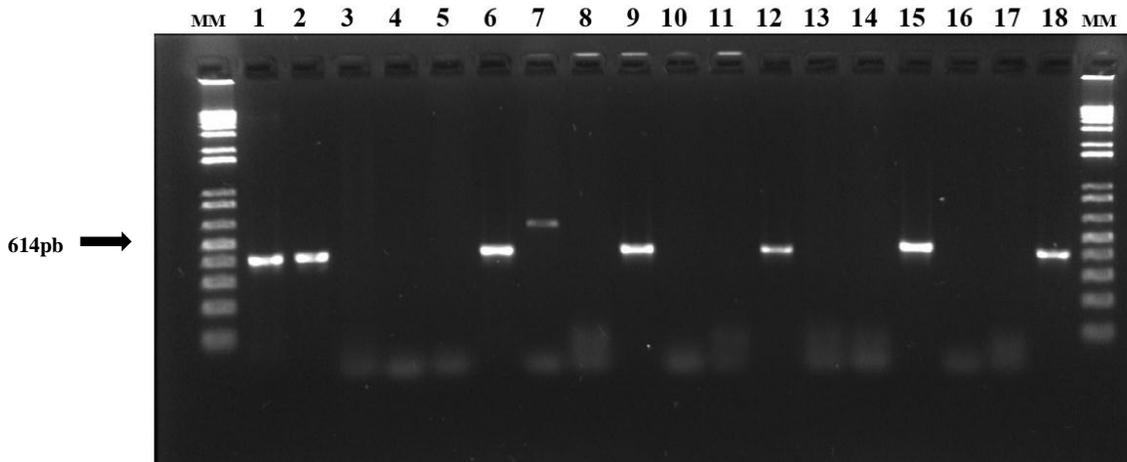


Figura 1. Gel 1. Electroforesis de la PCR convencional realizada para la identificación de *Cmm* en semillas de tomate y chile.

MM: marcador molecular 1 kb plus DNA ladder, columnas 1 y 2: controles positivos de *Cmm*, columnas 3-5: controles negativos (planta sana, mix, agua pcr), columna 6: (+) tomate combinación 1×10^2 incubado 24h, columna 9: (+) tomate combinación 1×10^5 incubado 24h, columna 12: (+) tomate combinación 10^6 incubado 5h, columna 15: (+) tomate combinación 10^8 incubado 8h, columna 18: chile combinación 1×10^2 incubado 24h.

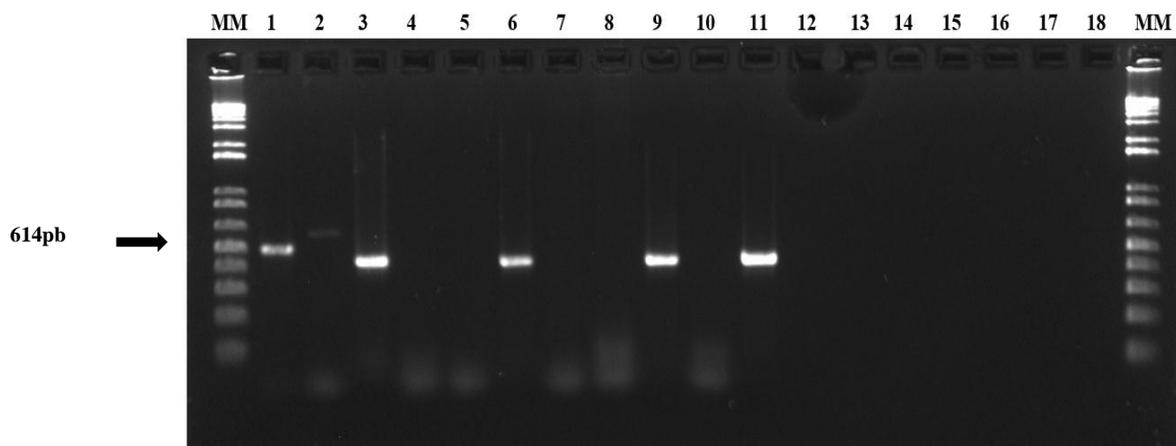


Figura 2. Gel 2. Electroforesis de la PCR convencional realizada para la identificación de *Cmm* en semillas de tomate y chile.
 MM: marcador molecular 1 kb plus DNA ladder.
 Columna 1: (+) chile combinación 1×10^2 incubada 24h repetición 1, columna 3: (+) chile combinación 1×10^5 incubada 24h, columna 6: (+) chile combinación 1×10^6 incubada 5h, columna 9: (+) chile combinación 1×10^8

La infección artificial de *Cmm* en las semillas pudo deberse, a que las semillas se conservaron en las cajas Petri con la suspensión bacteriana a 28°C con una humedad favorable para que la bacteria lograra la infección oportuna (Maselli y Guevara, 2002).

Para el caso de las plántulas de tomate y chile, al tener poco material vegetal para la extracción de DNA, se ocupó la raíz, tallo y hojas de las plantas.

A partir de la extracción de DNA y la cuantificación de ácidos nucleicos, se obtuvo DNA de calidad basándose en los parámetros antes establecidos. A este DNA se le realizó la PCR punto final.

En el producto de la electroforesis de la PCR punto final, no se observó amplificación en las muestras, sin embargo, el control positivo, fue el único que amplificó, considerándolo como un control válido (Figura 3).

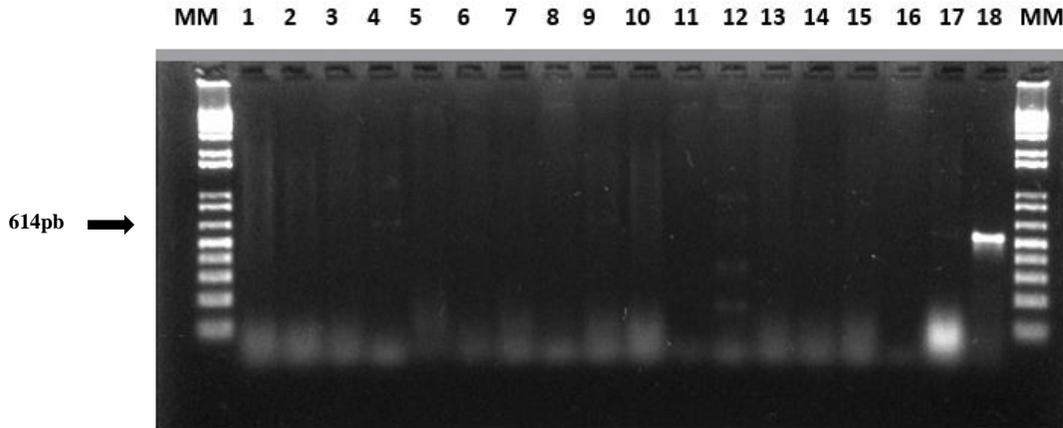


Figura 3. Electroforesis de la PCR convencional realizada para la identificación de *Cmm* en plántulas de tomate y chile.
 MM: marcador molecular 1kb plus DNA ladder, pozos del 1-16 DNA plántulas de tomate y chile, pozo 17; control negativo planta sana, pozo 18 control positivo valido.

Las plántulas no presentaron síntomas ocasionados por la infección de *Cmm*. Asimismo, Ramírez (2010) menciona que puede deberse a que la bacteria no encuentra las condiciones óptimas para infectar la semilla, o bien, no puede sobrevivir para infectar la plántula, debido a diferentes factores como nutrimentos específicos, pH, luminosidad, temperatura y humedad óptima dentro de la planta.

De acuerdo a Navarrete *et al.* (2016), algunas de las bacterias son transmitidas por semilla cuando están sobre o dentro de ésta, penetran en sus tejidos y permanecen en estado de reposo. El mismo autor menciona que las distintas especies de bacterias fitopatógenas que infectan a las semillas, darán como resultado una nueva generación de plantas enfermas, como es el caso de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, misma que infesta a la semilla a nivel superficial o está mezclada con ella sin que esto signifique que las semillas transmitan la enfermedad a la siguiente generación de plantas, no obstante las condiciones ambientales pueden favorecer su desarrollo en las áreas de siembra.

6.3 Detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* por PCR tiempo real en semillas y plántulas

La PCR tiempo real cuenta con curvas de amplificación en la fase inicial, exponencial y final.

La fase inicial donde no se puede medir la acumulación del producto de PCR debido a que hay pocos cambios en la señal de fluorescencia, lo que define la línea basal, la fase exponencial, donde la fluorescencia cambia a medida que se forman más productos y la fase de meseta, en donde no se distinguen cambios en la fluorescencia a pesar de que se siguen acumulando productos (Agindotan *et al.*, 2007).

Para que un resultado se considere negativo, las muestras deberán tener un valor de FAM Cq= 0.00 o mayor de 35.00, para considerar positiva una muestra se deberán obtener valores de FAM Cq= menores de 35.00. Así mismo los resultados se consideran validos solamente cuando el control positivo y las muestras positivas amplifiquen con los primers RZ_ptssk 10/ RZ_ptssk 11 específicos para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y los controles negativos y muestras negativas no generen curvas de amplificación con los primers valorados (DGSV, 2019).

En la PCR tiempo real se detectó la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas, utilizando los primers RZ_ptssk 10/ RZ_ptssk 11 descritos anteriormente.

En la Figura 4 se observan los resultados en curvas exponenciales de la PCR de tiempo real. Las flechas color naranja señala a los controles positivos de *Cmm*, con las flechas azules a todas las muestras de semillas positivas que se obtuvieron, con la flecha verde los controles negativos y las muestras de semillas negativas a *Cmm*. Los resultados de las muestras de semillas analizadas por PCR punto final, coincidieron tanto las que amplificaron indicando la presencia de *Cmm* así como las negativas.

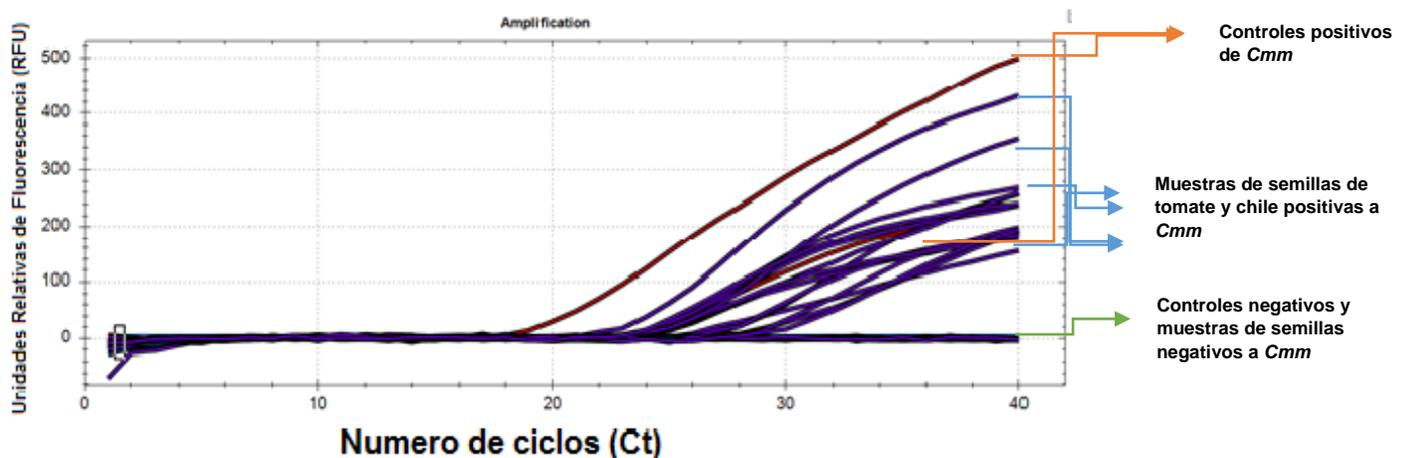


Figura 4. Curvas de amplificación de PCR tiempo real, para la detección de *Cmm* en semillas de tomate y chile

Para el caso de la PCR tiempo real en las plántulas, no se obtuvo ningun resultado positivo como sucedió en la PCR convencional.

En la Figura 5 se observan los resultados de las curvas, donde se indica con la flecha color naranja la amplificación de los controles positivos de *Cmm* y con la flecha verde a los controles negativos de *Cmm* y las muestras de plantas las cuales empezaron a generar curvas pequeñas en los ciclos 35-40, mismas que se consideraron como negativas.

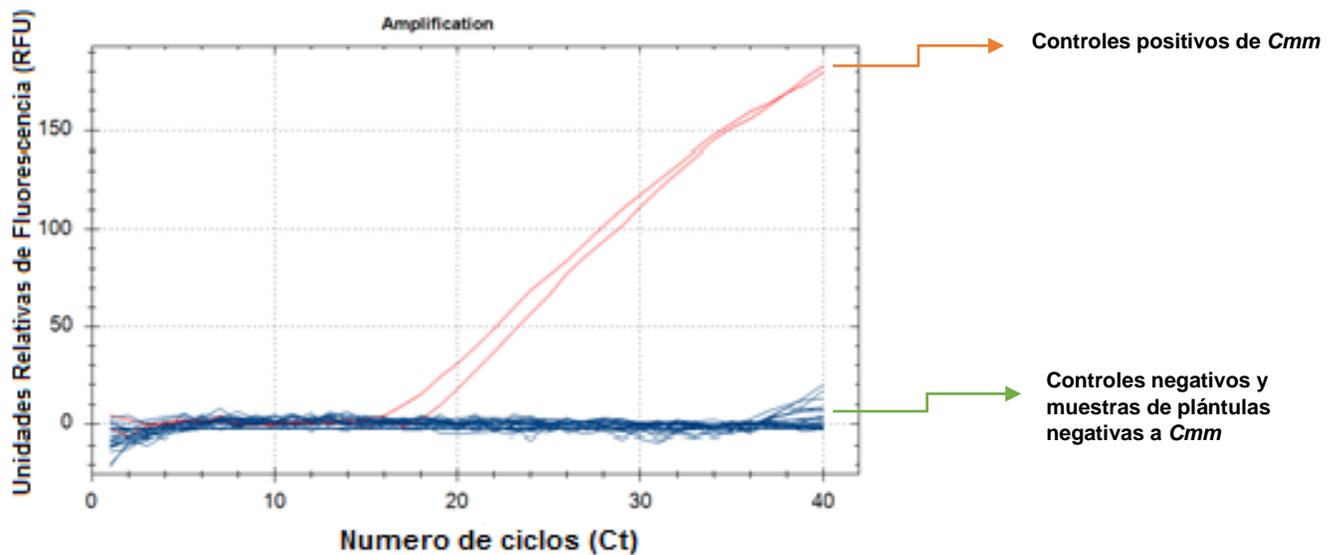


Figura 5. Curvas de amplificación de PCR tiempo real, para la detección de *Cmm* en plántulas de tomate y chile.

VII. CONCLUSIONES

Los primers específicos utilizados para la identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* se consideraron válidos, ya que en las pruebas amplificaron sin error.

Se logró identificar la presencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en las semillas de chile y tomate. Sin embargo, en las plántulas los resultados fueron negativos.

El protocolo que se estableció cuenta con una metodología para alcanzar resultados esperados en la identificación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agindotan, B. O., Shiel, P. J. and Berger, P. H. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan realtime RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 142:1-9.
- Borboa, J., Rueda, P. E. O., Félix, E. A., Ponce, J. F., Cruz, M., Juárez, O. G. y García, A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *FITOTEC.* 32(4):319-326.
- Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). 2014. Datasheet: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bacterial canker of tomato). En: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/15338> consultado el 18 mayo 2019.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG). 2011. Manejo Fitosanitario de Jitomate. En: <http://publico.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=30784&dUrl=84062&objeto=Documento&IdObjetoBase=30784&down=true> Fecha de consulta 26 de mayo de 2019.
- Chang, R. J. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato plants. *Phytopathology. American Phytopathological Society* 1276-1277 p.
- De León, L., Silverio, F., López, M. M. and Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant disease* 95(11):1328-1338.
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 2019. Protocolo de Diagnóstico: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* corrig. (Smith 1910) Davis *et al.* 1998, comb. nov. (Cancro del tomate). SENASICA-SADER 1-29 p.
- Dreier, J., Bempohl, A. y Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85:462-468.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2016. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bulletin OEPP/EPPO.* 202-225.

- Escobar, H. y Lee, R. 2009. Manual de producción de tomate bajo invernadero. Bogotá, Colombia. 180 p. En: pdfmanual_produccion_de_tomate_-_pag.-_web-11-15.pdf. Fecha de consulta 04 mayo 2019.
- Espinosa, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *in*: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). Ciudad de México 517-526 p.
- Food Agricultural Organization of the United Nations (FAOSTAT). 2018. En: <http://faostat.fao.org/> Fecha de consulta: 15 de mayo de 2019.
- Gleason, M. L., Braun, E.J., Carlton W.M. and Peterson, R. H. 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Journal Phytopathology* 81:1519-1523.
- López, M. M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M. T., Llop, P., Penyalver R. and Cambra M. 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. *International Microbiology* 6:233-243.
- Maselli, A. y Guevara, Y. 2002. Detección y Transmisión de *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* a través de Semillas de Girasol. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20(1): 114-117.
- Madigan, T. Michael. D, Clark. J, Martinko y P, Dunlap. 2006. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson. Pp 1269.
- Moreno, P. E., Mora, A. y Sánchez, F. 2011. Fenología y rendimiento de híbridos de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L) cultivados en hidroponía. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 17(2):5-18.
- Navarrete, M. R. S., Aranda., M, Rodríguez, S., Moya, H. y Georgina, G. 2016. Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. *Revista mexicana de fitopatología*. 32(2):75-88.
- Oosterhof J & Berendsen S. 2011. The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Abstr.). *Phytopathology* 101, S133.
- Partida, S. A. y Quezada, S. M. 2012. De los nombres del chile y sus variedades principales en tierras nayaritas. *Revista Fuente*. 10(4):50-54.

- Ramírez, V. J., 2010. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. Segunda ed. Culiacan, Sinaloa, Once Rios Editores.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) 2015. *Prácticas del laboratorio de biología molecular*. Unidad de Promoción y Vinculación-SENASICA. 94 p.
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* corrig. (Smith 1910) Davis et al. 1984, comb. nov. (Cancro del tomate) Tecámac, México: Autor.
- Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera. (SIAP). 2018. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. México. En: <http://www.siap.gob.mx/>. Fecha de consulta: 15 de mayo de 2019.
- Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis, S. S. and Smart, C. D. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and Environmental Microbiology* 79:6948-6957.