



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZACION DE CEPAS DEL FITOPATOGENO DE TOMATE
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* AISLADAS EN CHILE Y
ESTRATEGIAS DE BIOCONTROL**

Miryam Paola Valenzuela Ormeño

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Profesor Guía: Dr. Michael Seeger Pfeiffer
Profesora Co-Guía: Dra. Ximena Besoain Canales

Enero, 2019

RESUMEN

El cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* (Cmm) es una de las enfermedades bacterianas más importantes en tomate (*Solanum lycopersicum* (Mill.)) en Chile y en el mundo. Este patógeno se transmite por semilla y permanece viable en restos vegetales. No se han reportado variedades comerciales de tomate resistentes a Cmm. Las alternativas de control de este patógeno se basan en la aplicación de productos cúpricos y antibióticos y recientemente con productos biológicos. Debido a la importancia del cultivo del tomate en Chile y de la incidencia reportada de esta enfermedad, esta tesis llevó a cabo una caracterización de cepas de Cmm aisladas en Chile y la evaluación de productos biológicos para su biocontrol. La hipótesis propone que las cepas de Cmm aisladas en Chile poseen alta diversidad en términos de virulencia, genética, y susceptibilidad a cobre y antibióticos y, que productos biológicos pueden inhibir el crecimiento de Cmm. Para caracterizar las cepas de Cmm aisladas en Chile se plantearon los siguientes objetivos: (1) determinar su virulencia; (2) identificar fenotípicamente y molecularmente las cepas y establecer relaciones filogenéticas entre ellas y con cepas de otros países; (3) analizar los genes de patogenicidad; (4) determinar la sensibilidad a estreptomycin y cobre y; (5) determinar el efecto de cepas de *Pseudomonas*, *Streptomyces* y extractos plantas nativas sobre Cmm *in vitro* e *in vivo*. Se analizaron 25 cepas de Cmm aisladas de diferentes localidades de la Zona Central de Chile. Mediante análisis bioquímicos, microbiológicos y moleculares las 25 cepas fueron identificadas como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Las cepas de Cmm mostraron los síntomas característicos de cancro bacteriano con diferentes grados de daño luego de inocularlas en plantines de tomate. Los análisis Multi Locus MLSA y MLST basadas en cinco genes esenciales: *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk* y *recA*, y el análisis MLVA basado en ocho repeticiones en tándem de número variable (VNTR) mostraron baja diversidad entre las 25 cepas chilenas, dividiéndolas en tres grupos. El primero contenía 21 cepas y se agrupaba con dos cepas de origen desconocido. El segundo grupo contenía una cepa chilena, que se agrupó con cepas de Brasil y Uruguay. El tercer grupo contenía tres cepas chilenas y se agrupó con cepas de Argelia, Bélgica, Uruguay, Estados Unidos, Francia y Holanda. Se detectó la presencia de dos genes de patogenicidad cromosomales, *chpC* y *tomA*, en las 25 cepas analizadas utilizando PCR. Dos cepas carecían de uno de los dos genes de patogenicidad ubicados en los plásmidos, *pat-1* y *celA*, respectivamente. El análisis filogenético de los genes *chpC* y *tomA*, mostró una baja variabilidad entre las cepas chilenas. La determinación de la sensibilidad a estreptomycin mostró que cuatro cepas fueron altamente sensibles (CMI < 2 µg mL⁻¹). No obstante, la mayoría de las cepas fueron resistentes, con CMI ≥ 100 µg mL⁻¹ de estreptomycin. Al amplificar y secuenciar el gen *rpsL* de las 25 cepas chilenas, se detectó una mutación que confiere alta resistencia en las 21 cepas resistentes a estreptomycin. Esta mutación estaba ausente en las cuatro cepas sensibles. Siete cepas fueron resistentes a cobre, creciendo a una concentración ≥ 0,4 mM de cobre en medio CYEG. Luego de analizar los genomas de dos cepas chilenas de Cmm se detectaron 10 genes asociados a resistencia a cobre, que codifican transportadores de cobre, chaperonas y represores transcripcionales. Doce cepas de *Pseudomonas*, 10 cepas de *Streptomyces* y 9 extractos vegetales mostraron efecto inhibitorio *in vitro* sobre Cmm. Los tratamientos con productos biológicos en plantas de tomate bajo invernadero mostraron una disminución de la incidencia y severidad de la enfermedad. Sin embargo, sólo los tratamientos con extractos vegetales mostraron un efecto estadísticamente significativo. En conclusión, se observó baja diversidad entre cepas Cmm aisladas en Chile y, nuevos productos biológicos tienen potencial para el control de este fitopatógeno.

Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated in Chile, and strategies of biocontrol

ABSTRACT

Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* (Cmm) is one of the most important bacterial diseases of tomato (*Solanum lycopersicum* (Mill.)) in Chile and worldwide. This pathogen is transmitted by seeds and persists in plant debris. Commercial tomato varieties resistant to Cmm have not been reported. The alternatives to control this disease are based on copper and antibiotics, and, recently, biological products. Due to the importance of tomato crop in Chile and the reported incidence of this disease, this thesis carries out a characterization of Cmm strains isolated in Chile and the evaluation of biological products for its biocontrol. The hypothesis proposed that Cmm strains isolated in Chile possess a high diversity in terms of virulence, genetics, and susceptibility to copper and antibiotics, and that biological products can inhibit Cmm growth. In order to characterize Cmm strains from Chile, the following objectives were proposed: (1) to determine their virulence; (2) to identify the strains phenotypic and molecularly and to establish relationships between them and with strains from other countries; (3) to analyze pathogenicity genes; (4) to determine the sensitivity to streptomycin and copper; (5) to determine the effect of *Pseudomonas*, *Streptomyces* and native plant extracts on Cmm *in vitro* and *in vivo*. Twenty-Five Cmm strains isolated from different localities of Central Chile were analysed. Through biochemical, microbiological and molecular analyses, the 25 strains were identified as *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. All strains showed typical symptoms of bacterial canker and various degrees of damage after inoculation on tomato seedlings. Multi Locus analyses MLSA and MLST based on the five housekeeping genes *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk* y *recA*, and the MLVA analysis based on eight variable number of tandem repeats (VNTR) showed low diversity between the 25 Chilean Cmm strains, clustering them in three groups. The first group contained 21 Chilean strains and clustered with two strains of unknown origin. The second group contained one Chilean strain that clustered with strains from Brazil and Uruguay. The third group contains three Chilean strains and clustered with strains from Algeria, Belgium, Uruguay, United States, France and Netherlands. The presence of two chromosomal pathogenicity genes, *chpC* and *tomA*, was detected by PCR in the 25 strains. Two strains lacked one of the two pathogenicity genes located in the plasmids, *pat-1* and *celA*, respectively. Phylogenetic analyses of *chpC* and *tomA* genes showed low variability between Chilean strains. Streptomycin sensitivity determination showed four strains highly sensitive (MIC < 2 µg mL⁻¹). However, most of the strains were resistant to streptomycin with MIC ≥ 100 µg mL⁻¹. After amplification and sequencing of the *rpsL* gene, a mutation was detected that confers high resistance in the 21 streptomycin-resistant strains. This mutation was absent in four sensitive strains. Seven strains were resistant to copper, growing at a concentration of ≥ 0.4 mM copper in CYEG medium. After analyzing the genomes of two Chilean Cmm strains, 10 genes associated with copper resistance were detected, which encode copper transporters, chaperones and transcriptional repressors. Twelve *Pseudomonas* strains, 10 *Streptomyces* strains and 9 plant extracts showed inhibitory effect on Cmm *in vitro*. The treatments with biological products in tomato plants under greenhouse showed a decrease in the incidence and severity of the disease. However, only treatments with plant extracts showed a statistically significant effect. In conclusion, a low diversity between Cmm strains from Chile were observed and, novel biological products have potential for the control of this phytopathogen.