



**FLÁVIA MARA VIEIRA LELIS**

**COLONIZAÇÃO DE SEMENTES E  
PLANTAS DE TOMATE CULTIVADAS *in  
vitro* POR *Clavibacter michiganensis* subsp.  
*michiganensis* TRANSFORMADAS COM *gfp***

**LAVRAS - MG**

**2013**

**FLÁVIA MARA VIEIRA LELIS**

**COLONIZAÇÃO DE SEMENTES E PLANTAS DE TOMATE  
CULTIVADAS *in vitro* POR *Clavibacter michiganensis* subsp.  
*michiganensis* TRANSFORMADAS COM *gfp***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. Ricardo Magela de Souza

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Lelis, Flávia Mara Vieira.

Colonização de sementes e plantas de tomate cultivadas *in vitro*  
por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* transformadas  
com *gfp* / Flávia Mara Vieira Lelis. – Lavras : UFLA, 2013.

78 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Bibliografia.

1. Cancro bacteriano. 2. Patógenos transmitidos por sementes. 3.  
Proteína verde fluorescente. 4. Disseminação. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.32

**FLÁVIA MARA VIEIRA LELIS**

**COLONIZAÇÃO DE SEMENTES E PLANTAS DE TOMATE  
CULTIVADAS *in vitro* POR *Clavibacter michiganensis* subsp.  
*michiganensis* TRANSFORMADAS COM *gfp***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 02 de agosto de 2013.

Dr <sup>a</sup> Antonia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Flávio H. Vasconcelos Medeiros	UFLA
Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dr <sup>a</sup> Sandra Marisa Mathioni	INCT Café

Dr. Ricardo Magela de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2013**

*A Deus, minha fonte inspiradora e pela fé que me faz caminhar a cada dia.*

*À minha querida mãe, Maria Dalva Vieira Lelis, e ao meu tio, Pe. José Casimiro da Silva (in memoriam), especialmente por me ensinarem os verdadeiros valores da vida.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo que recebo a cada dia.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro durante toda a execução deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Magela de Souza, por ter me ensinado Bacteriologia de Plantas, pela orientação, por sempre acreditar em mim, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela amizade e apoio.

Ao Dr. Jan van der Wolf, pela orientação, pelo valioso aprendizado, paciência, atenção e grandes oportunidades que me proporcionou.

À professora Dra. Antonia dos Reis Figueira, pelas valiosas sugestões e ajuda na ponte Brasil Holanda.

Ao Dr. Robert Czajkowski, pela coorientação e pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia da UFLA, pela convivência agradável, em especial à Ana Maria, por ser sempre tão prestativa.

À Universidade de Wageningen e ao Plant Research International (PRI), em especial Pieter, Trudy e Patricia, pela solicitude, sugestões e ajuda, e por tornarem meus dias de trabalho mais felizes.

À minha querida mãe, Maria Dalva; às minhas irmãs, Júnia e Nélia, e ao meu cunhado, Raphael, pelo incentivo, compreensão e amor.

Ao meu querido Massimo Ninfa, pelo companheirismo, amor e carinho.

Aos meus amigos que especialmente me incentivaram, Carol, Rosália, Eduardo, Jucilayne, Ellen, Cris Brisolara, Annelies, Deila, Suellen, Henrique e Glauco.

À minha família sempre presente.

Sem todos vocês não seria possível esta conquista!

**MUITO OBRIGADA!**

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você  
estará fazendo o impossível."

São Francisco de Assis

## RESUMO

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) é o agente etiológico do cancro bacteriano do tomateiro, uma das mais sérias doenças da cultura. Neste trabalho, um isolado de Cmm espontaneamente resistente à rifampicina (IPO3356) foi marcado com o gene *gfp* para estudos da colonização de plantas de tomateiro cultivadas axenicamente. O transformante (IPO3525) expressou a proteína de maneira estável *in planta* e apresentou virulência comparável à da estirpe selvagem. As plantas foram inoculadas com 100 µl da suspensão bacteriana na base do caule e o número de ‘Unidade Formadora de Colônia’ (UFC) por grama de tecido foi determinado por diluição em placas em meio seletivo. Cmm colonizou de forma eficiente as plantas *in vitro* as quais desenvolveram sintomas típicos da doença. A presença de Cmm nos tecidos vascular e parenquimático foi confirmada. Foi estudada também a localização da bactéria em sementes de tomate inoculadas artificialmente com a estirpe Cmm-GFP IPO3525. Utilizando microscopia confocal foi confirmada a presença IPO3525 nos tricomas, nas camadas exteriores, testa e nas células do endosperma e embriões. Aos 36 dias após plantio não houve sintomas visíveis em qualquer das plantas infectadas, mas houve baixa incidência de IPO3525. Não foi detectada a presença de IPO3525 em plantas com 23 dias e nem do isolado selvagem IPO3356 em plantas com 36 ou 23 dias após plantio. Cmm-GFP pode ser usado efetivamente para estudos detalhados de colonização *in planta* e sementes de tomate.

Palavras-chave: Cancro bacteriano, proteína verde fluorescente (GFP), plantas *in vitro*, patógenos transmitidos por semente, disseminação



## ABSTRACT

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) is the etiologic agent of tomato canker, which is considered to be the most serious disease of the culture. In this work, a spontaneous rifampicin resistant strain of Cmm (IPO3356), tagged with a Green Fluorescent Protein (GFP) to study the colonization of axenically grown tomato plants. Transformants (IPO3525) expressed GFP in a stable way also *in planta* and the virulence of the GFP-tagged strain was comparable to wild type strain. Plants were inoculated with 100µl of the bacterial suspension at the stem base and the number of colony-forming unit (CFU) per gram of tissue was determined by dilution plating on a selective medium. Cmm efficiently colonized the *in vitro* plants and these plants developed symptoms typical for Cmm. The presence of Cmm in vascular and parenchymatic tissue was confirmed. It was also studied the bacterial location in tomato seeds artificially inoculated with Cmm-GFP strain IPO3525. Using confocal microscopy we confirmed IPO3525 in the trichomes hairs, in the outer testa layers, endosperm and embryo. At 36 days-old there were no visible symptoms in any of the inoculated plants, but there was low incidence of IPO3525. Was not detected the presence of IPO3525 in plants with 23 days or for the wild type strain IPO3356 in plants with 36 or 23 days-old after being sown. Cmm-GFP can be effectively used for detailed studies of colonization *in plant* and tomato seeds.

Keywords: Bacterial canker, green fluorescent protein (GFP), *in vitro* plant, seedborne pathogen, dissemination

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>19</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>21</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....</b>	<b>26</b>
<b>ARTIGO 1: Studies on the colonization of axenically grown tomato plants by a GFP-tagged strain of <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>ARTIGO 2: Colonização de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> em sementes de tomate .....</b>	<b>60</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) (DAVIS et al., 1984) (Cmm) é o agente etiológico do cancro bacteriano do tomateiro (*Solanum lycopersicum*, sin. *Lycopersicon esculentum* Mill.), considerada uma das mais importantes doenças da cultura na maioria das regiões produtoras (EICHENLAUB; GARTEMANN, 2011).

Cmm foi primeiramente descrito no Estado de Michigan, Estados Unidos, mas atualmente pode ser encontrado em praticamente todas as áreas produtoras de tomate do mundo. Na Europa, é uma praga quarentária A2 (*CLAVIBACTER...*, 2012), enquanto, no Brasil, é considerada uma praga não quarentenária regulamentada – PNQR (BRASIL, 2008). Independente da categoria, o cancro bacteriano tem causado sérias perdas tanto no campo quanto em ambiente protegido (*CLAVIBACTER...*, 2012; GLEASON; GITAITIS; RICKER, 1993) e várias razões tem contribuído para isso: as sementes carregam o patógeno; o patógeno persiste em restos de cultura no solo podendo ocorrer infecções através de ferimentos nas raízes; a doença é espalhada de planta a planta através de práticas culturais; Cmm chega rapidamente aos vasos do xilema; plantas jovens vascularmente infectadas geralmente morrem ou são improdutivas (STRIDER, 1969).

A bactéria penetra no tomateiro pelas aberturas naturais e ferimentos e coloniza sistemicamente os vasos do xilema (MELETZUS et al., 1993), dando origem ao sintoma mais prevalente encontrado em associação com infecções por Cmm, a murcha. O patógeno também pode causar cancrios em caules, pecíolos e

na nervura das folhas, descoloração vascular, formação de raízes adventícias no caule, exsudado bacteriano nas partes infectadas e, nos frutos manchas escuras com halo esbranquiçado ao redor que recebem o nome de “olho de perdiz” (STRIDER, 1969). Se a fonte de inóculo for a semente, pode ocorrer infecção sistêmica, provocando a murcha vascular inicialmente. O aparecimento dos sintomas é dependente da idade da planta, local da infecção, cultivar e condições ambientais (GLEASON; GITAITIS; RICKER, 1993).

A cultura de tecidos é a técnica de cultivo *in vitro* de qualquer parte da planta, sejam estas células, tecidos ou órgãos, em meio nutriente preparado artificialmente com condições assépticas (DEVI; SRINIVASAN, 2006), oferecendo deste modo, grande número de propágulos axênicos e uniformes. Uma desvantagem é a sensibilidade destas plantas quando comparado às plantas cultivadas em vasos com substrato. Porém, o uso de plantas *in vitro* em estudos da interação planta-patógeno têm vantagens e pode ser útil, pois a expressão dos sintomas é mais rápida do que em plantas envasadas, reduzindo o tempo de ensaio de patogenicidade, o que é particularmente importante nos programas de regulação. Além disso, a padronização das condições das câmaras de crescimento é mais facilmente alcançada do que em casa de vegetação.

Em muitos países, Cmm é uma praga quarentenária, o que significa que os estudos com esta bactéria deveriam ser conduzidos sob rigorosas condições de higiene. Este padrão rigoroso se encaixa com o padrão utilizado neste estudo, onde as plantas são crescidas em tubos com tampas e cultivadas em câmaras de crescimento, evitando a dispersão do patógeno. Este padrão, também é requisitado para organismos geneticamente modificados. Neste estudo, foi utilizado Cmm marcada com GFP para facilitar o acompanhamento da bactéria nos vasos da planta e desta maneira, melhorar o entendimento do movimento de Cmm no tomateiro.

Testes de detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes devem ser práticos, de modo a garantir a sanidade de lotes comerciais e, assim, evitar a ocorrência de epidemias (TEBALDI; SOUZA; MACHADO, 2007). Diferentes métodos, desde os mais comuns, como plaqueamento (FATMI; SCHAAD, 1988; SHIRAKAWA; SASAKI; OZAKI, 1991), aos mais sensíveis e rápidos, como as técnicas moleculares (DREIER; BERMPOHL; EICHENLAUB, 1995; HADAS et al., 2005; LUO et al., 2008; SHIRAKAWA; SASAKI; OZAKI, 1991; XU et al., 2010) foram desenvolvidos e adaptados com a finalidade de detectar a presença de Cmm em sementes de tomate e estudar sua disseminação. Porém, para estes estudos, é necessária a utilização de sementes de tomate internamente contaminadas com Cmm. A disponibilidade de sementes naturalmente infectadas é limitada, e algumas formas de inoculação artificial podem resultar em colonização da bactéria somente nos tricomas da semente.

Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a colonização de plantas de tomate *in vitro* por Cmm marcado com ‘Green Fluorescent Protein (GFP)’ e também a localização de Cmm-GFP em sementes de tomate após inoculação artificial e sua transmissão da semente para a planta.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Taxonomia e etiologia de Cmm**

A bactéria foi descrita em 1910, em Michigan, nos Estados Unidos por Erwin Smith. Foi nomeada, primeiramente, *Bacterium* e, mais tarde em 1914, o próprio autor sugeriu a mudança do nome para *Aplanobacter michiganense* por concluir que se tratava de uma bactéria não móvel (STRIDER, 1969). Depois de muitas controversias e nomenclaturas, com base em características morfológicas

e de coloração, a bactéria foi agrupada no gênero *Corynebacterium* em 1934, assim como a maioria das bactérias gram-positivas (EICHENLAUB; GARTEMANN; BURGER, 2006), e nomeada *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen.

Em 1984, a bactéria foi reclassificada como pertencente ao gênero *Clavibacter*, baseando-se, principalmente, na composição da parede celular (ácido 2,4-diaminobutírico), menaquinona e conteúdo de citosina e guanina, e passou formalmente a ser chamada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (DAVIS et al., 1984).

O gênero *Clavibacter* pertence à família *Microbacteriaceae* (PARK et al., 1993) e possui somente a espécie *Clavibacter michiganensis*, a qual é dividida em cinco subespécies fitopatogênicas, de acordo com hospedeiro específico: *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), podridão anelar na batata; *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* (Cmi), murcha em alfafa; *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Cmn), murcha, mancha foliar e crestamento do milho; *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* (Cmt), mosaico bacteriano em trigo e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), murcha e cancro em tomateiro (EICHENLAUB; GARTEMANN; BURGER, 2006). No Brasil as três primeiras bactérias são pragas quarentenárias A1 e Cmm é considerada uma praga não quarentenária regulamentada (BRASIL, 2008).

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* é uma bactéria gram-positiva, baciliforme, aeróbia estrita, com colônias amareladas e temperatura ótima de crescimento entre 25 e 28°C (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

## **2.2 O tomateiro como hospedeiro e sua importância**

Assim como as outras subespécies de *Clavibacter*, Cmm é altamente específica aos seus respectivos hospedeiros e a algumas poucas espécies relacionadas de plantas (EICHENLAUB; GARTEMANN; BURGER, 2006).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* sin. *Lycopersicon esculentum*) é hospedeiro natural de Cmm, mas outros hospedeiros suscetíveis podem ser inoculados artificialmente, incluindo a pimenta malagueta e pimenta tabasco (*Capsicum frutescens* L.), pimenta (*C. pubescens*), fumo (*Nicotiana glutinosa* L.), fisális (*Physalis pruinosa* L.), *Solanum douglasii*, batata (*S. capsicibaccatum*), diferentes espécies de tomate (*Lycopersicon glandulosum* Muller, *L. peruvianum* Mill., *L. hirsutum*, *L. cheesmanii*), berinjela (*S. melongena* L.), dentre outros (STRIDER, 1969). Os hospedeiros alternativos são considerados um problema, pois mesmo que não sejam de importância econômica, servirão como reservatório e ambiente de multiplicação.

O tomate é um dos vegetais mais cultivados em todo o mundo. No Brasil, está entre as 20 ‘commodities’ agrícolas mais importantes. Tendo ficado em oitavo lugar no ranking de produção de tomate em 2011, segundo os dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2013).

Além da importância econômica, o tomateiro se destaca pela importância nutricional. Componentes como o licopeno, importante carotenoide, e as vitaminas presentes em sua composição podem agir como agente antioxidante. Alguns estudos suportam seu efeito protetor contra doenças em humanos (PELLISSARI; RONA; MATIOLI, 2008; SHAMI; MOREIRA, 2004).

### **2.3 Modo de infecção e sintomas**

Infecções do tomateiro por Cmm podem ocorrer de forma sistêmica ou localizada, dando origem a diferentes sintomas (LEÓN et al., 2011). A infecção sistêmica pode ser por sementes infectadas e/ou infestadas que transmitem a

doença para a planta ou por invasão do sistema vascular através de ferimentos. Infecção localizada, geralmente é através de aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou tricomas quebrados. Carlton, Braun e Gleason (1998) demonstraram a primeira evidência de que Cmm pode entrar em tomateiro através de hidatódios e causar necrose marginal.

Quando ocorre invasão do tecido vascular em estágios iniciais, a murcha unilateral pode ser observada. Em estágios avançados de intensa multiplicação da bactéria, o caule pode se romper sendo possível observar exsudado bacteriano no local, formando o cancro. Quando Cmm penetra no tomateiro através de aberturas naturais, folhas e frutos podem apresentar infecções localizadas. Frutos infectados podem transmitir Cmm para as sementes (LEÓN et al., 2011).

Tomateiros, quando infectados por Cmm podem produzir uma variedade de sintomas, como murcha; cancro nos caules, pecíolos e nervuras das folhas; descoloração vascular; formação de raízes adventícias no caule; exsudação nas partes infectadas; necrose marginal das folhas que enrolam e secam, e nos frutos manchas escuras com halo esbranquiçado ao redor que recebem o nome de “olho de perdiz” (STRIDER, 1969). Todos estes sintomas são dependentes de diferentes fatores, como condições ambientais (alta umidade relativa e temperatura ~28°C), agressividade do patógeno, cultivar, idade da planta e tipo de infecção (CHANG; RIES; PATAKY, 1992; DREIER; MELETZUS; EICHENLAUB, 1997; GLEASON; GITAITIS; RICKER, 1993; SEN et al., 2013; XU et al., 2012).

A murcha unilateral aparece, inicialmente, em plantas infectadas sistemicamente por Cmm, tendo várias hipóteses surgido para explicar este mecanismo (GARTEMANN et al., 2003). Uma delas seria o impedimento físico do transporte de água, causado pela multiplicação bacteriana nos vasos do xilema (JAHR et al., 1999). A produção de exopolissacarídeo (EPS) pela bactéria também foi considerado um fator importante no entupimento dos vasos



do xilema, mas outro estudo mostrou que o sintoma de murcha causada por Cmm parece não depender da produção de EPS (BERMPOHL; DREIER; EICHENLAUB, 1996). Alguns isolados de Cmm são capazes de produzir enzimas, como poligalacturonase, pectato liases, celulase e xilanases, que degradam a parede celular da planta, causando murcha e posteriormente evoluindo para sintomas mais drásticos (CHALUPOWICZ et al., 2010; GARTEMANN et al., 2008; MELETZUS et al., 1993). Chalupowicz et al. (2012) observaram que muitos vasos não eram infectados com Cmm e que isto poderia explicar a murcha unilateral causada por Cmm, pois segundo os autores isto pode ser visto como uma estratégia do patógeno para manter a planta viva como uma fonte nutricional.

Após a infecção, Cmm pode se multiplicar rapidamente e colonizar a planta sistemicamente via translocações em vasos do xilema (MELETZUS et al., 1993) e posteriormente se espalhar pelos tecidos adjacentes ao xilema.

#### **2.4 Sobrevivência e disseminação**

*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pode permanecer viável em restos culturais incorporados ou não ao solo por meses (FATMI; SCHAAD, 2002). Mas, ao contrário do que se acreditava no passado, sem a associação aos restos culturais, a bactéria não pode sobreviver no solo. Ao que parece a bactéria não tem a capacidade de reduzir o sulfato, sendo esta a fonte mais comum de enxofre encontrada no solo (GARTEMANN et al., 2008). A bactéria do cancro pode permanecer viável por até um ano em sementes infestadas e armazenadas a temperatura ambiente (STRIDER, 1969; TSIANTOS, 1987).

A semente de tomate, além de manter a bactéria viável por longos períodos, também é importante por ser uma fonte primária de infecção (STRIDER, 1969; TSIANTOS, 1987), podendo carregar o patógeno a longas

distâncias e ser responsável por novos surtos em áreas previamente consideradas livre de cancro bacteriano (FATMI; SCHAAD; BOLKAN, 1991; GITAITIS; BEAVER; VOLOUDAKIS, 1991; TSIANTOS, 1987).

A disseminação pode também ocorrer por meio de mudas contaminadas, que geralmente são assintomáticas, uma vez que ocorre uma grande variação no período entre a infecção e o surgimento de sintomas, este período chamado de período de incubação é dependente de fatores como: idade da planta, local da infecção, a suscetibilidade da cultivar e condições ambientais (GLEASON; GITAITIS; RICKER, 1993). Outras formas de dispersão também podem ocorrer via irrigação, práticas culturais (CHANG; RIES; PATAKY, 1991; XU et al., 2012) ou através de infecções de contato (SHARABANI et al., 2012).

No Brasil, a doença é mais importante em tomateiro estaqueado, em que há a necessidade de práticas como desbrotamento e tutoramento das plantas. Em cultivo de tomateiro industrial, no qual não são adotadas estas práticas a incidência da doença é baixa (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

## **2.5 A proteína verde fluorescente - GFP**

Dentre as numerosas aplicações da proteína fluorescente (Green fluorescent protein - GFP), a fusão genética tem sido a mais empregada. Nela o gene que codifica para GFP é fundido com o gene que codifica uma proteína endógena e o resultado é a expressão no organismo de interesse. O resultado ideal é que o organismo mantenha suas funções normais, porém, que seja fluorescente, e com isto pode-se monitorar a sua localização e destino (TSIEN, 1998).

Devido a esta característica de marcação específica das células o gene *gfp* é também chamado de gene repórter, sendo juntamente com as luciferases os mais utilizados em distintas áreas de pesquisa (VIVIANI; BECHARA, 2008).

O GFP, importante marcador de expressão gênica, vem sendo eficientemente utilizado em estudos que envolvem a interação planta patógeno e patógeno antagonista (CHALUPOWICZ et al., 2012; CZAJKOWSKI et al., 2010, 2012). A técnica se torna útil em estudos biológicos por não ser destrutiva, não haver a necessidade de adição de substratos exógenos (CHALFIE et al., 1994), manter as características morfológicas e de patogenicidade dos isolados transformados (CHALUPOWICZ et al., 2012; SIQUEIRA, 2009) e além disso, as células contendo o gene *gfp* podem ser monitoradas usando microscópio de fluorescência.

## 2.6 Controle da doença

Na prática, o que tem sido feito visando o controle de bactérias fitopatogênicas é a redução dos danos por uma combinação de medidas de proteção e controle de forma preventiva (JANSE, 2005). Quando a doença já está instalada na cultura, não há um controle químico eficiente, seja pelo uso de fungicidas cúpricos ou antibióticos. Porém, eles podem proporcionar efeito protetor às plantas de tomate quando combinado com acibenzolar-S-metil (KRONKA, 2004).

Também ainda não existe uma cultivar comercial resistente a Cmm (SEN et al., 2013). Dessa maneira, a principal forma de controle do cancro bacteriano é a prevenção, principalmente por meio do uso de sementes e mudas livres do patógeno.

Tratamentos de sementes podem reduzir a população de Cmm, mas métodos efetivos na erradicação podem afetar a germinação das sementes (FATMI; SCHAAD; BOLKAN, 1991). Entretanto, a maioria dos estudos publicados sobre tratamentos de sementes de tomate na tentativa de erradicação de Cmm são antigos, não há trabalhos recentes nesta linha (LEÓN et al., 2011).

Medidas integradas podem ser adotadas no controle preventivo do cancro, como o plantio em áreas onde não tenham sido cultivadas solanáceas ou cucurbitáceas nos últimos anos; evitar o plantio em épocas com temperatura e umidade favorável ao desenvolvimento da doença; evitar irrigações frequentes e pesadas; eliminar plantas hospedeiras da bactéria; fazer rotação de cultura (LOPES; QUEZADO-DUVAL, 2005). Se a bactéria já está presente na área medidas mais rigorosas como erradicação das plantas infectadas e isolamento dos pontos de infecção podem minimizar a perda de rendimento. Medidas profiláticas também devem ser adotadas na intenção de eliminar as fontes de inóculo, dentre elas a destruição de restos culturais, desinfecção de estruturas e equipamentos e rotação de cultura (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

A prevenção de bactérias fitopatogênicas também é feita através de regulamentos quarentenários que visam, essencialmente, a exclusão da bactéria. No Brasil *Cmm* é uma praga não quarentenária regulamentada – PNQR (BRASIL, 2008).

Apesar de não haver variedade resistente ao cancro, recomenda-se a utilização daquelas que tenham algum nível de resistência, como ‘Príncipe gigante’ e ‘Jumbo’ (tipo Santa Cruz) (KUROZAWA; PAVAN, 2005), ou tolerância, como a ‘Heinz 9992’ e ‘IRAT L3’.

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Muitas são as informações sobre distribuição de bactérias gram-negativas nos tecidos vasculares, porém o conhecimento sobre o movimento vascular característico das bactérias gram-positivas é ainda limitado (CHALUPOWICZ et al., 2012). De forma a contornar esta situação, ferramentas moleculares têm sido utilizadas com êxito no estudo de *Clavibacter michiganensis* subsp.

*michiganensis* (Cmm) *in planta*. A utilização do gene repórter *gfp* permite o monitoramento de Cmm em plantas e sementes de tomate utilizando microscópio de fluorescência. Desta maneira, aumenta-se os conhecimentos sobre o comportamento da bactéria em plantas de tomate, o que contribui para a melhoria das técnicas de detecção e controle.

Sementes e mudas contaminadas com Cmm são os principais veículos de disseminação do cancro bacteriano do tomateiro, porém sementes contaminadas são geralmente assintomáticas e mudas contaminadas podem não manifestar sintomas devido ao período de latência. Para estudos de detecção de bactérias em sementes, transmissão, distribuição, disseminação e testes de sanidade, são necessários a utilização de sementes de tomate internamente contaminadas com Cmm. Desta maneira, métodos eficientes de inoculação internamente de Cmm em sementes de tomate são requeridos, uma vez que a disponibilidade de sementes naturalmente infectadas é limitada.

Estes estudos poderão contribuir para a melhoria dos testes de sanidade de sementes e mudas de tomate, testes de patogenicidade de isolados e indicação de métodos de controle da doença em viveiro e campo, prevenindo a ocorrência e os riscos de expansão da doença nas áreas de produção.

## REFERÊNCIAS

- BERMPOHL, A. et al. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. **Microbiological Research**, Jena, v. 151, n. 4, p. 391-399, Dec. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 41**, de 1 de julho de 2008. Altera os Anexos I e II da Instrução Normativa nº 52, de 20 de novembro de 2007. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 18 maio 2011.
- CARLTON, W. M.; BRAUN, E. J.; GLEASON, M. L. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 6, p. 525-529, June 1998.
- CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994.
- CHALUPOWICZ, L. et al. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 1, p. 23-31, Jan. 2012.
- \_\_\_\_\_. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 3, p. 252-261, Mar. 2010.
- CHANG, R. J.; RIES, S. M.; PATAKY, J. K. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1276-1281, Oct. 1991.
- \_\_\_\_\_. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. **Plant Disease**, Quebec, v. 76, n. 11, p. 1150-1155, Nov. 1992.
- CLAVIBACTER michiganensis* subsp. *michiganensis*. Disponível em: <[http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter\\_m\\_michiganensis/CORBMI\\_ds.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf)>. Acesso em: 5 out. 2012.
- CZAJKOWSKI, R. et al. Studies on the interaction between the biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A30, and blackleg-causing *Dickeya* sp. (biovar 3) in potato (*Solanum tuberosum*). **Plant Pathology**, Honolulu, v. 61, n. 4, p. 677-688, Aug. 2012.

\_\_\_\_\_. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 2, p. 134-142, Feb. 2010.

DAVIS, M. J. et al. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp.nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 34, p. 107-117, 1984.

DEVI, C. S.; SRINIVASAN, V. M. Studies on various atmospheric microorganisms affecting the plant tissue culture explants. **American Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 1, n. 2, p. 205-209, 2006.

DREIER, J.; BERMPHOHL, A.; EICHENLAUB, R. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 4, p. 462-468, Apr. 1995.

DREIER, J.; MELETZUS, D.; EICHENLAUB, R. Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v. 10, n. 2, p. 195-206, Mar. 1997.

EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K. The *Clavibacter michiganensis* subspecies, molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 7.1-7.20, 2011.

EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K. H.; BURGER, A. *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Plant-associated bacteria**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 385-421.

FATMI, F.; SCHAAD, N. W. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 51, n. 2, p. 149-154, Apr. 2002.

FATMI, M.; SCHAAD, N. W. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 121-126, 1988.

FATMI, M.; SCHAAD, N. W.; BOLKAN, H. A. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. **Plant Disease**, Quebec, v. 75, n. 4, p. 383-385, Apr. 1991.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Preliminary 2011 data now available**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 20 maio 2013.

GARTEMANN, K. H. et al. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 106, n. 2/3, p. 179-191, Dec. 2003.

\_\_\_\_\_. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, Amsterdam, v. 190, n. 6, p. 2138-2149, Mar. 2008.

GITAITIS, R. D.; BEAVER, R. W.; VOLOUDAKIS, A. E. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. **Plant Disease**, Quebec, v. 75, n. 8, p. 834-838, Aug. 1991.

GLEASON, M. L.; GITAITIS, R. D.; RICKER, M. D. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. **Plant Disease**, Quebec, v. 77, n. 11, p. 1069-1076, Nov. 1993.

HADAS, R. et al. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 54, n. 5, p. 643-649, Oct. 2005.

JAHN, H. et al. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. **Environmental Microbiology**, Dordrecht, v. 1, n. 2, p. 113-118, 1999.

JANSE, J. D. **Phytopathology: principles and practice**. Oxfordshire: CABI, 2005. 360 p.

KRONKA, A. Z. **Cancro bacteriano do tomateiro: metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle**. 2004. 79 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-19072004-165500/>>. Acesso em: 20 maio 2013.



KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 607-626.

LEÓN, L. et al. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. **Plant Disease**, Quebec, v. 95, n. 11, p. 1328-1338, Nov. 2011.

LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Doenças bacterianas. In: LOPES, C. A.; AVILA, A. C. (Ed.). **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2005. p. 53-74.

LUO, L. X. et al. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 57, n. 2, p. 332-337, Apr. 2008.

MELETZUS, D. et al. Evidence for plasmid encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* NCPPB382. **Journal of Bacteriology**, Amsterdam, v. 175, n. 7, p. 2131-2136, Apr. 1993.

PARK, Y. H. et al. Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by sequencing of 5s ribosomal RNA. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 307-313, Mar./Sept. 1993.

PELISSARI, F. M.; RONA, M. S. S.; MATIOLI, G. O licopeno e suas contribuições na prevenção de doenças. **Arquivos do Mudi**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 5-11, jan./abr. 2008.

SEN, Y. et al. Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. **Euphytica**, Wageningen, v. 190, n. 2, p. 309-317, Apr. 2013.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732004000200009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732004000200009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 24 jun. 2013.

SHARABANI, G. et al. The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 62, n. 3, p. 578-586, June 2012.

SHIRAKAWA, T.; SASAKI, T.; OZAKI, K. Ecology and control of tomato bacterial canker and detection methods of its pathogen. **Japan International Research Center for Agricultural Sciences**, Tokyo, v. 25, n. 1, p. 27-32, Jan. 1991.

SIQUEIRA, C. S. **Transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores GFP e DsRed e patogenicidade dos transformados em sementes de milho**. 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

STRIDER, D. L. **Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense***: a literature review and bibliography. Raleigh: NCAES, 1969. 110 p. (North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 193).

TEBALDI, N. D.; SOUZA, R. M.; MACHADO, J. C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 56-58, jan./fev. 2007.

TSIANTOS, J. Transmission of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 119, p. 142-146, 1987.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 67, p. 509-544, June 1998.

VIVIANI, V. R.; BECHARA, E. J. H. Um prêmio nobel por uma proteína brilhante. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 30, n. 30, p. 24-26, nov. 2008.

XU, X. et al. Bioluminescent imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 12, p. 3978-3988, June 2010.

\_\_\_\_\_. Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 2, p. 177-184, Feb. 2012.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS****ARTIGO 1****ARTIGO 1: Studies on the colonization of axenically grown tomato plants by a GFP-tagged strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Prepared in accordance with the European Journal of Plant Pathology  
(Preliminary version - Submitted)

Flávia M. Vieira Lelis<sup>1,2</sup>, Robert Czajkowski<sup>1\*</sup>, Ricardo Magela de Souza<sup>2</sup>, Jan M. van der Wolf<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Plant Research International, P.O. Box 16, 6700 AB, Wageningen, The Netherlands

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras, CP 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

\* Current address: Department of Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk, Kladki 24, 80-822 Gdansk, Poland

\*\* Corresponding author: Jan M. van der Wolf, Plant Research International, P.O. Box 69, 6700 AB Wageningen, the Netherlands (Phone + 31.317.480598, Fax +31.317.418094, E-mail: jan.vanderwolf@wur.nl)

**Studies on the colonization of axenically grown tomato plants by a GFP-tagged strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Flávia M. Vieira Lelis<sup>1,2</sup>, Robert Czajkowski<sup>1\*</sup>, Ricardo Magela de Souza<sup>2</sup>, Jan M. van der Wolf<sup>1\*\*</sup>

**Abstract** In this study, colonization and disease development of axenically-grown tomato plants by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), the causative agent of bacterial wilt and canker, was investigated. For this, a spontaneous rifampicin resistant strain of Cmm was tagged with a marker that expressed a green fluorescent protein (GFP) in a stable way and which possessed a similar virulence to the parental strain. *In vitro* plants were drop-inoculated at the stem base and the population dynamics was determined by dilution pour-plating in a selective medium. At 3 h after inoculation, Cmm was already present in low densities in roots, stems and leaves. At 16 dpi, Cmm was found throughout the entire plant in high densities of ca.  $10^{10}$  cfu g<sup>-1</sup>. The *in vitro* plants developed symptoms typical for Cmm such as canker, wilting and stunting. The presence of Cmm in vascular and parenchymatic tissue of plants was confirmed by epifluorescence stereo- and confocal laser scanning microscopy. This study showed that *in vitro* tomato plants can be effectively used for detailed studies on interactions between Cmm and its host, using a GFP-tagged strain of the pathogen.

**Keywords** bacterial canker, green fluorescent protein, *in vitro* plant, confocal laser scanning microscopy, epifluorescence stereomicroscopy

## Introduction

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (1984) (Cmm), a Gram-positive bacterium, is the causal organism of bacterial wilt and canker, a highly damaging disease of tomato (*Solanum lycopersicum*, syn. *Lycopersicon esculentum* Mill). Cmm was first described in Michigan (USA), but currently there are records from most tomato production areas in the world. The pathogen is considered a quarantine organism in many countries, including the 'European and Mediterranean Plant Protection Organization' (EPPO) region (Eichenlaub et al. 2006). Economic losses are due to crop and yield losses but also due to statutory control, strict hygiene measures, eradication campaigns, testing and claims (Anonymous 1995).

Cmm can enter tomato plants through roots, natural openings and wounds created during clipping and pruning (Chalupowicz et al. 2012; Xu et al. 2012). Upon infection, Cmm can multiply rapidly and colonize plants systemically via translocations in xylem vessels (Meletzus et al. 1993). After stem inoculation, xylem vessels in the entire plants were occupied with Cmm cells within 48 hours post inoculation (Benhamou 1991).

Plant wilting is the most prevalent symptom found in association with Cmm infections, but the pathogen can also cause canker on stems, petioles and leaf midribs, fire blight of foliage, vascular discoloration, formation of adventitious roots on stem, bacterial ooze from infected parts and bird's-eye spots in fruit (Strider 1969). Once fruit is systemically colonized through the vascular system, seed can become infected (Strider 1969).

The use of infected seed is an important factor in long distance dispersal and can be responsible for unexpected outbreaks in areas previously regarded free of bacterial canker (Gitaitis et al. 1991; Fatmi et al. 1991; Tsiantos 1987). During

seed storage, the bacteria can survive in the seed coat for several years (Kado 2010).

Plants can be latently infected for long periods and contribute to the unnoticed spread of the pathogen in or between crops. The period of latency is dependent on the environmental conditions (Xu et al. 2012; Chang et al. 1992), the aggressiveness of the pathogen (Dreier et al. 1997) and the susceptibility of the cultivar (Sen et al. 2013; Chang et al. 1992). In experiments in which a rifampicin-resistant Cmm strain was used, the bacteria were found in samples of symptomless tomato seedlings 9-13 days after the first clipping, but seedlings only showed symptoms 31-40 days after the first clipping (Chang et al. 1991). In another study, Cmm cells were detected within plant stems 2 to 4 days after inoculation of plants by clipping leaves with contaminated scissors, but plants became symptomatic 11-13 days after inoculation (Gitaitis et al. 1991).

Dissemination of Cmm can occur via irrigation water (Xu et al. 2012), via crop handling such as during clipping and pruning (Chang et al. 1991), disbudding and defoliation (Kawaguchi et al. 2010) or via contact infections when plants are touched while wet with guttation fluid (Sharabani et al. 2012). In hydroponically grown tomatoes, Cmm can also leak from the roots of infected plants, resulting in dissemination of Cmm via the nutrient solution and infection of roots from plants initially pathogen-free (Huang and Tu 2001).

In the management of bacterial canker, the availability of suitable methods for monitoring the pathogen, also in a symptomless crop, is vital. They depend on an effective sampling strategy and a reliable detection method (López et al. 2005). In current EPPO protocols for detection of quarantine bacteria, isolation and a full identification are necessary, including fulfilling Koch's postulates. This implies that the virulence of suspected isolates should be proven. For Cmm, tomato seeds are sown and grown in the glasshouse for 2-3 weeks (Anonymous 2011) and plants from Cmm inoculated seeds are visually checked for

symptoms. But this method is time-consuming and requires expensive biosafety glasshouse facilities. After 3-5 weeks, a composite sample of 5 stems is analyzed for the presence of Cmm by dilution-plating extract on a semi-selective medium and by TaqMan assay using extracted DNA from the plant extract.

To improve sampling procedures, knowledge of the distribution of the pathogen in a symptomless crop is required. Recently, bioluminescent (using *lux* gene) (Xu et al. 2012) and green fluorescent protein (GFP) tagged strains of Cmm (Chalupowicz et al. 2012) have been generated to study colonization and movement of Cmm inside tomato plants. The use of a highly sensitive camera system allowed nondestructive monitoring of the colonization of Cmm in plants and plant tissues (Xu et al. 2012). The technique using luciferase as a reporter limits the detection to the living bacteria only as the enzyme activity depends directly on metabolic activity of the cells (Unge et al. 1999). Non-destructive monitoring *in planta* can also be done with GFP-labeled Cmm cells. The use of GFP-expressing Cmm cells is very useful for detailed studies on plant colonization as single cells can be observed in plant tissues using microscopic techniques (Chalupowicz et al. 2012).

In this study, a stable GFP-expressing transformant of a Cmm strain was generated to study the potential use of axenically grown tomato plants in pathogenicity assays. *In vitro* plants are often grown under conditions highly favourable for rapid growth of Cmm, such as temperature at 25°C, high humidity at ca. 70% and high nutrient levels (Subbarayan et al. 2010; Devi and Srinivasan 2006). We investigated symptom development after root inoculation and studied the population dynamics of the pathogen. We also evaluated different systems to monitor Cmm infections *in planta*, including the use of confocal laser scanning microscopy and the use of a UV binocular. Our results indicate that these plants could be used efficiently to determine the virulence of

Cmm strains for studies on plant pathogen interactions and as a tool for tomato resistance breeding.

## Materials and methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strain IPO3356 (Culture Collection of Plant Research International), highly virulent and rifampicin resistant (Rif<sup>r</sup>), was grown on yeast dextrose carbonate (YDC) medium (Duchefa Biochemie, The Netherlands) or tryptone broth with yeast extract (TBY) (per liter: tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, pH 7.5 and agar 15 g) at 25°C.

*Escherichia coli* JM109 carrying the plasmid pK2-22-*gfp* (Chalupowicz et al. 2012) was grown at 28°C on TBY supplemented with kanamycin (Sigma) to a final concentration of 50 µg ml<sup>-1</sup>.

The Cmm GFP transformants were grown at 28°C in Luria Bertani (LB) agar media (per liter: tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g), supplemented with kanamycin (Sigma) to a final concentration of 50 µg ml<sup>-1</sup> and, in tests with Cmm-GFP *in planta*, additionally supplemented with cycloheximide (Sigma Chemical, St. Louis) to a final concentration of 200 µg ml<sup>-1</sup> to prevent fungal growth. If indicated, Cmm strains were grown on the semi-selective medium SCM (Fatmi and Schaad 1988) at 25°C for 72 h. A selected GFP-tagged transformant used in this study was designated IPO3525.



### Generation of GFP-tagged Cmm strain

The pK2-22-*gfp* plasmid was introduced into the bacterial cells by electroporation, following the protocol of Kirchner et al. (2001) with minor modifications. For preparation of competent cells, Cmm IPO3356 grown in TBY medium was collected during the early growth phase and inoculated into 250 ml of TBY medium. The bacterium was grown overnight at 25°C ±2°C with shaking (120 rpm). Subsequently, 218 ml of TBY medium was added to the overnight bacterial culture and incubated for approximately 2 h under the same conditions to reach an OD<sub>600</sub> of 0.6 in a Biophotometer (Eppendorf). Thirty-two ml of a 20% (wt vol<sup>-1</sup>) glycine (Sigma Chemical, St. Louis) stock solution was added to a final concentration of 2.5% (wt vol<sup>-1</sup>) and the culture was incubated for one additional hour under the same conditions. Cmm cells were harvested by centrifugation (8500 × g, 10 min) (Sorvall<sup>®</sup> RC 26 plus) at 4°C and the pellet was subsequently washed with 40 ml of cold distilled water, twice with 20 ml of distilled water, and twice with 10% (v/v) glycerol (Sigma Chemical, St. Louis) at ambient temperature (ca 25°C). The resulting bacterial pellet was resuspended in 1 ml of 15% (v/v) glycerol.

For electroporation, 100 µl of the freshly prepared Cmm competent cells were mixed with 5 µl (approximately 100 ng µl<sup>-1</sup>) of plasmid pK2-22-*gfp*. Electroporation was performed in 1 mm electroporation cuvettes (Eurogentec, Belgium), with 25 µF, 2.5 kV cm<sup>-1</sup>, and 400 Ω. After the pulse, cells were immediately resuspended in 0.4 ml of LB broth and incubated for 2 h at 28°C ± 2°C, with agitation (300 rpm). Cells were plated onto LB agar medium containing kanamycin (50 µg ml<sup>-1</sup>) and incubated for 7 days at 28°C ± 1°C. To confirm the identity of the obtained Cmm GFP transformants, bacteria were streaked onto SCM semi-selective medium.

### Relative growth of the GFP-tagged Cmm

An overnight Cmm bacterial culture in TBY (ca.  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>) was diluted 50 times in the same medium and grown for 24 h at  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  with shaking (120 rpm). To determine the bacterial growth rate, at 12 time points duplicate 1 ml samples were collected, and the OD<sub>600</sub> measured using a Biophotometer (Eppendorf).

### Fluorescence measurement

GFP-tagged Cmm strains were grown in a TBY broth supplemented with kanamycin ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) at  $25^\circ\text{C}$  for 48 h with shaking (120 rpm). The bacterial cultures were diluted in the TBY broth to a concentration of approximately  $10^9$  cfu ml<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub>=1.0). Under sterile conditions, aliquots of 200  $\mu\text{l}$  were sampled and the fluorescence intensity (FI) was measured using an automatic microplate reader (Infinite M200 PRO-TECAN, Switzerland) (Ex 485 nm/Em 535 nm). TBY medium was used as negative control.

### Growth of *in vitro* tomato plants

Seeds of tomato cultivar 'Moneymaker' were sterilized by consecutive immersions in 70% ethanol for two minutes, sterile distilled water, 1% NaOCl (Sigma) for 20 minutes and finally washed four times in sterile distilled water. Surface-sterilized tomato seeds were sown on a germination medium (GEM) (per liter: MS  $\frac{1}{2}$  concentration 2.2 g, sucrose 10 g, daishin agar 8 g, pH 5.8) and incubated for 3 days initially at  $4^\circ\text{C}$  and then for approximately 2 weeks in a

growth chamber (Technisch Buro I.K.S.b.v, Leerdam, The Netherlands) at 25°C, a relative humidity of 70% ( $\pm$  20%), and a 16 h/ 8 h day/ night photoperiod. Cotyledonary explants obtained from seedlings were transferred to rooting medium (MS30B5) (per liter: MS salts at 4.3 g (Murashige and Skoog 1962), vitamins B5 at 112 g, sucrose at 30 g, micro agar at 8 g, pH 5.8). New explants were transferred to fresh medium every 2 weeks until sufficient plants for the assay were obtained.

#### Inoculation of *in vitro* plants

For inoculation of *in vitro* plants with Cmm, three different methods were compared. *In vitro* tomato plants of height 3-4 cm, grown for 2 weeks on MS30B5 medium, were removed from the medium, roots were cut with scissors to half their length and dipped for 15 minutes in a suspension of Cmm IPO3525 with a density of  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> (van Steekelenburg 1985). Alternatively, stems were punctured with a syringe needle dipped in a bacterial suspension with a density of  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> or 100  $\mu$ l of the suspension was pipetted into the interspace between stem base and agar medium. Plants were placed in a growth chamber (Technisch Buro I.K.S.b.v) at a temperature of 25°C ( $\pm$  1°C), with a relative humidity 70% ( $\pm$  20%), and a photoperiod of 16 h. All inoculation methods resulted in plants with symptoms characteristic of the disease. The inoculation at the interspace between stem base and agar medium was easier to conduct and was used in further experiments, and referred to as drop-inoculation.

To study the population dynamics in the *in vitro* plants, 100  $\mu$ l of bacterial suspensions with a density of  $10^5$  or  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> were used, 109 plants were inoculated in total. Control plants were treated similarly with sterile demineralized water instead of the bacterial suspension.

### Stability of the GFP-expression by the transformant

The stability of the GFP-expression by the transformant was evaluated *in vitro* and *in planta*. For *in vitro* experiments, the GFP-transformant was grown in 40 ml of LB without supplemented antibiotics at 25°C for 48 h with shaking (120 rpm). The bacterial cultures were diluted in fresh LB broth to a concentration of approximately  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub>=0.1). One hundred µl of the diluted bacterial culture was collected after 48 h and transferred to 4.9 ml of fresh LB medium. This was done repeatedly ten times in total. Serial dilutions of bacterial cultures were plated in duplicate on LB agar plates at each transfer. The total number of GFP-positive and GFP-negative bacterial colonies were counted and the percentage of GFP positive colonies was calculated. The experiment was repeated one time with the same set up.

For *in planta* experiments, plants were sampled at different time points after inoculation (0, 8 and 16 days post inoculation - dpi). Plants were removed from the medium, sterilized by spraying with 70% ethanol and washed in sterile distilled water. The fresh weight of leaves, stem and roots were measured. Plant parts were macerated with sterile distilled water (2 ml g<sup>-1</sup> of tissue) and analyzed by pour plating. For this, 100 µl of the undiluted and seven ten-fold serial diluted macerates were placed in a well of a sterile 24-wells titer plates. Three hundred µl of melted LB medium, cooled down to a temperature of 50°C, and supplemented with kanamycin (50 µg ml<sup>-1</sup>), rifampicin (25 µg ml<sup>-1</sup>), or without antibiotics per well was added, while agitating the microplates. After the medium had solidified, plates were incubated at 28°C for four days. The number of GFP-positive and GFP-negative bacterial colonies per gram of tissue were determined using epifluorescence stereomicroscopy. For a selection of colonies,

the fluorescence intensity was measured using an automatic microplate reader as described above, using IPO3356 and IPO3525 as negative and positive controls.

#### Identification of GFP fluorescent bacteria by Cmm-specific real time PCR

GFP-positive bacterial colonies from roots, stems and leaves of plant material were streaked onto LB medium with kanamycin. Colonies were randomly chosen and analyzed in a TaqMan assay, based on the RZ\_Ptssk primers (RZ\_Ptssk10: 5'-GGG GCC GAA GGT GCT GGT G-3'; RZ\_Ptssk11: 5'-CGT CGC CCG CCC GCT G-3'; RZ\_Ptssk12: 5'-Fam-TGG TCG TCC /ZEN/TCG GCG CC/IABkFQ -3') (Sen et al., 2013). Cells were collected from a fluorescent colony using a sterile toothpick and resuspended in 50 µl of Milli-Q water. The suspension was boiled for 5 min at 95°C and put on ice for 1 to 2 min. The reaction mixture with a final volume of 25 µl included 12.5 µl Takara mix, 0.5 µl Rox II, 2 µl of combined F/R primer (4 µM) and probe (1 µM) and 10 µl of the supernatant of the boiled suspension. Reactions were performed on an ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem). The thermocycling conditions were 2 min at 95°C, and 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min.

#### Microscopic study

*Sample preparation:* Tomato plants, drop-inoculated with GFP-tagged bacteria, were removed from the MS30B5 medium using a sterile handle. The plant material was sterilized with ethanol and washed with water as described previously. Twenty five plants in total were used in this experiment.

*Epifluorescence stereomicroscopy (ESM).* At 21 dpi, plants were removed from the MS30B5 medium and each root was cut into fragments of 1.5 to 2 cm long.

Detached leaves were used without cutting or after making a transverse section in the middle of the leaf. Root fragments and leaves or leaf fragments were embedded in TBY medium supplemented with kanamycin (Sigma) to a final concentration of  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  and incubated for 48 hours at  $28^{\circ}\text{C}$ . At 31 dpi plants were removed from the MS30B5 medium and analyzed immediately after harvest (fresh plants). Stems, leaves and roots were examined for the presence of a GFP signal under 495 nm blue light using an epifluorescence stereo microscope (Leica Wild M32 FL4) equipped with a mercury high pressure photo-optic lamp (Leica Hg 50W/AC) and GFP plus filter.

*Confocal laser scanning microscopy (CLSM).* *In vitro* tomato plants after 1 and 23 dpi were removed from the MS medium and washed in sterile distilled water. Roots and stems were fragmented with a razor blade. The sections were placed on a microscope slide, sterile distilled water was added and a coverslip placed on top. Transverse and longitudinal sections of leaves were used. Roots were cut in fragments of 1.5 to 2 cm long and stems were cut in transverse sections of 0.1 cm. Photographs were taken with a Leica Digital System (Leica) connected to a confocal laser scanning microscope (Leica DM5500Q), 467 images were analyzed. The experiment was repeated once.

#### Experimental design and statistical analysis

The experiments were performed in completely randomized designs (CRD) with three replicates for experiment 1 and five replicates for experiment 2. In the experiment 1 the factorial threefold consisted of: factor 1 inoculation, with five levels; factor 2 time (days post inoculation), with two levels; and factor 3 plant part, with three levels. In the experiment 2 the factorial threefold consisted of: factor 1 inoculation, with three levels; factor 2 time (days post inoculation), with three levels; and factor 3 plant part, with three levels.

Statistical analysis were performed using the program SISVAR (Ferreira 2011).

## Results

### Cmm transformation and maintenance of GFP *in vitro*

Transformation of Cmm strain IPO3356 with plasmid pK2-22-*gfp* resulted in two transformants six days after transformation, of which one colony showed a high fluorescence. The identity was confirmed in a TaqMan assay and by growth on SCM, on which colonies exhibited a dark color and a texture typical for Cmm. The presence of the plasmid was confirmed by plasmid DNA purification and agarose gel electrophoresis. The GFP-tagged strain of IPO3356 was designated IPO3525.

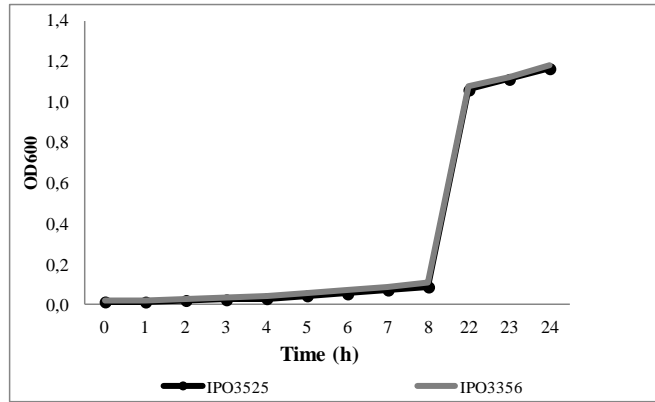
The stability of the transformant under non-selective conditions was tested *in vitro* by transferring colonies to fresh LB medium without kanamycin every 2 days. The percentage of fluorescent colonies decreased gradually, but after a period of 18 days, 85.3% of the colonies of strain IPO3525 still fluoresced. In fluorometry, the transformant had a relative fluorescence intensity (FI) of 10.515 compared to an intensity of 2.450 FI for the parental strain. The presence of the plasmid or the expression of the GFP protein did not influence growth rate *in vitro* and growth of the transformant was similar to the parental wild-type strain (Fig 1).

### Symptom development

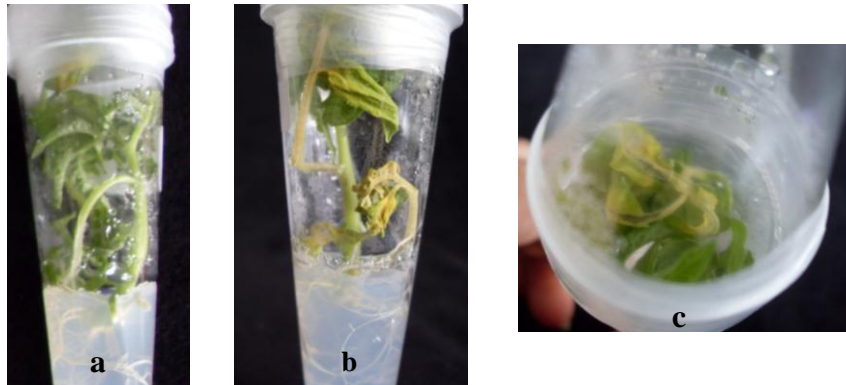
Bacterial densities of  $10^5$  cfu ml<sup>-1</sup> and  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> were used in experiment 1 and a density of  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> was used in experiment 2. In both experiments, the first

symptoms were observed at 6 dpi in plants inoculated with a high density of  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> (Fig.2). Symptom development started with yellowing of the lower leaves, followed by black spots, blackening of the midribs and veins, decay of the petiole, wilting, stem canker and development of adventitious roots (Figures 3 and 4). Occasionally bacterial exudate was observed at the base of the stem. At 8 dpi, on average 81.8% of the plants showed symptoms; at this time also most plants inoculated with a density of  $10^5$  cfu ml<sup>-1</sup> were symptomatic. At 16 dpi, all inoculated plants showed symptoms. Symptom development for the GFP-tagged strain and its wild type parental strain was largely similar. The water-inoculated plants did not show any symptoms during the course of the experiment.





**Fig 1** Growth of the GFP-tagged strain *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* IPO3525 and its wild type parental strain IPO3356 in TBY at 25°C, as determined by measuring the OD<sub>600</sub>



**Fig 2** Symptoms of *in vitro* tomato plants at 6 days after drop-inoculation with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with a concentration of  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>. **a** Water-inoculated plant (negative control). **b** Plant inoculated with a GFP-tagged strain of IPO3356 (IPO3525). **c** Plant drop-inoculated with wild type strain IPO3356. **b** Yellowing of the lower leaves and petiole. **c** Blackening of petiole



**Fig 3** Symptoms of *in vitro* tomato plants at 8 days after drop-inoculation with a concentration of  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> of a wild type strain IPO3356 (**b,e,h**) of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* or a GFP-tagged strain of IPO3356 (IPO3525) (**c,f,i**). **a, d** and **g** Water-inoculated plants (negative control). Symptom expression in plants inoculated with the GFP-tagged strain and the parental strain was largely similar. **b** Black spots in the lower leaves. **c** Blackening of the midribs and veins. **e** Adventitious roots on stem. **f** Yellowing of the lower leaves, decay of the petiole. **h** Adventitious roots, wilt. **h** and **i** Blackening of petiole, midrib and veins. Symptomatic plants from experiment 1 (**a-f**) and from experiment 2 (**g-i**)



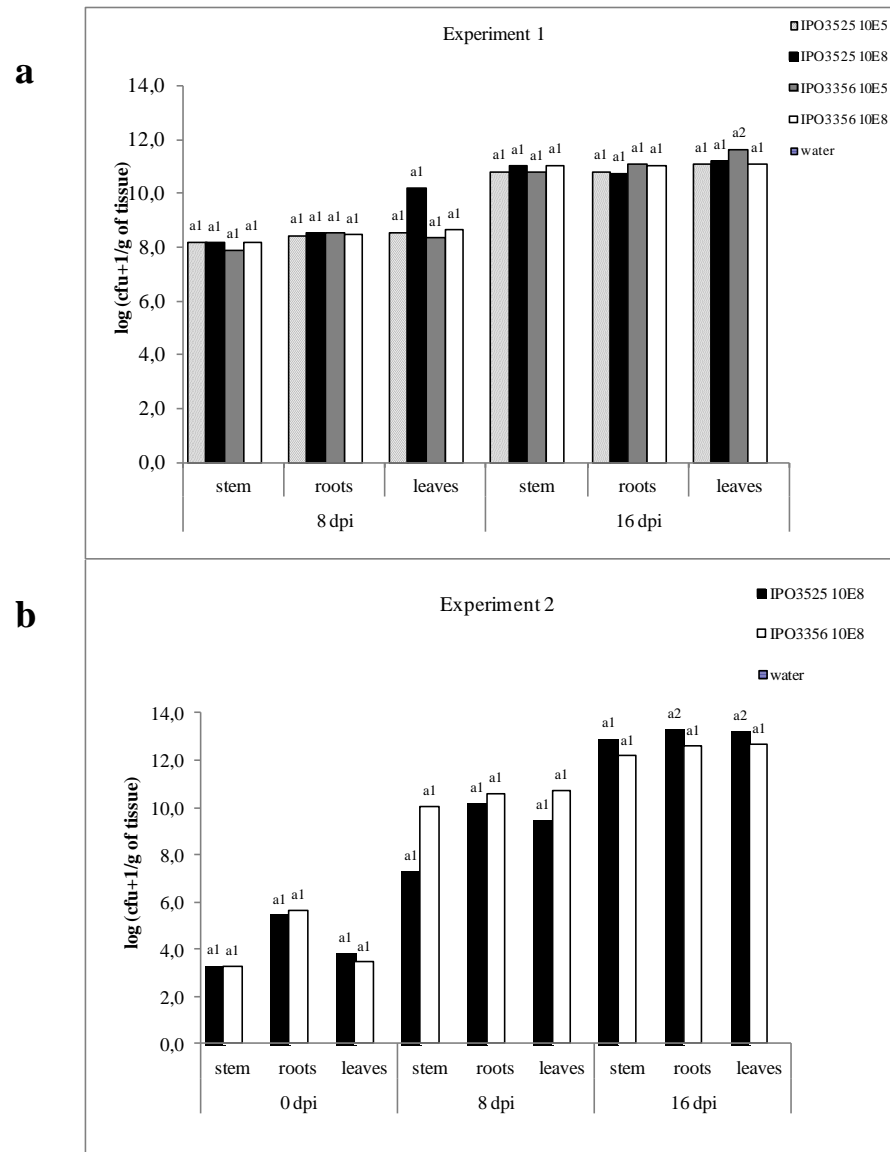
**Fig 4** Symptoms of *in vitro* tomato plants at 16 days after drop-inoculation with a concentration of  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> of a wild type strain IPO3356 (**b,e,h**) of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* or a GFP-tagged strain of IPO3356 (IPO3525) (**c,f,i**). **a, d** and **g** Water-inoculated plants (negative control). Symptom expression in plants inoculated with the GFP-tagged strain and the parental strain was largely similar. **b** Adventitious roots on stems, yellow leaves. **b, c** and **f** Blackening of petiole, midrib and veins. **c** and **e** Wilt. **h** Canker and bacterial exudate at stem base. **i** Adventitious roots on stem. Plants from experiment 1 (**a-f**) and from experiment 2 (**g-i**)

### Plant colonization and population dynamics

The population dynamics of Cmm was studied for both the GFP-tagged and the parental strain in the *in vitro* plants. In the first experiment, at approximately 3 h after inoculation (0 dpi) roots were already colonized; for the low inoculation density at a level of ca.  $10^1$  cfu g<sup>-1</sup> and for the high inoculation densities at a level of ca.  $10^4$  cfu g<sup>-1</sup> plant tissue. In this experiment at 0 dpi only roots were analyzed as the bacteria would not be present in stems and leaves right after inoculation (data not shown). At 8 dpi, Cmm was present in roots, stems and leaves at a level of ca.  $10^8$  cfu g<sup>-1</sup> and at 16 dpi at a level of  $10^{11}$  cfu g<sup>-1</sup> of plant tissue (Fig 5a). In experiment 2 (Fig. 5b), only the high bacterial densities were used. At 3 h after inoculation (0 dpi) we found the bacteria in roots, stems and leaves; for stems and leaves at densities of ca.  $10^3$  and for roots at densities of ca.  $10^5$  cfu g<sup>-1</sup>. At 8 dpi, densities in the different tissues were largely similar and were on average  $10^{10}$  cfu g<sup>-1</sup> for individual plants. In the period between 8 and 16 dpi, populations had increased a 100-fold to densities of on average  $10^{12}$  cfu g<sup>-1</sup>. Results for GFP tagged strain IPO3525 and the parental wild type strain IPO3356 were largely similar at 0 and 8 dpi. There were differences between plant parts at 16 dpi for strain IPO3356 concentration  $10^5$  in the experiment 1 (Fig. 5a) and for IPO3525 in the experiment 2 (Fig 5b). No saprophytic bacteria were recovered, indicating that the *in vitro* plants did not harbor bacteria that could be cultivated on LB medium.

### Stability of the GFP-expression by the transformants

A stable expression of GFP by the transformant was also found in plants. All colonies grown from the IPO3525 inoculated plants showed a high fluorescence



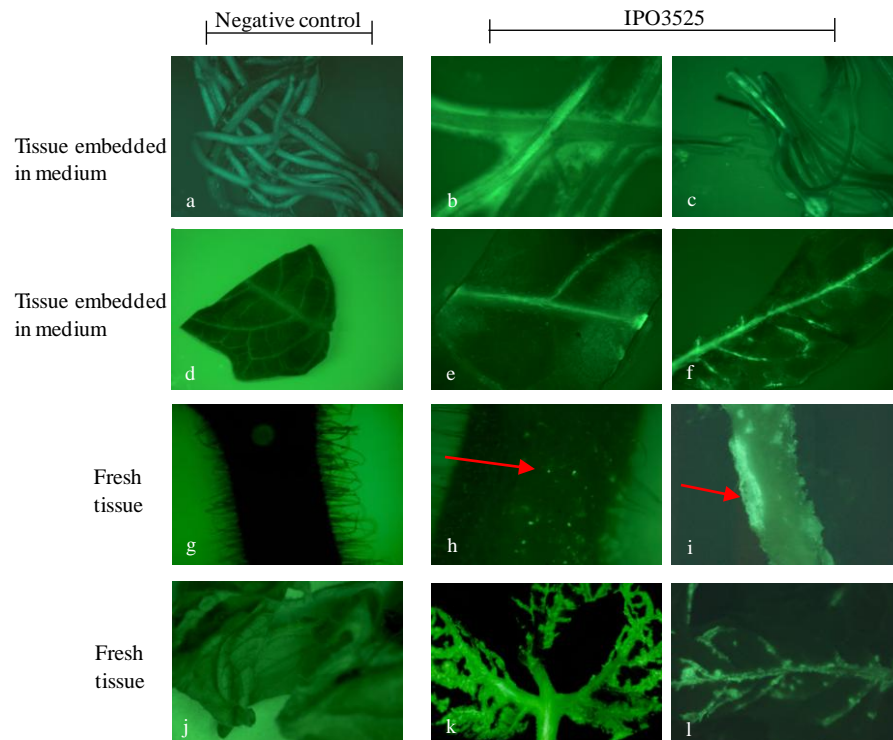
**Fig 5** Colonization of 12-days old *in vitro* tomato plants with the GFP-tagged strain Cmm IPO3525 or its parental wild type strain IPO3356. Plants were drop-inoculated at the interface between stem base and MS medium. **a** Inoculation with two concentrations of inoculum,  $10^5$  or  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> of bacterial suspension (experiment 1). **b** Inoculation using  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> of bacterial suspension (experiment 2). Roots, stems and leaves were analyzed at 0, 8 and 16 dpi. Means followed by the same letter do not differ significantly based on Tukey test ( $p < 0.05$ )

under the epifluorescence stereomicroscope and in fluorometry the fluorescence intensity was largely similar to the strain (IPO3525) used for inoculation of the plants (results not shown).

### Microscopic studies

Systemic colonization of *in vitro* plants by the GFP-tagged Cmm strain was confirmed by epifluorescence stereo microscopy (ESM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). At 21 dpi, plant parts were sectioned, and root fragments and leaf or leaf fragments were disinfected and embedded in TBV medium and incubated for 48 hours at 28°C (Figures 6a-f). Incubation of the disinfected roots frequently resulted in a massive growth of Cmm, not only in root tissue but also as bacterial slime in the medium, masking the signal generated by bacteria in the root tissue (Fig. 6b). Incidentally, roots were found without external bacterial growth, in which a strong signal was found in the cortex, more than in the stele (Fig. 6c). In leaves, a strong signal was found in the midrib, veins and leaf margins (Figures 6e and f), indicating a translocation through and colonization of the vascular system.

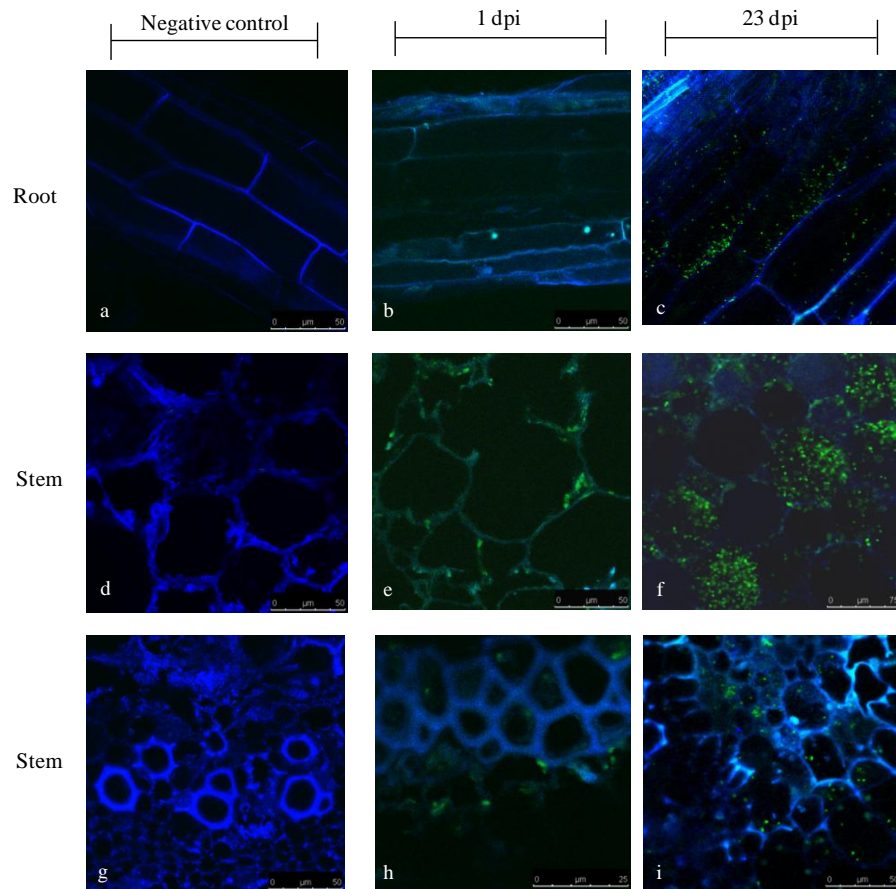
After 31 dpi, fresh root, stem sections and leaves were analyzed without embedding and prior incubation (Figures 6g-l). On stems taken from symptomatic plants, small fluorescent spots were observed (Fig. 6h). Stem cankers exhibited a high fluorescent signal all over the symptomatic tissue, indicating high densities of bacteria (Fig. 6i). In leaves, a strong signal was found, mainly in midrib and larger lateral veins, but occasionally also in the interveinal leaf tissue (Figures 6k and l). No signal could be observed in stems, leaves and roots of mock-inoculated tomato plants.



**Fig 6** Epifluorescence stereo microscopy of roots, stems and leaves of tomato plants inoculated with a green fluorescent protein (GFP)-tagged strain of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (IPO3525) or mock-inoculated. **a to f** Plants with 21 dpi were sectioned, and root fragments and leaf or leaf fragments were embedded in TBY medium and incubated for 48 hours at 28°C prior to analysis. **g to l** At 31 dpi, sections of stems, leaves and roots were analyzed without prior incubation in TBY medium (Fresh tissue). **a, d, g and j** Sections of roots, stems or leaves from water-inoculated plants. **b, c, e, f, h, i, k and l** Sections roots, leaves and stems of tomato plants inoculated with IPO3525

CLSM enabled detailed studies of individual GFP-tagged Cmm cells in infected plant tissues. At 1 dpi, in longitudinal sections of roots, only low densities of Cmm were found in parenchyma cells of the cortex region, but at 23 dpi higher densities were observed (Figures 7b and c). At 1 dpi, in transections of the stem, individual cells or clusters of green fluorescent cells were observed in the intercellular spaces of the stem cortex (Fig. 7e). At 23 dpi intra- and intercellular colonization of cortex cells of stems with high densities of fluorescent cells was found (Fig. 7f). Single cells were frequently visible in stem xylem vessels, although incidentally clusters of cells seemed to be present at the walls of the xylem vessels (Fig. 7h). At 23 dpi these clusters of cells could be observed more frequently (Fig. 7i). Cmm was absent in tissues of roots and stems taken from water-inoculated plants (Figures 7a, d and g).





**Fig 7** Colonization of fresh tissues of *in vitro* tomato plants with a green fluorescent protein (GFP)-tagged strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (IPO3525) visualized by confocal laser scanning microscopy at 1 and 23 dpi. **a, d** and **g** Mock-inoculated plants (negative control). **a, b** and **c** Cross-sections of the cortex region of roots with parenchyma cells. **d, e** and **f** Cross-sections of the stem cortex with parenchyma cells. **g, h** and **i** Cross-sections of the vascular tissue of stems with xylem vessels

## Discussion

This study shows that axenically-grown tomato plants can be successfully used for studies on interactions of plants with Cmm. *In vitro* tomato plants of cultivar ‘Moneymaker’ were highly susceptible to Cmm, resulting in rapid colonization and disease development. By using a GFP-tagged strain of Cmm, the pathogen can be visualized in plant tissues with microscopic techniques. As far as we know, this is the first time that *in vitro* tomato plants have been used in Cmm studies on plant colonization and disease development.

In replicated experiments, inoculation of plants at the interface between the stem base and MS medium resulted in a rapid systemic colonization of the *in vitro* tomato plants. Three hours after root inoculation, bacteria were already found in roots, stems and leaves. The pathogen requires wounds or natural openings to enter plants and, as stems were intact, it is assumed that the Cmm enters the plants via natural openings in the roots formed during lateral root formation, as has also been found for other plant pathogenic bacteria such as *Dickeya* spp. in potato (Czajkowski et al. 2010) and *Ralstonia solanacearum* in tomato (Tans-Kersten et al. 2001).

Our results further suggest that the pathogen, by root pressure and transpiration of plants, moves quickly upwards through xylem vessels.

The rate of translocation of Cmm in *in vitro* tomato plants can largely vary. A rapid translocation was also found by Gitaitis et al. (1991) studying movement of Cmm in glasshouse grown tomatoes kept at a temperature ranging from 20 - 38°C. They showed that the pathogen moved at least 10 cm from the inoculated site in 3 - 7 days. However, in other experiments a slow colonization was found. In potted tomato seedlings Cmm only moved 1.32 cm above the point of inoculation (Pine et al. 1955).

After colonization and translocation of Cmm during the first few hours, titers gradually increased in all plant parts from  $10^8$  at 8 dpi up to  $10^{12}$  (experiments 1 and 2) cells per gram of plant tissue at 16 dpi. The maximum densities were 1000 fold higher than those found in studies with potted plants (Meletzus et al. 1993; Gartemann et al. 2003; Chalupowicz et al. 2012). Population dynamics of Cmm were very similar for plants inoculated with a relatively low ( $10^5$  cfu ml<sup>-1</sup>) and high ( $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>) inoculum density, indicating a high multiplication rate in the first days after root infection. This may be due to the susceptibility of the young axenically grown plants, the absence of endophytic antagonists, the optimal temperature for bacterial growth and the high relative humidity (Xu et al. 2012).

*In vitro* plants developed symptoms typical for Cmm such as wilting and growth reduction already at 8 dpi. This is somewhat faster than for pathogenicity assays in glasshouses in which under optimal conditions the first symptoms of wilted leaves were found at 18 dpi (Sen et al. 2013). As for potted plants, it is likely that the incubation period for Cmm in the axenically grown plants will be dependent on the genotype used and the virulence of the strain (Chang et al. 1992; Sen et al. 2013; Dreier et al. 1997). In commercial productions of *in vitro* plants, it has been reported that infections with Cmm can remain latent throughout all *in vitro* stages. Symptom expression was found after plants had been weaned (Leifert et al. 1994). In our study, a highly susceptible tomato cultivar 'Moneymaker' and a hypervirulent strain of Cmm were used. In pathogenicity assays, it is recommended to look for symptom expression up to 2-3 weeks after inoculation if the virulence of the strain is unknown (Anonymous 2011).

The development of typical symptoms such as wilting, cankers and adventitious roots indicate that the full arsenal of virulence factors are produced by Cmm in the *in vitro* plants. For disease development in particular the production of cell-

wall degrading enzymes play an important role, including pectate lyases, cellulase and xylanases (Chalupowicz et al. 2010). It is assumed that these enzymes play a role in the degradation of xylem vessel walls resulting in tissue maceration, wilting and lateral spread of Cmm into adjacent parenchyma (Jahr et al. 2000). According to Gartemann et al. (2008), maceration of plant tissue by Cmm can also result in canker.

The microscopic techniques showed a heavy colonization of roots, stems and leaves after 21 dpi. The pathogen was observed in the vascular and parenchymatic tissue and accumulated in the intercellular spaces of host cells. CLSM studies showed that Cmm grew in three weeks to high titers in xylem vessels, indicating that Cmm used the limited energy resources in the xylem fluid in an efficient manner (Eichenlaub and Gartemann 2011; Gartemann et al. 2008). The acidic, nutrient-poor xylem fluid is relatively hostile for the pathogen, but growth in the xylem may be possible due to the relatively high concentration of  $\text{NH}_4^+$  and carboxylic acids such as malate, citrate, fumarate, and succinate (Husted et al. 2000; Bialczyk et al. 2004). The bacterium was found as planktonic cells but also in clusters in the xylem vessels. Previous studies indicate that Cmm can form biofilms, as biofilm-like structures were observed in the cross-sections of xylem vessels, whereas scanning electron microscopy revealed aggregate formation after extensive multiplication of Cmm in the xylem vessels (Chalupowicz et al. 2012). The pathogen is often first found attached to spiral thickenings of the xylem vessels. Later it can fill the xylem lumen after which a lateral spread to other vascular tissues may occur including the phloem as well as adjacent non-vascular tissues (Jahr et al. 2000; Wallis 1977; Pine et al. 1955).

Using ESM, small green fluorescent lesions were found in stems, apparently present at the epidermis. If these lesions occur also under more natural conditions, it may imply that Cmm can leak from there into the environment,

bearing a risk for contact infection. As expected, a high fluorescent signal was emitted from cankers, suggesting the presence of high densities of Cmm in these severely affected tissues. In cross-sections of stems green fluorescent cells were found in the intercellular spaces, but also abundant colonization of cells was observed. Similar results were obtained for a GFP-tagged *Streptomyces turgidiscabies* another gram positive bacteria, which showed an extensive intercellular and intracellular colonization of radish seedling root at 15 days post-inoculation (Hogenhout and Loria 2008). In our study this colonization probably is associated with enzymatic degradation of cell walls.

In this study we observed that roots were efficiently colonized by Cmm. Invasion of roots may contribute in commercial tomato productions to the spread of the bacteria from plant to plant via soil, or in case of hydroponically-grown crops, via nutrient solutions.

The pathogenicity assay based on *in vitro* plants is effective and can be potentially useful for fast screening of the virulence of Cmm strains, in testing plant material for resistance and in studies on molecular plant pathogen interactions and on the efficacy of control agents. *In vitro* plants may also be used in diagnostics by inoculating plants directly with extracts of suspected, symptomatic plants.

The use of *in vitro* plants in pathogenicity assays and studies on plant pathogen interactions have several advantages compared with the use of potted plants. In many countries the pathogen has a quarantine status which means that studies with Cmm should be conducted in contained facilities under strict hygienic conditions. *In vitro* plants can be grown in small growth cabinets, reducing costs in comparison to potted plants grown in glasshouses. A more rapid symptom expression is found than in potted plants, reducing the time of pathogenicity assays, which is particularly important in regulatory programs. Moreover,

standardization of conditions in growth cabinets is more readily achieved than in glasshouse compartments.

### **Acknowledgements**

We thank Dr. R. Eichenlaub (Bielefeld, Germany) for providing the *gfp*-plasmid and P. Kastelein, P. S. van der Zouwen, M. C. Krijger, B.C.E. Kronenburg-van de Ven and G.J.M. de Klerk for technical help and advices. The editorial work of Mrs. L.J. Hyman (Dundee, Scotland, UK) is highly appreciated. Thanks are also indebted to the Capes Foundation, Ministry of Education of Brazil for providing a student travel grant. The project was financed by the Dutch Ministry of Economic Affairs via the program “Plant Propagation Material” (BO-04).

### **References**

- Anonymous. (1995). Commission Directive 95/4/EC amendment of 21 February 1995 to the European Community Plant Health Directive (77/93/EEC). *Official Journal of the European Communities, L44*, 56-60.
- Anonymous. (2011). ISF Method for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seeds, Version 4. [http://www.worldseed.org/cms/medias/file/TradeIssues/PhytosanitaryMatters/SeedHealthTesting/ISHI-Veg/Tomato\\_Cmm\\_010811.pdf](http://www.worldseed.org/cms/medias/file/TradeIssues/PhytosanitaryMatters/SeedHealthTesting/ISHI-Veg/Tomato_Cmm_010811.pdf). Accessed 10 march 2013.
- Benhamou, N. (1991). Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*: localization of some polysaccharides and hydroxyproline-rich glycoproteins in infected host leaf tissues. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 38, 15-38.

- Bialczyk, J., Lechowski, Z., & Dziga, D. (2004). Composition of the xylem sap of tomato seedlings cultivated on media with  $\text{HCO}_3^-$  and nitrogen source as  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$ . *Plant and Soil*, 263, 265-272.
- Chalupowicz, L., Cohen-Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Sessa, G., Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2010). Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 100, 252-261.
- Chalupowicz, L., Zellermann, E.-M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Savidor, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2012). Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology*, 102, 23-31.
- Chang, R. J., Ries, S. M., & Pataky, J. K. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81, 1276-1281.
- Chang, R. J., Ries, S. M., & Pataky, J. K. (1992). Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Disease*, 76, 1150-1155.
- Czajkowski, R., de Boer, W. J., Velvis, H., & van der Wolf, J. M. (2010). Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology*, 100, 134-142.

- Davis, M. J., Gillaspie, A. G. Jr., Vidaver, A. K., & Harris, R.W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *34*, 107-117.
- Devi, C. S., & Srinivasan, V. M. (2006). Studies on various atmospheric microorganisms affecting the plant tissue culture explants. *American Journal of Plant Physiology*, *1*, 205-209.
- Dreier, J., Meletzus, D., & Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, *10*, 195-206.
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies, molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 445-464.
- Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., & Burger, A. (2006). *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria* (pp. 385-421). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands.
- Fatmi, M., & Schaad, N. W. (1988). Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. *Phytopathology*, *78*, 121-126.
- Fatmi, M., Schaad, N. W., & Bolkan, H. A. (1991). Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease*, *75*, 383-385.
- Ferreira, Daniel Furtado (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, *35*, 1039-1042.



- Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, *106*, 179-191.
- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Rückert, C., Schneiker, S., Zellermann, E.-M., Pühler, A., Eichenlaub, R., Kaiser, O., & Bartels, D. (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, *190*, 2138-2149.
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., & Voloudakis, A. E. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, *75*, 834-838.
- Hogenhout, S. A., & Loria, R. (2008). Virulence mechanisms of gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*, 1-8.
- Huang, R., & Tu, J. C. (2001). Effects of nutrient solution pH on the survival and transmission of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in hydroponically grown tomatoes. *Plant Pathology*, *50*, 503-508.
- Husted, S., Hebborn, C. A., Mattsson, M., & Schjoerring, J. K. (2000). A critical experimental evaluation of methods for determination of  $\text{NH}_4^+$  in plant tissue, xylem sap and apoplastic fluid. *Physiologia Plantarum*, *109*, 167-179.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (2000). The endo- $\beta$ -1,4-glucanase of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for the induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *13*, 703-714.

- Kado, C. I. (2010). *Plant Bacteriology*. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.
- Kawaguchi, A., Tanina, K., & Inoue, K. (2010). Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology*, *59*, 76-83.
- Kirchner, O., Gartemann, K.-H., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2001). A highly efficient transposon mutagenesis system for the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*, 1312-1318.
- Leifert, C., Morris, C. E., & Waites, W. M. (1994). Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Science*, *13*, 139-83.
- López, M.M., Bertolini, E., Caruso, P., Penyalver, R., Marco-Noales, E., Gorris, M.T., Morente, C., Salcedo, C., Cambra, M., & Llop, P. (2005). Advantages of an integrated approach for diagnosis of quarantine pathogenic bacteria in plant material. *Phytopathologia Polonica*, *35*, 49-56.
- Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J., & Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* NCPPB382. *Journal of Bacteriology*, *175*, 2131-2136.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473-497.
- Pine, T.S., Grogan, R. G., & Hewitt, W. B. (1955). Pathological anatomy of bacterial canker of young tomato plants. *Phytopathology*, *45*, 267-271.

- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., van der Wolf, J., Visser, R. G. F., & van Heusden, A. W. (2013). Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*, *190*, 309-317.
- Sharabani, G., Manulis-Sasson, S., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Chalupowicz, L., & Shtienberg, D. (2012). The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathology*, doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02673.x
- Strider, D. L. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*: a literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, *193*, 110 pages.
- Subbarayan, K., Varadharajan, N., & Kalyanaraman, R. (2010). Indole-3-acetic acid from contaminant fungus and potential application for cell cultures of *Alternanthera sessilis*. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, *1*, 257-262.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., & Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*, *183*, 3597-3605.
- Tsiantos, J. (1987). Transmission of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *Journal of Phytopathology*, *119*, 142- 46.
- Unge, A., Tombolini, R., Mølbak, L., & Jansson, J. K. (1999). Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 813-821.
- van Steekelenburg, N. A. M. (1985). Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. *Euphytica*, *34*, 245-250.

- Wallis, F. M. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiological Plant Pathology*, *11*, 333-342.
- Xu, X., Rajashekara, G., Paul, P. A., & Miller, S. A. (2012). Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. *Phytopathology*, *102*, 177-184.

**ARTIGO 2****ARTIGO 2: Colonização de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*  
em sementes de tomate**

Prepared in accordance with the European Journal of Plant Pathology  
(Preliminary version)

Flávia M. Vieira Lelis<sup>1,2</sup>, Robert Czajkowski<sup>1\*</sup>, Ricardo Magela de Souza<sup>2</sup>, Jan M. van der Wolf<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Plant Research International, P.O. Box 16, 6700 AB, Wageningen, The Netherlands

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras, CP 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

\* Current address: Department of Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk, Kladki 24, 80-822 Gdansk, Poland

\*\* Corresponding author: Jan M. van der Wolf, Plant Research International, P.O. Box 69, 6700 AB Wageningen, the Netherlands (Phone + 31.317.480598, Fax +31.317.418094, E-mail: jan.vanderwolf@wur.nl)

## Resumo

O cancro bacteriano do tomateiro (*Solanum lycopersicum*, syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.) é causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (1984) (Cmm), considerado um sério patógeno transmitido pela semente de tomate. Objetivou neste trabalho estudar a localização do patógeno em sementes de tomate. Para isso, foi utilizado um isolado de Cmm naturalmente resistente à rifampicina marcado com GFP (IPO3525). O método de congelamento utilizado para evitar a germinação não afetou a infiltração ou colonização por Cmm. Não houve nenhuma diferença significativa entre a estirpe IPO3525 e o tipo selvagem IPO3356 na colonização de sementes de tomate mortas e sementes de tomate viáveis. Com 'Fluorescent Protein Imagem' (FPI-screen) observou-se a intensidade de fluorescência (IF) aumentando ao longo do tempo confirmando a eficácia de Cmm na colonização da semente. Com a microscopia confocal confirmou-se as células do transformante GFP nos tricomas, nas camadas exteriores do tegumento, endosperma e embrião. Aos 36 dpi não houve sintomas visíveis em qualquer das plantas infectadas. A incidência de IPO3525 foi de 9,7%, em plantas com 36 dias, mas não foi detectada em plantas com 23 dias, ou pela estirpe selvagem IPO3356 em plantas com 36 ou 23 dias depois de ser semeada.

**Palavra chave** cancro bacteriano, proteína verde fluorescente, patógeno transmitido por sementes, microscópio laser confocal

**Abstract**

Bacterial canker of tomato (*Solanum lycopersicum*, syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.) is caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (1984) (Cmm), which is considered to be a serious seed-borne pathogen of tomato. The aim in this work was to study the localization of the pathogen in tomato seeds. For this a GFP-tagged, spontaneous rifampicin resistant strain of Cmm (IPO3525) was used. The method of freezing used to avoid germination does not affect Cmm infiltration or colonization. There wasn't any significant difference between IPO3525 and the wild type strain IPO3356 in the colonization of dead tomato seeds and viable tomato seeds. The Fluorescent Protein Imager (FPI-screen) shows the fluorescence intensity (FI) increasing over time confirming the efficiency of Cmm colonization in the seed. With the confocal microscopy we were able to confirm cells of the GFP-tagged transformant in the trichome hairs, in the outer testa layers, endosperm and embryo. At 36 dpi there were no visible symptoms in any of the inoculated plants. The incidence of IPO3525 was 9.7% in plants with 36 days but it was not detected in plants with 23 days or for the wild type strain IPO3356 in plants with 36 or 23 days after being sown.

**Keywords** bacterial canker, green fluorescent protein, seed-borne pathogen, confocal laser scanning microscopy

## **Introdução**

O cancro bacteriano do tomateiro (*Solanum lycopersicum*, sin. *Lycopersicon esculentum* Mill.) é causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (1984) (Cmm), uma bactéria transmitida por sementes (seedborne bacteria). Esta bactéria gram-positiva foi descrita, pela primeira vez, em 1910, no estado de Michigan, EUA, mas, atualmente, pode ser encontrada na maioria das áreas produtoras de tomate no mundo. Em alguns países da Europa, o cancro é considerado a doença bacteriana mais grave no tomateiro, levando a sérias perdas econômicas.

Sementes de tomate representam uma importante fonte de infecção (Tsiantos 1987; Strider 1969), pois podem carrear a bactéria a longa distância e ser responsáveis por novos surtos do cancro bacteriano em áreas previamente consideradas livre da doença (Gitaitis et al. 1991; Fatmi et al. 1991; Tsiantos 1987). É necessário enfatizar a importância da semente, não só na disseminação, mas também no processo de sobrevivência de Cmm, pois a bactéria pode permanecer viável por longos períodos nas sementes de tomate (Strider 1969; Tsiantos 1987).

Programas de quarentena propostos pelo governo são utilizados em áreas de produção de tomate, como forma de erradicar ou evitar a propagação do agente patogênico. Por isso, os testes de sanidade e os tratamentos de sementes têm sido propostos. Entretanto, o tratamento de sementes para a erradicação de Cmm tem apresentado eficiência variável e, mesmo quando eficaz, pode afetar a germinação das mesmas (Fatmi et al. 1991; Dhanvantari 1989). Outro fato agravante é que não há, no mercado, cultivares comerciais disponíveis resistentes a Cmm (Sen et al. 2013). Portanto, a prevenção por meio da utilização de sementes e mudas livres do patógeno é a principal forma de controle da doença. Embora isso possa parecer claro, na prática, é uma medida



de difícil implantação (Gitaitis & Walcott 2007) porque novos focos e primeiros relatos continuam a acontecer em diferentes regiões.

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* é uma bactéria quarentenária em diversos países, incluindo região da ‘European and Mediterranean Plant Protection Organization’ (EPPO) (Eichenlaub et al. 2006) e esta situação exige métodos rápidos e precisos que detectem o patógeno, independente da sua localização e quantidade (se em baixo nível) na semente (Leon et al. 2011).

Em estudos recentes tem sido demonstrado que o tipo de inoculação, se através do pistilo ou pericarpo (Dutta et al. 2012a), influencia a localização de *Acidovorax citrulli* na semente de melancia (Dutta et al. 2012b) e a recuperação da bactéria na semente é influenciada por esta localização.

Objetivou-se neste trabalho estudar a localização de Cmm em sementes de tomate e transmissão de Cmm da semente para a planta, após a inoculação artificial. Para isto um isolado de Cmm naturalmente resistente à rifampicina e transformado com ‘Green Fluorescent Protein’ (GFP) foi inoculado em sementes vivas e mortas. A colonização e localização do isolado nas sementes inoculadas foram verificadas utilizando ‘Fluorescent Protein Imaging’ (FPI-screen) e microscópio laser confocal. O estudo da localização de Cmm nas sementes de tomate pode ajudar na melhoria dos testes de sanidade.

## **Material e métodos**

### Isolados bacterianos e condições de cultivo

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* IPO3356 altamente virulento e resistente a rifampicina (Rif<sup>+</sup>) (dado não publicado), foi cultivado em meio TB<sub>Y</sub> (‘tryptone broth with yeast extract’) (por litro: triptona 10 g, extrato de levedura

5 g, NaCl 5 g, pH 7.5 e agar 15 g) suplementado com rifampicina e cicloheximida (Sigma Chemical, St. Louis), para prevenir o crescimento de fungos, para as concentrações finais de  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  e  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . O isolado Cmm-GFP IPO3525 (IPO3356 transformado com plasmídeo pK2-22-*gfp*) (Lelis et al. dados não publicados) foi cultivado em meio LB (Luria Bertani) agar (por litro: triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 10 g), suplementado com kanamicina (Sigma), concentração final de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ , e cicloheximida (Sigma Chemical, St. Louis) a  $28^\circ\text{C}$ .

#### Método de congelamento e desinfestação das sementes

Para facilitar a análise por microscopia e FPI-screen, foi necessário evitar a germinação das sementes, portanto foi utilizado o método de congelamento das sementes de tomate antes da inoculação. O método foi realizado seguindo o protocolo de Limonard (1966) com modificações. As sementes de tomate cultivar 'Moneymaker' (lote comercial), foram esterilizadas superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio a 1% (Sigma) por 20 minutos seguida por quatro lavagens em água destilada esterilizada. Posteriormente as sementes desinfestadas foram colocadas em blotter úmido por 24 horas a  $25^\circ\text{C}$ , e em seguida em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  por mais 24 horas. Estas sementes foram inoculadas por infiltração a vácuo (Czajkowski et al. 2011), tal como descrito a seguir, colocadas em placas de petri contendo o respectivo meio de cultura para cada tipo de inóculo e incubadas a  $25^\circ\text{C}$  no escuro.

#### Inoculação de sementes

Sementes de tomate (cv. Moneymaker) viáveis e sementes de tomate que passaram por congelamento, portanto mortas, foram inoculadas por infiltração a

vácuo, por imersão em 100 ml de suspensão bacteriana dos isolados de Cmm IPO3525 e IPO3356, concentração de  $10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ , ou, alternativamente, em água destilada estéril. A seguir as sementes inoculadas foram colocadas durante 10 minutos em um dessecador com vácuo de -600 mBar, e incubadas por 10 minutos à pressão atmosférica. Cerca de 200 sementes inoculadas, viáveis e mortas, foram colocadas em placas de petri contendo o respectivo meio de cultura para cada tipo de inóculo, como se segue: sementes inoculadas com água foram colocadas em meio TBY suplementado com cicloheximida na concentração final de  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ ; sementes inoculadas com a estirpe tipo selvagem foram colocadas em meio TBY suplementado com rifampicina na concentração final de  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  de cicloheximida; sementes inoculadas com Cmm-GFP foram colocadas em meio TBY suplementado com kanamicina na concentração final de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  e cicloheximida. Após incubação as sementes foram removidas do meio e lavadas em água destilada estéril, porque depois de 72 horas os isolados de Cmm multiplicaram-se nas sementes e cresceram no meio de cultura também. Essas sementes foram usadas no teste FPI-screen, microscopia e plaqueamento.

#### Estabilidade de Cmm-GFP em sementes de tomate

Sementes inoculadas (viáveis e mortas) foram removidas do meio de cultura 3, 72 e 120 horas pós inoculação (hpi), desinfestadas superficialmente com a pulverização de álcool 70%, lavadas em água destilada estéril e destas uma semente foi macerada em água destilada estéril ( $500 \mu\text{l sementes}^{-1}$ ). Posteriormente, procedeu-se a diluição em série de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  desse extrato. Em seguida,  $100 \mu\text{L}$  do extrato bruto e das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  foram espalhados em meio Luria Bertani (LB) mais kanamicina, ou meio LB mais rifampicina ( $25 \mu\text{g l}^{-1}$ ), ou em meio LB. As sementes foram maceradas

separadamente, sendo utilizadas três sementes por isolado e por hpi. Depois de quatro dias foram verificados o número de colônias bacterianas GFP-positivas e GFP-negativas nas placas.

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 3x3. Sendo o fator 1 inoculação, com três níveis e o fator 2 tempo de avaliação (horas), com três níveis. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar<sup>®</sup> versão 5.3 (Ferreira 2011). As análises de variância foram corrigidas por meio da transformação dos dados em log (cfu+1/ml) por conter muitos valores iguais à zero.

#### Fluorescent Protein Imagem (FPI-screen)

Sementes de tomate (viáveis e mortas) contaminadas e/ou infestadas com Cmm-GFP IPO3525 ou Cmm IPO3356 (controle negativo) ou água (controle negativo) incubadas por 3, 24, 48 e 72 hpi (experimento 1) ou 3, 72 e 120 hpi (experimento 2) foram analisadas. A presença de Cmm-GFP foi detectada por meio do aparelho Fluorescent Protein Imagem (FPI-screen), um sistema de monitoramento não invasivo com base na utilização de um LED de iluminação. Os sinais de fluorescência foram gravados com um sensível dispositivo de carga acoplado (CCD) à câmera digital e armazenados para análise da imagem digital. O aparelho foi desenvolvido pela Universidade de Wageningen e fabricado pela PhenoVation B.V. A fluorescência foi avaliada, e em seguida foi feita a correção da autofluorescência. Foram utilizados três sementes intactas por isolado e por hora analisada. Este experimento foi feito uma vez para sementes mortas e duas vezes para sementes viáveis.

## Microscopia

Sementes mortas inoculadas foram removidas do meio de cultura 3, 72 e 144 horas após a inoculação e lavadas em água destilada estéril. Cortes transversais e longitudinais foram feitos e colocados em lâmina com água destilada para as observações sob o microscópio laser confocal (CLSM) (Leica DM5500Q). As fotografias foram tiradas com o sistema digital Leica (Leica) conectado ao CLSM.

## Estudos de virulência em casa-de-vegetação

Sementes de tomate (cv. Moneymaker) inoculadas como descrito acima com IPO3525 ou IPO3356 ou água (controle negativo), foram semeadas em vasos contendo composto (John Innes, Norwich, Reino Unido) em casa-de-vegetação e mantidas a 28°C. Foram utilizadas vinte e cinco sementes por isolado. Na primeira semana a umidade relativa (UR) foi de aproximadamente 70%, em seguida foi construída uma câmara com plástico transparente cobrindo todas as plantas de forma a aumentar UR. As plantas foram observadas semanalmente para o desenvolvimento de sintomas. Este experimento foi repetido uma vez. As plantas foram colhidas aos 36 e 23 dias após a semeadura, experimentos 1 e 2. Em seguida 3-4 cm da base de cada caule foram separados para análise. As amostras compostas de cinco caules foram macerados em água destilada estéril (2 ml<sup>-1</sup> g de tecido) e analisadas para a presença de Cmm. Os DNAs foram purificados a partir dos macerados utilizando o Mini Kit QIAamp DNA (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) e testados em ensaio de TaqMan. Para a amplificação dos DNAs foram utilizados os primers RZ\_Ptssk (RZ\_Ptssk10: 5'-GGG GCC GAA GGT GCT GGT G-3'; RZ\_Ptssk11: 5'-CGT CGC CCG CCC GCT G-3'; RZ\_Ptssk12: 5'-Fam-TGG TCG TCC / ZEN / TCG GCG CC /

IABkFQ -3 ') (Sen et al. 2013). A reação para o volume final de 25 µl incluiu 12,5 µl Takara mix, 0,5 µl Rox II, 2 µl do combinado primer F/R (4µM) e a sonda (1 µM) e 10 µl do DNA. As reações foram realizadas em equipamento ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem). As condições da reação foram 2 minutos a 95°C, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Estimativa da incidência de Cmm em plantas

A incidência de Cmm em plantas de tomateiro foi baseada na probabilidade de se detectar uma haste positiva em um composite. Usando  $I = \{1 - [(N-p)/N]^{1/n}\} 100$ , onde  $I$  é a incidência,  $p$  é o número de composites positivas para Cmm,  $N$  é o número total de composites, e  $n$  o número de hastes em uma composite (De Boer 2002).

## Resultados

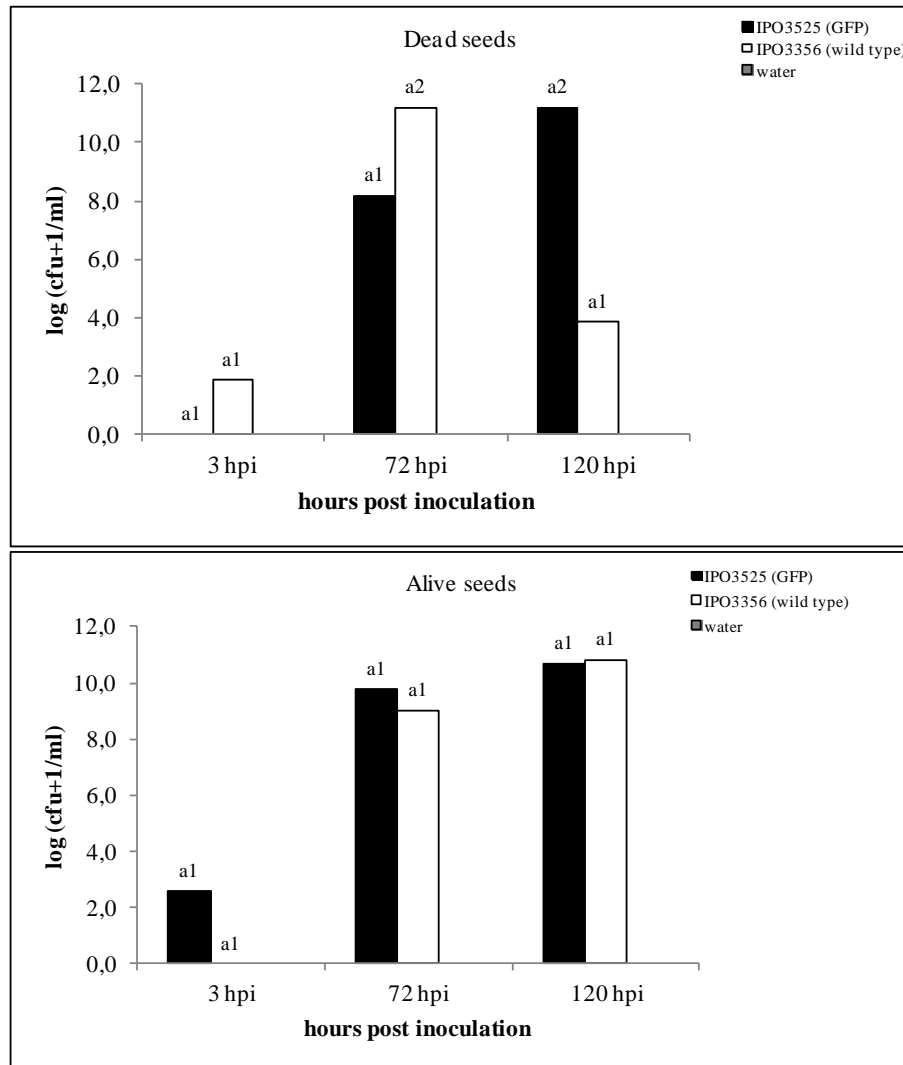
Em sementes mortas, o isolado IPO3525 cresceu até a concentração de  $\sim 10^{11}$  ufc ml<sup>-1</sup>, 120 hpi, no entanto, o tipo selvagem IPO3356 cresceu até 72 hpi ( $\sim 10^{11}$  ufc ml<sup>-1</sup>) e, em seguida, caiu drasticamente para  $\sim 10^3$  ufc ml<sup>-1</sup>, 120 hpi (figura 1). Nas sementes viáveis inicialmente ocorreu uma lenta multiplicação bacteriana, mas aumentou no decorrer do tempo, atingindo elevadas concentrações de  $\sim 10^9$  ufc ml<sup>-1</sup> 72 hpi e  $\sim 10^{10}$  ufc ml<sup>-1</sup> 120 hpi. Não houve diferença significativa entre as duas estirpes IPO3525 e IPO3356 nas sementes viáveis (figura 1). O isolado IPO3525 manteve-se estável em sementes de tomate viáveis e mortas, por pelo menos, 120 horas após a inoculação. Elevadas concentrações de IPO3525 foram observadas neste momento em ambas as sementes, mortas e viáveis, bem como o crescimento bacteriano externamente às

sementes se espalhando pelo meio de cultura aos 3 dias após a incubação, em que 100% das colônias eram fluorescentes.

Pela técnica FPI observa-se a intensidade da fluorescência (IF) na superfície e ainda internamente nas sementes analisadas, provavelmente as camadas exteriores da testa. A fluorescência das sementes viáveis (figura 2a-d) e mortas (figura 2e-h) inoculadas com IPO3525 foi visivelmente aumentada com o tempo. O experimento FPI-screen foi feito uma vez para sementes mortas e duas vezes para sementes viáveis.

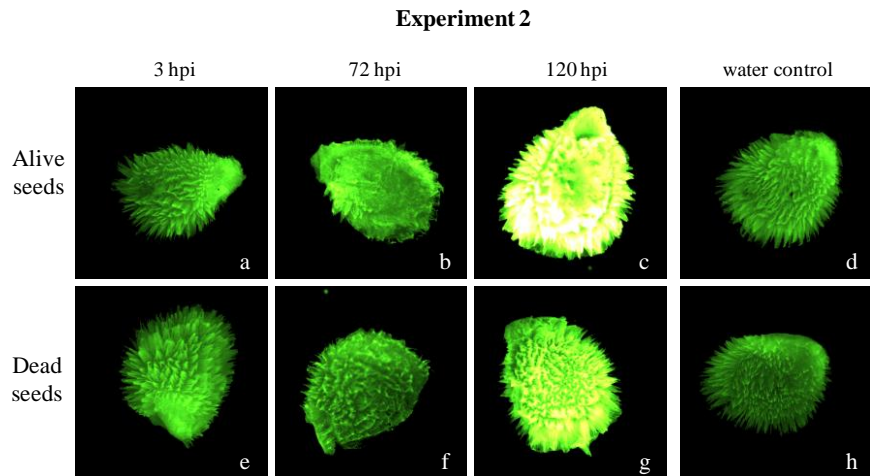
Com a microscopia confocal, foi possível visualizar as células individuais de IPO3525 sobre os tricomas e na célula do endosperma (figura 3d) três horas após a inoculação das sementes mortas. Após 72 hpi foi possível visualizar facilmente a colonização de IPO3525 externamente nos tricomas, nas camadas exteriores da testa e nas células do endosperma (figura 3e), com uma intensidade elevada. Cento e quarenta e quatro horas após a inoculação massiva colonização foi observada em toda a semente com um sinal muito forte no interior das células, incluindo os cotilédones (figura 3f). No segundo experimento, não foi possível observar Cmm nas sementes analisadas três horas após a inoculação. Poucas células individuais foram observados no exterior, tricomas e células do endosperma 144 horas após a inoculação com IPO3525, e somente 192 horas após a inoculação foi visto expressivo crescimento de IPO3525 nos tricomas e células do endosperma, mas não em alta intensidade (dados não apresentados).

Nos estudos de virulência em casa-de-vegetação as plantas foram observadas semanalmente para a presença dos sintomas característicos de Cmm. Trinta e seis dias após a semeadura, Cmm-GFP IPO3525 estava presente em baixas concentrações na base do caule e, embora os sintomas não tenham sido visíveis, a incidência foi de 9,7%. Entretanto em plantas com 23 dias a bactéria não foi detectada. Por outro lado, a estirpe selvagem IPO3356 não foi detectada em plantas com 36 e 23 dias após serem semeadas (tabela 1).

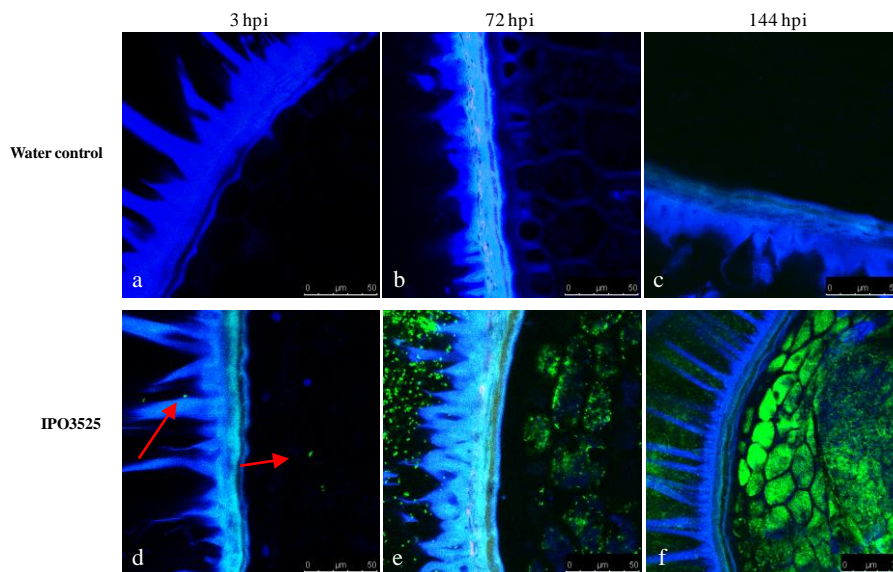


**Figura 1** Colonização de Cmm-GFP IPO3525 ou tipo selvagem IPO3356 em sementes de tomate mortas e viáveis inoculadas com suspensão bacteriana com densidade de  $\sim 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ . O número de colônias bacterianas em placas foram determinadas aos 3, 72 e 120 hpi. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente com base no teste de Tukey ( $p < 0,05$ )





**Figura 2** Imagens obtidas com Fluorescent Protein Imaging (FPI-screen) de sementes de tomate 3, 72 e 120 horas após a inoculação. (a-d) sementes viáveis; (e-h) sementes mortas; (a-c, e-g) sementes inoculadas com IPO3525 com uma densidade de  $\sim 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ; (d e h) controle 3 horas após a inoculação



**Figura 3** Sementes mortas analisadas por microscopia confocal a laser aos 3, 72 e 144 horas pós-inoculação com Cmm-GFP. (a-c) Sementes inoculadas com água; (d-f) Sementes inoculadas com IPO3525 com densidade de  $\sim 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$

**Tabela 1** Estimativa da incidência de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomateiro com diferentes idades. Onde N = composites testadas, p = Composites positivas e n = número de amostras combinadas em uma composite

	N	p	n	Incidence (%)	
<b>Experiment 1</b> (36 days)	IPO3525	5	2	5	9,71
	IPO3356	5	0	5	0
	WATER	5	0	5	0
<b>Experiment 2</b> (23 days)	IPO3525	5	0	5	0
	IPO3356	5	0	5	0
	WATER	5	0	5	0

## Discussão

Cmm colonizou sementes de tomate (mortas e viáveis) eficientemente e multiplicou-se atingindo elevadas concentrações após 72 horas. Neste momento, Cmm estava amplamente distribuído nos tricomas e endosperma, levando à conclusão de que, após este período, torna-se necessário mais do que um simples tratamento para a eliminação da população superficial, mas um tratamento de sementes para erradicar Cmm, pode levar à redução da germinação da semente (Fatmi et al. 1991; Leon et al. 2011).

Pela técnica FPI foi possível confirmar a eficiência da infestação de Cmm em sementes de tomate, através da visualização do aumento na intensidade da fluorescência ao longo do tempo, independentemente da condição das sementes, se viáveis ou não. Além disso, os valores do sinal de GFP corrigidos foram gerados para cada semente analisada.

Utilizando CLSM observou-se a presença da Cmm-GFP nos pêlos e casca das sementes nas primeiras horas após a inoculação e mais tarde, 72 e 144 horas, quando as bactérias atingiram elevadas concentrações no endosperma e tecido embrionário resultando em infecção sistêmica. Provavelmente a penetração ocorreu através das cicatrizes da semente, formadas quando a semente é separada do funículo. Ou então, por ferimentos formados pelo congelamento da semente. No segundo experimento, oito dias foram necessários após a inoculação para visualização da colonização de IPO3525, mas não em alta intensidade, embora mostrassem altas concentrações bacterianas ( $10^{10}$ - $10^{11}$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ) 120 hpi. De acordo com Chalupowicz et al., (2012), isto pode ser resultado de uma perda de cópias do plasmídeo por causa de condições não seletivas ou atenuação da expressão de GFP.

A população de Cmm de aproximadamente  $10^2$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  na semente após a inoculação não foi suficiente para inibir a germinação das sementes, mas o suficiente para a transmitir o patógeno das sementes para as mudas, porém, em um percentual baixo. De acordo com Strider (1969), uma pequena parte de sementes infectadas e grande parte das sementes infestadas podem germinar e resultar em uma planta doente (Strider 1969). Neste experimento o não aparecimento dos sintomas característicos pode ser consequência do curto tempo de realização do experimento em casa-de-vegetação, ou mesmo por influência das condições ambientais (Tsiantos 1987).

Sementes inoculadas com Cmm por imersão dificilmente resultam na ocorrência de plantas com infecções sistêmicas. Como neste trabalho, a baixa incidência de infecção sistêmica também foi observado por Chang et al. (1992) 84 dias após o transplântio para o campo. Mesmo com uma baixa taxa de transmissão as sementes infectadas podem resultar em epidemia, se houver a associação de outros fatores (Chang et al. 1991).

Notoriamente, sementes infestadas artificialmente por infiltração a vácuo não caracterizam o que acontece no campo, mas com este experimento pode-se ter uma noção de onde Cmm se aloja após a inoculação e, talvez, esta informação possa ajudar nos testes de sanidade. Em melancia a eficiência da recuperação de *Acidovorax citrulli* tem sido associada com a localização da bactéria na semente inoculada (Dutta et al. 2012ab).

A correlação entre as observações em microscópio confocal a laser, estudo FPI-screen e plantio nos permitem confirmar que IPO3525 pode contaminar e infestar sementes de tomate e ambas as formas são importantes na disseminação. As sementes podem transportar o patógeno para longas distâncias ou de uma estação para outra, já que Cmm pode sobreviver por longos períodos em semente (Strider 1969).

## Referências

- Chalupowicz, L., Zellermann, E.-M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Savidor, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2012). Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology*, *102*, 23-31.
- Chang, R. J., Ries, S. M., & Pataky, J. K. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, *81*, 1276-1281.
- Chang, R. J., Ries, S. M., & Pataky J. K. (1992). Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* *82*:553-560.
- Czajkowski, R., de Boer, W.J., van Veen, J.A., van der Wolf, J.M. (2011). Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 in vitro and in planta. *Plant Pathology* doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02486.x
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G. Jr., Vidaver, A. K., & Harris, R.W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *34*, 107-117.
- De Boer, S.H. (2002). Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. *Plant Disease*, *86*, 960-964.
- Dhanvantari, B. N. (1989). Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. *Can. J. Plant Pathol.* *11*, 400-408.

- Dutta, B., Avci, U., Hahn, M. G., and Walcott, R. R. (2012a). Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. *Phytopathology*, *102*, 461-468.
- Dutta, B.; Vernaiz, M.A.C.; Castro-Sparks, A.C.; Scherm, H.; Walcott, R.R (2012b). Location of *Acidovorax citrulli* in watermelon seeds affects efficiency of pathogen detection by seed health testing. *Seed Science and Technology*, *40*, 309-319.
- Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., & Burger, A. (2006). *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria* (pp. 385-421). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands.
- Fatmi, M., Schaad, N. W., & Bolkan, H. A. (1991). Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease*, *75*, 383-385.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, *35*, 1039-1042.
- Gitaitis, R.; Walcott, R. (2007). The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual Review Phytopathology*. *45*:371–97.
- Gitaitis, R. D.; Beaver, R. W.; Voloudakis, A. E. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, v. *75*, p. 834-838.
- León, L.; Siverio, F.; López, M.M.; Rodríguez, A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. *Plant Disease*, *95*, 1328-1338.
- Limondard, T., (1966). A modified blotter test for seed health. *Neth. J. of Plant Path.* *72*, 319-321.

- Machado, J.C., Oliveira, J.A., Vieira, M.G.G.C., Alves, M.C. (2003). Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. *Revista Brasileira de Sementes*, 25, 77-81.
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., van der Wolf, J., Visser, R. G. F., & van Heusden, A. W. (2013). Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*, 190, 309-317.
- Strider, D. L. 1969. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. N.C. Agri. Exp. Stn. Tech. Bull. 193.
- Tsiantos, J. (1987). Transmission of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *Journal of Phytopathology*, 119, 142- 46.