

Microorganismos de ambientes marinos y costeros para el control del cáncer bacteriano de tomate

Kebyn Guerra¹, Thelma Castellanos¹, José Pablo Lara-Ávila², Luis Hernández-Montiel¹, Carlos Angulo¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, cangulo@cibnor.mx
²Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Abstract: Bacterial cancer of tomato is a disease caused by *Clavibacter michiganensis* subespecie. *michiganensis* (*Cmm*). Currently, there are no commercial resistant cultivars or effective control treatments. The present study evaluated microorganisms from marine and coastal environments for the control of this disease. Results indicate that one bacteria of the genus *Bacillus* (n = 4) and other one of genus *Ochrobactrum* (n = 1) inhibited the growth of *Cmm* and decreased the symptoms of the disease in plants under *in vitro* conditions. Therefore, bacteria isolated from marine and coastal environments with potential as *Cmm* control agents were identified. **Keywords:** marine environments, bacterial cancer, biological control agents.

Resumen: El cáncer bacteriano de tomate es una enfermedad ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subespecies *michiganensis* (*Cmm*). Actualmente, no existen variedades comerciales resistentes o tratamientos eficaces de control. El presente estudio evaluó microorganismos de ambientes marinos y costeros para el control de esta enfermedad. Los resultados indican que

inclusive totales de los cultivos (Nandi et al. 2018). Ante esto, se han propuesto alternativas innovadoras de estudio y aplicación de bacterias como agentes de control biológico en plantas. Al respecto, se han identificado diversos mecanismos de acción de algunas bacterias que protegen a los cultivos de tomate del daño por *Cmm*, destacando la producción de 1) moléculas antimicrobianas, 2) enzimas líticas y sideróforos, y 3) la estimulación de la resistencia sistémica del hospedero (Takishita et al. 2018). En este contexto, los recursos microbianos presentes en los ecosistemas marinos y costeros; poco explorados, pueden tener aplicaciones potenciales en agricultura, por lo que las bacterias aisladas de estos sitios resultan prometedoras para su estudio (Ghodino 2010).

Objetivos. Seleccionar bacterias que actúen como agentes de control biológico contra *Cmm*, agente causal del cáncer bacteriano de tomate, mediante un estudio de bioprospección de microorganismos aislados de ambientes marinos y costeros.

Materiales y Métodos. Se aislaron bacterias de ambientes marinos y costeros de Baja California Sur. Los sitios de muestreo fueron: 1). Rizósfera de salicornia y suelo en "Dunas Don Miguelito" (Guerrero Negro, B.C.S., 27°57'00"N 114°07'36"O) (n = 16), 2). Sedimento marino (n = 6) y, 3). Ventila hidrotermal somera en Santispac (n = 2) (Golfo de California, Mulegé, B.C.S., 26°53'22"N 111°57'08"O). Las bacterias fueron aisladas de tres muestreos en los mismos sitios, en julio de 2015, noviembre de 2016 y diciembre de 2018, y fueron purificadas y preservadas a -80°C. De los aislados obtenidos, se seleccionaron un total de 24 bacterias que mostraron actividad antimicrobiana en estudios previos contra bacterias Gram negativas (*Staphylococcus aureus*) y Gram positivas (*E. coli*, *Salmonella typhi* y *Aeromonas hydrophila*), y se caracterizó su potencial como agentes de control hacia *Cmm*. Se realizaron pruebas *in vitro* de antagonismo y de actividad antimicrobiana de sobrenadantes bacterianos por difusión en agar (secreción de compuestos bioactivos) y mediante la técnica de microdilución con rezasurina (viabilidad celular).

Con base en los resultados observados en las pruebas anteriores, se seleccionaron las 5 bacterias con mayor potencial y se realizó un experimento para determinar la capacidad de protección contra *Cmm*. El experimento se realizó con plántulas de tomate (variedad río grande) con 10 días de desarrollo en condiciones *in vitro* a 28°C con fotoperíodo 16/8 horas de luz/oscuridad. Debido a la patogenicidad y el riesgo de dispersión ambiental de *Cmm*, este experimento se realizó en cajas magenta con solución nutritiva Hoagland y con filtro para el intercambio de gases.

Cada grupo tratamiento consistió en (plántulas + bacteria + *Cmm*): (1) 10 plántulas de tomate, inoculadas con (2) la bacteria seleccionada (1x10⁷ UFC/mL), y retadas con (3) *Cmm* (1x10⁷ UFC/mL). Las bacterias seleccionadas se inocularon al medio y raíz, mientras que *Cmm* se inoculó mediante la técnica de punción en el tallo. Posteriormente, a los 22 días posteriores a la inoculación con *Cmm* y con la aparición de síntomas asociados al cáncer bacteriano de tomate (disrupción del tallo, marchitez, clorosis y ondulamiento foliar) (Blancard 2012), se analizó el grado e incidencia en el grupo tratamiento (plántulas + bacteria + *Cmm*) y en el grupo testigo (plántulas + *Cmm*). Finalmente, las 5 bacterias que mostraron mayor potencial en los estudios de actividad antimicrobiana y en el ensayo con plántulas de tomate se identificaron mediante técnicas moleculares (secuenciación y

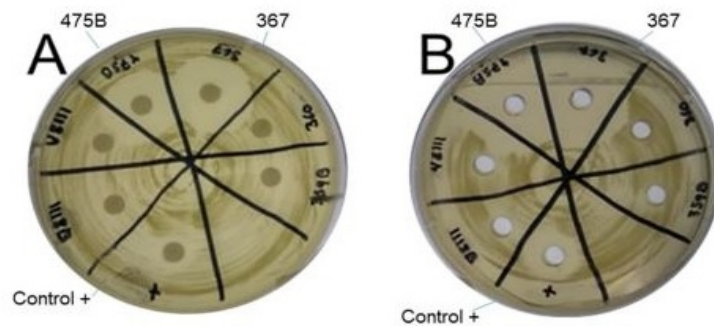


Figura 2. Actividad antimicrobiana del sobrenadante frente a *Cmm*, mediante técnicas de difusión. A). Método de difusión en disco, B). Método de difusión en pozo de agar.

comparación del gen 16s ARNr) (Jung et al. 2014).

Resultados y Discusión: Los ambientes marinos y costeros son lugares donde la competencia para la supervivencia es un factor importante para la adaptación de bacterias, especialmente en ambientes áridos y con altas concentraciones de sal (Ghodino 2010). En este estudio de bioprospección (Fig. 1), a partir de muestras recolectadas de este tipo de ambientes, se logró identificar satisfactoriamente cinco bacterias con potencial antagonico contra *Cmm*. Del total de aislados evaluados, las cepas denominadas como *Bacillus* sp. 367, *Bacillus* sp. 475B, *Bacillus* sp. 1118A y *Bacillus* sp. 1118B tuvieron actividad antagonica, ya que formaron halos de inhibición del crecimiento de *Cmm* de entre 17 y 25 mm (Fig. 2). Esta inhibición se puede deber a una interacción

Conclusiones

En este estudio de bioprospección se logró identificar 5 bacterias con potencial como agentes de control biológico de *Cmm*. Entre estos aislados, destacaron *Bacillus* sp. 367 (Dunas), *Bacillus* sp. 475B (Ventila hidrotermal somera) y *Ochrobactrum* sp. 360 (Dunas). *Bacillus* sp. 367 y *Bacillus* sp. 475B tienen capacidad antimicrobiana contra *Cmm* mediante la secreción de moléculas. Los aislados *Bacillus* sp. 1118A y 1118B mostraron antagonismo mediante contacto directo con *Cmm*, probablemente por competencia de espacio y nutrientes. En cuanto al efecto protector en plántulas de tomate infectadas con *Cmm*, *Ochrobactrum* sp. (360) disminuyó significativamente la frecuencia y severidad de los síntomas del cáncer bacteriano *in vitro*, probablemente mediante la estimulación de la resistencia sistémica de la planta. Con el fin de



Figura 1. Diagrama general de la metodología realizada para el aislamiento e identificación de bacterias con capacidad antagonica contra el fitopatógeno *Cmm* (Guerra et al. 2020).

bacterias de los géneros *Bacillus* (n = 4) y *Ochrobactrum* (n = 1) inhibieron el crecimiento de *Cmm* y disminuyeron los síntomas de la enfermedad en plantas en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, se identificaron bacterias aisladas de ambientes marinos y costeros con potencial como agentes de control de *Cmm*. **Palabras clave:** ambientes marinos, cáncer bacteriano, agentes de control biológico.

Biocología y Ciencias Agropecuarias.

Usuarios: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad (SENASICA), dependencias estatales y municipales encargadas de sanidad vegetal, investigadores y estudiantes de diversas áreas disciplinares afines, y la sociedad en general.

Introducción: La industria del tomate es una de las más globalizadas y de mayor superficie en comparación con otras hortalizas. Su producción es significativamente afectada por fitopatógenos. Entre éstos, destaca *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*), el agente causal del cáncer bacteriano de tomate, enfermedad cuarentenaria que causa pérdidas

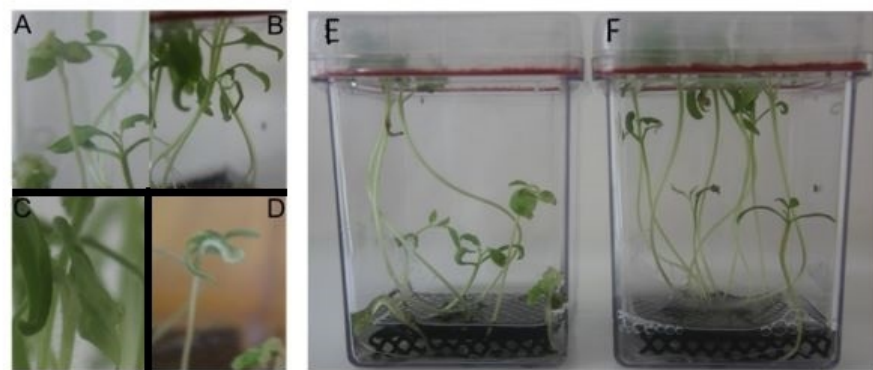


Figura 3. Cultivo *in vitro* de plántulas de tomate en sistema hidropónico, con 22 días en contacto con el fitopatógeno *Cmm* e inóculo bacteriano (control biológico). Síntomas evaluados: A). Clorosis, B). Marchitez de hojas, C). Ondulamiento foliar, D). Disrupción de tallo, E). Testigo infectado con *Cmm* y F). Tratamiento con *Ochrobactrum* sp. e infectado con *Cmm*. Todos los cultivos en Solución de Hoagland 25% (Guerra et al. 2020).

directa bacteria-bacteria de competencia por espacio y nutrientes. Por otra parte, solo los sobrenadantes de los aislados *Bacillus* sp. 367 y *Bacillus* sp. 475B tuvieron un efecto de inhibitorio de hasta el 98% del crecimiento de *Cmm* en la prueba de microdilución con rezasurina (*in vitro*). En este caso, se ha reportado que algunas cepas de *Bacillus subtilis* pueden inhibir el desarrollo de *Cmm* mediante la secreción de lipopéptidos antimicrobianos que interactúan e inestabilizan la membrana bacteriana (Jung et al. 2014). En las plántulas de tomate se observó que el aislado *Ochrobactrum* sp. 360 disminuyó todos los síntomas en más del 80% (Fig. 3). Sin embargo, este aislado no presentó actividad antagonica frente a *Cmm*. Es posible que el efecto pudo ser la estimulación de la resistencia sistémica de la planta, ya que se ha reconocido como un mecanismo por el cual algunas bacterias brindan protección a su hospedero. No obstante los resultados alentadores en laboratorio es necesario hacer pruebas en campo que permitan determinar la eficacia y validación contra el cáncer bacteriano del tomate.

elucidar los mecanismos de las actividades biológicas observadas, las perspectivas son: 1). Realizar un estudio en invernadero y evaluar la interacción en el sistema planta – microorganismo y 2). Caracterizar las moléculas de los sobrenadantes con actividad antimicrobiana.

Impacto socioeconómico: La identificación de microorganismos aislados de ambientes marinos y costeros con potencial para el control del cáncer bacteriano de tomate, podría ser una alternativa eficaz para reducir las pérdidas económicas importantes de esta enfermedad, en el sector agrícola del país.

Agradecimientos

Al Dr. Rogelio Ramírez † y al M.C. Mario Arce † del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por el apoyo brindado en este proyecto. CONACYT-PDCPN-248033).