

RECOBRADO DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TABACI* A PARTIR DE SEMILLAS DE TABACO INFECTADAS

Marusia Stefanova Nalimova,¹ Geraldo H. N. Oliveira² y Fernanda C. Viana²

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, mstefanova@inisav.cu

² Centro de Investigaciones y Desarrollo de Souza Cruz, Río de Janeiro, Brasil

RESUMEN

Las semillas de tabaco constituyen una vía importante para la diseminación de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Se ensayó un procedimiento para el recobrado de la bacteria a partir de semillas inoculadas, que consistió en su extracción en buffer PBS, seguido de la centrifugación del sobrenadante, siembra en el medio de cultivo King B e inoculación del líquido recobrado por infiltración en hojas de tabaco. Para estudiar la sensibilidad del método se confeccionaron muestras de trabajo constituidas por diferentes cantidades de semillas inoculadas y sanas para complementar a un gramo. A partir de la muestra de semillas inoculadas solamente se recobró la bacteria con un promedio de 196,6 colonias por placa (10^7 ufc/mL). En los tratamientos que contenían semillas infectadas desde 0,5 hasta 0,1 g, se detectaron niveles altos del patógeno, en el rango de 10^6 - 10^5 ufc/mL. En las hojas de tabaco la concentración bacteriana de 10^7 ufc/mL provocó una necrosis circundada de halo clorótico a las 24 h, las concentraciones en el rango de 10^4 ufc/mL dieron lugar a clorosis y expansión de la infección a los tres o cuatro días. Las lesiones correspondientes a las poblaciones inferiores (10^3 - 10^1) aparecieron entre 10 y 15 días en forma de pequeñas manchas húmedas y clorosis ligera. Fue posible detectar la presencia de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* en las semillas, por siembra en medio de cultivo, en concentración de hasta 10^3 ufc/mL y con la infiltración de las hojas de tabaco, en diluciones inferiores (10^{-2} - 10^{-1}) no fue posible aislar colonias de la bacteria.

Palabras claves: semillas, tabaco, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

ABSTRACT

Tobacco seeds are an important way for disseminating *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. A procedure for recovering the bacteria from inoculated seeds was tried, which consisted in the extraction of bacteria in PBS, continued with centrifuging the supernatant, sowing in a King B medium and later the inoculation of recovered liquid by infiltration in tobacco leaves. To determine the method sensitivity, work samples were formed with different amounts of inoculated and healthy seeds to complement one gram. Only an average of 196.6 bacteria colonies/dish (10^7 cfu/mL) was recovered from the sample of inoculated seeds. High levels of the pathogen, within the range of 10^6 to 10^5 cfu/mL were detected in treatments contained infected seeds from 0.5 to 0.1 g. Bacterial concentration of 10^7 cfu/mL caused a necrosis surrounded by a chlorotic halo on tobacco leaves over a period of 24 hours, concentrations in the range of 10^4 cfu/mL produced chlorosis and infection expansion from 3-4 days. Injuries corresponding to lower populations (10^3 - 10^1) appeared between 10-15 days in the form of small humid spots and light chlorosis. It was possible to detect the presence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in the seeds, by sowing in the culture medium with concentrations up to 10^3 cfu/mL and with infiltration of tobacco leaves, it was not possible to isolate colonies of the bacteria in lower dilutions (10^{-2} - 10^{-1}).

Key words: seeds, tobacco, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad fuego salvaje, causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, afecta seriamente el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en el semillero y la plantación. El síntoma inicial consiste en pequeñas manchas en forma de puntos, de aspecto húmedo, circundadas por una región de 2 a 3 mm de diámetro, de tejido tenue verde amarillo; más tarde el centro de las lesiones se torna necrótico y el halo se hace prominente y más ancho [Wolf y Foster, 1917; 1918; Braun, 1955; Wannamaker y Rufty, 1989]. Su extensión rápida en los semilleros de Carolina del Norte y en otros estados productores de tabaco a partir de 1917 se re-

lacionó con las semillas [Wolf y Foster, 1918], hecho demostrado más tarde con los experimentos de Johnson y Murwing (1925) y Wolf (1957).

La bacteria se ha identificado en la testa y el endospermo de la semillas [Gao y Gao, 1997], y la contaminación se produce a través de las cápsulas afectadas. Se estima que el patógeno puede permanecer en ellas por un período de dos años [Agrios, 1997]. En la corola, el cáliz y las cápsulas de la semilla, las lesiones se manifiestan como pequeños puntos irregulares necróticos o como manchas acuosas que después adquieren un color

parduzco [Lucas, 1975]. Esta importante vía de diseminación ha llevado la enfermedad en la mayoría de los países que cultivan el tabaco [Shoemaker, 1990]. Actualmente continúa como la causa de graves epidemias en el cultivo.

La sanidad de las semillas de tabaco reviste una gran importancia para el intercambio internacional entre los países productores; sin embargo, se carece de ensayos biológicos para la detección de bacterias, hongos y virus con sensibilidad conocida [Coresta, 2005]. El propósito del presente trabajo es comunicar los resultados con un procedimiento para recobrar *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*P. tabaci*) a partir de semillas de tabaco y la evaluación de su sensibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para obtener semillas inoculadas se tomaron 10 g de semillas de tabaco de la variedad K 326. Se preparó una suspensión concentrada –turbia a simple vista, por encima de 10^9 ufc/mL– a partir de la cepa 5886 de *P. syringae* pv. *tabaci* de 48 h de crecimiento. Las semillas se sumergieron en la suspensión durante dos horas y posteriormente se secaron a temperatura ambiente durante la noche.

Para comprobar la contaminación se tomaron tres muestras de 1 g de semillas que se depositaron por separado en erlenmeyers de 100 mL, y se les agregó 50 mL de buffer PBS estéril (8,0 g NaCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ para 1L H_2O , pH 7,4). Los recipientes se colocaron en una zaranda a 140 rpm por tres horas a 27°C. Posteriormente el líquido se decantó y centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, a 4°C. El pellet se resuspendió en 2 mL del mismo buffer. A partir del tubo original se realizaron cinco diluciones decimales. De las diluciones y del tubo original se efectuaron siembras en medio de cultivo, para lo que se utilizaron placas con agar KB [King *et al.*, 1954] y agar nutriente (AN), a razón de tres réplicas por medio de cultivo, por cada dilución. La siembra se realizó por espátula con 0,1 mL en cada caso, y las placas se incubaron a 27°C. El conteo de las colonias se hizo a las 72 h. El procedimiento se realizó paralelamente con semillas de tabaco de la misma variedad sin inocular.

Para estudiar la sensibilidad se confeccionaron muestras de trabajo que contenían diferentes cantidades de semillas inoculadas y sanas para complementar 1 g de semillas en total (Tabla 1).

Tabla 1. Peso de las semillas contaminadas y sanas en las muestras de trabajo

Contaminadas (g)	Sanas (g)	Total (g)
0,5	0,5	1
0,4	0,6	1
0,3	0,7	1
0,2	0,8	1
0,1	0,9	1
0,05	0,95	1
0,04	0,96	1
0,03	0,97	1
0,02	0,98	1

Para el análisis de estas muestras se utilizó el procedimiento anteriormente descrito. Del tubo original se realizaron diluciones decimales que disminuían según se reducía el peso de las semillas contaminadas en la muestra de trabajo. La incubación de las placas y el conteo de las colonias se efectuaron a las condiciones del experimento anterior. Se calculó la cantidad de bacteria recobrada por unidad de volumen (ufc/mL) mediante la fórmula:

$$\text{ufc/mL} = \text{media del número de colonias} \times \text{dilución} \times 10$$

El método de recobrado mediante aislamiento se complementó con la prueba de patogenicidad en hojas de tabaco. El sobrante de las suspensiones se infiltró mediante jeringuillas hipodérmicas en hojas de tabaco de la variedad CSC 300, susceptible a la bacteria. Las plantas se mantuvieron en la casa de vegetación, bajo condiciones de humedad alta, y se observaron diariamente para detectar la aparición de los síntomas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la muestra de trabajo compuesta de 1 g de semillas inoculadas se recobró prácticamente un cultivo puro de *P. tabaci* con un promedio de 196,6 colonias por placa, para una concentración de la bacteria de $1,9 \times 10^7$ ufc/mL. Las colonias contaminantes fueron escasas (Tabla 2). En los tratamientos que contenían semillas infectadas desde 0,5 hasta 0,1 g, se detectaron niveles altos del patógeno en el rango de 10^6 - 10^5 ufc/mL.

Con la reducción paulatina de las semillas contaminadas en las muestras de trabajo disminuyeron de igual mane-

ra las colonias del patógeno a niveles de 10^4 - 10^3 ufc/mL. Aunque los contaminantes mostraron un incremento en la población, no resultaron obstáculos para la detección en las placas de las colonias de *P. tabaci*, cuya morfología y la producción de pigmento característico en el medio KB, bajo luz UV (370 nm), facilitaron la identificación la bacteria (Fig. 1). En las dos muestras de semillas, procedentes de plantas infectadas en la fase de floración, se reveló la presencia de la bacteria a niveles de 10^3 - 10^4 ufc/mL (Tabla 2).

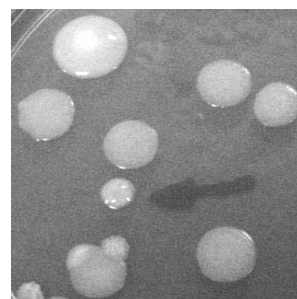


Figura 1: Colonia de *P. tabaci* entre colonias de bacterias contaminantes.

Tabla 2. Recobrado de *P. tabaci* de semillas de tabaco contaminadas

Tratamientos (total 1g)	Dilución	Colonias de <i>P. tabaci</i> (promedio)	UFC/mL	Colonias contaminantes (promedio)	UFC/mL
1g SI	10^{-4}	196,6	$1,9 \times 10^7$	2,6	$2,6 \times 10^5$
0,5g SI + 0,5g SS	10^{-4}	79,6	$7,9 \times 10^6$	11,6	$1,1 \times 10^6$
0,4g SI + 0,6g SS	10^{-4}	32,6	$3,3 \times 10^6$	12,3	$1,2 \times 10^6$
0,3g SI + 0,7g SS	10^{-4}	32,3	$3,2 \times 10^6$	11,3	$1,1 \times 10^6$
0,2g SI + 0,8g SS	10^{-3}	56,6	$5,6 \times 10^5$	14,0	$1,4 \times 10^5$
0,1g SI + 0,9g SS	10^{-3}	29,6	$2,9 \times 10^5$	35,6	$3,6 \times 10^5$
0,05g SI + 0,95g SS	10^{-3}	2,0	$2,0 \times 10^4$	30,0	$3,0 \times 10^5$
0,04g SI + 0,96g SS	10^{-3}	0,7	$0,7 \times 10^4$	32,7	$3,2 \times 10^5$
0,03g SI + 0,97g SS	10^{-3}	2,0	$2,0 \times 10^4$	33,0	$3,3 \times 10^5$
0,02g SI + 0,98g SS	10^{-3}	0,7	$0,7 \times 10^4$	35,3	$3,5 \times 10^5$
16066*	10^{-3}	1,0	$1,0 \times 10^4$	63,3	$6,3 \times 10^5$
16067*	10^{-2}	1,6	$1,6 \times 10^3$	No contables	

SI: Semillas infectadas.

* Muestras de semillas procedentes de plantas de tabaco.

SS: Semillas sanas.

Las plantas de tabaco inoculadas por infiltración respondieron positivamente y mostraron síntomas de la enfermedad en el transcurso de 15 días, acorde con el nivel de concentración de la bacteria en el inóculo (Tabla 3). La población bacteriana de 10^7 ufc/mL provocó una necrosis fuerte circundada de halo clorótico a las 24 h. La misma muestra de trabajo a la dilución de 10^{-5} causó

necrosis menos intensa con clorosis y expansión de la infección de tres a cuatro días después de la infiltración, lo cual fue válido también para las concentraciones en el rango de 10^4 ufc/mL. Las lesiones correspondientes a las poblaciones inferiores (10^3 - 10^1) aparecieron entre diez y quince días en forma de pequeñas manchas húmedas y clorosis ligera en el lugar de la infiltración (Fig. 2).

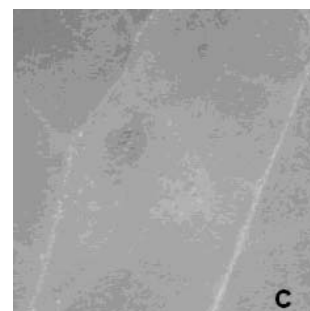
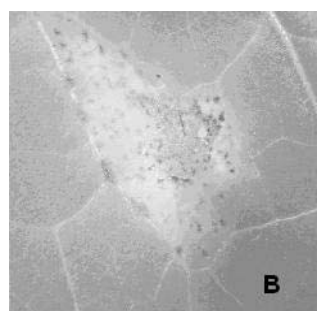
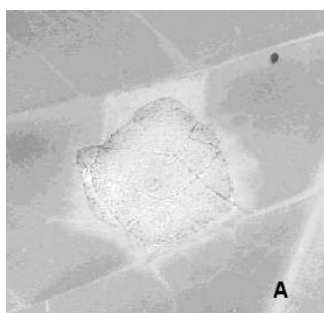


Figura 2. Lesiones en hojas de tabaco provocadas por diferentes poblaciones de la bacteria: A: 10^7 - 10^8 ufc/mL; B: 10^6 - 10^5 ufc/mL; C: 10^3 - 10^1 ufc/mL.

Tabla 3. Respuesta de las plantas de tabaco inoculadas con la extracción de *P. tabaci* a partir de las semillas infectadas

Tratamientos (total 1g)	Concentración inoculada (UFC/mL)	Síntomas por días de aparición
1g SI	$1,9 \times 10^7$	+/1
1g SI	$1,9 \times 10^5$	+/3-4
0,5g SI + 0,5g SS	$7,9 \times 10^6$	+/2
0,5g SI + 0,5g SS	$7,9 \times 10^4$	+/3-4
0,4g SI + 0,6g SS	$3,3 \times 10^6$	+/2-3
0,4g SI + 0,6g SS	$3,3 \times 10^4$	+/3-4
0,3g SI + 0,7g SS	$3,2 \times 10^6$	+/2-3
0,3g SI + 0,7g SS	$3,2 \times 10^4$	+/3-4
0,2g SI + 0,8g SS	$5,6 \times 10^4$	+/3
0,2g SI + 0,8g SS	$5,6 \times 10^3$	+/4
0,1g SI + 0,9g SS	$2,9 \times 10^4$	+/4
0,1g SI + 0,9g SS	$2,9 \times 10^3$	+/10-12
0,05g SI + 0,95g SS	$2,0 \times 10^3$	+/10-12
0,05g SI + 0,95g SS	$2,0 \times 10^2$	+/10-12
0,04g SI + 0,96g SS	$0,7 \times 10^3$	+/10-12
0,04g SI + 0,96g SS	$0,7 \times 10^2$	+/14
0,03g SI + 0,97g SS	$2,0 \times 10^3$	+/12
0,03g SI + 0,97g SS	$2,0 \times 10^2$	+/14
0,02g SI + 0,98g SS	$0,7 \times 10^3$	+/14
0,02g SI + 0,98g SS	$0,7 \times 10^2$	+/14
16066	$1,0 \times 10^3$	+/12
16066	$1,0 \times 10^2$	+/13
16067	$1,6 \times 10^2$	+/14
16067	$1,6 \times 10$	+/15

SI: Semillas infectadas.

SS: Semillas sanas.

El método del lavado de las semillas por agitación en zaranda, o el remojo en buffer, así como en solución salina al 0,85% y posterior siembra del líquido en medios de cultivo, se utiliza ampliamente para la detección en semillas de numerosas bacterias, entre ellas *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [Mohan y Schaad, 1987; Van Vuurde y Van der Bovenkaup, 1989; Moser *et al.*, 1994; Álvarez *et al.*, 1995; Prathuang *et al.*, 1994], y forma parte de los métodos empleados por los laboratorios especializados en análisis de semillas [USDA, 2001]. Los medios de cultivo utilizados en muchos casos son selectivos y contienen diferentes drogas para reducir los contaminantes y optimizar la captura de las bacterias fitopatógenas. A pesar que en este estudio se emplearon dos medios de cultivos ordinarios, se pudo aislar la bacteria en ambos, incluso cuando la población de *P. tabaci* se re-

dujo paulatinamente (Tabla 2). El pigmento fluorescente que se produce en torno de las colonias en el medio KB [King *et al.*, 1954] contribuye al diagnóstico de la bacteria.

La infiltración en las hojas de tabaco del recobrado a partir de las muestras constituye un complemento importante para la detección de bajas infecciones por el patógeno, que se incrementan con su multiplicación en los tejidos del hospedante. Los síntomas producidos contribuyen al diagnóstico, al aislamiento de la bacteria, y demuestran de hecho su patogenicidad, que resulta una prueba importante dentro de las indicadas para el análisis de semillas [USDA, 2001].

El uso de semillas sanas y el análisis para detectar las infecciones constituyen medidas de prevención y control de primer orden de todas las bacterias fitopatógenas. La posibilidad de contar con un método para la detección de *P. tabaci* en semillas de tabaco contribuye a la vigilancia fitosanitaria de la bacteria, objeto de cuarentena en Cuba.

CONCLUSIONES

- El procedimiento ensayado permite la detección de *P. tabaci* en semillas de tabaco inoculadas mediante siembra en el medio de cultivo KB a niveles de 10^3 - 10^4 ufc/mL.
- Con la infiltración en las hojas de tabaco del recobrado a partir de las muestras se incrementa la posibilidad de hallar poblaciones inferiores de la bacteria.

REFERENCIAS

- Agrios, G. N.: *Plant pathology*, 4th ed., Academic Press, San Diego, EE. UU., 1997.
- Álvarez, E.; E. J., Braun; D. C. Mc Gee: «New Assays for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in Soybean Seed», *Plant Disease* 79:12-14, EE. UU., 1995.
- Braun, A. C.: «A Study on the Mode of Action of the Wildfire Toxin», *Phytopathology* 45:659-664, EE. UU., 1955.
- Coresta: «Tobacco Seed Integrity Task Force». Final Report, May, 2005. <http://www.coresta.org/reports/seed-integrity-TF-may05.pdf> (consultado en diciembre del 2005).
- Gao, Jie; J. Gao: «Study on Occurrence of Tobacco Wildfire Disease», *Journal of Jilin Agricultural University* 19(1):8-15, China, 1997.
- Johnson, J.; H. F. Murwing: «Experiments on the Control of Wildfire of Tobacco», *Wis. Agr. Exp. Sta. Bul.* 62, EE. UU., 1925.
- King, E. O.; W. K. Ward; D. E. Raney: «Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescein», *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307, 1954.
- Lucas, G. B.: *Diseases of Tobacco*, 3rd ed., Biologycal. Consulting Associated, Raleigh, 1975.
- Mohan, S. K.; N. W. Schaad: «An Improved Agar Plating Assay for Detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Contaminated Bean Seed», *Phytopathology* 77(10):1390-1395, EE. UU., 1987.
- Moser, P.; L. Cowan.; H. A. Massah: «A Semi-Selective Medium Plating Assay for Detection and Differentiation of Bacterial Blight Pathogens of Bean and Pen», *Annual Report-Bean Improvement Cooperators* 37:25-26, EE. UU., 1994.
- Prathuang, S.; K. Khandej; M. Goto: «Development of New Methods for Ecological Study of Soybean Bacterial Pustule: a semiselective Medium for Detecting *Xanthomonas campestris* pv. *glycinea* in Contaminated Soybean Seed». Proceeding of World Soybean Research Conference, Tailandia, 1994, pp. 197-202.
- Shoemaker, P. B.: «Foliar Diseases Caused by Bacteria. *Compendium of Tobacco Diseases*», The American Phytopathology Society, APS Press, EE. UU., 1990.
- USDA: «Methods Manual B (RM B). Seed Health Testing and Phytosanitary Field Inspection, 2001», http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/plant_exports/downloads/Ref-Man-B.pdf (consultado en mayo del 2006).
- Van Vuurde, J. W. L; G. W. Van der Bovenkaup: «Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean», *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material*, American Phytopathological Society. St. Paul, MN, EE. UU., 1989.
- Wannamaker, M. J.; R. S. Rufty: «Development of a Method to Evaluate Tobacco Genotypes for Resistance to Angular Leaf Spot in the Greenhouse», *Plant Disease* 73:964-968, EE. UU., 1989.
- Wolf, F. A.: *Tobacco Diseases and Decays*, Duke University Press, Durham, North Carolina, EE. UU., 1957, pp. 188-211.
- Wolf, F. A.; A. C. Foster: «Bacterial Leaf Spot of Tobacco», *Science* 46:361-362, EE. UU., 1917.
- : «Tobacco Wildfire», *Journal Agr. Res.* 12:449-458, EE. UU., 1918.