

Hibridación molecular de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y otras bacterias con la sonda MIC1

S. LLAMAS y C. NOVAL

Quince cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 8 de *C m* subsp. *insidiosus*, 2 de *C m* subsp. *sepedonicus*, 1 *Pseudomonas solanacearum*, 1 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 7 del género *Arthrobacter* y 30 saprófitos de tomate fueron hibridadas mediante la técnica Dot-Blot con la sonda específica de *C m* subsp. *michiganensis*, MIC1, para determinar la especificidad y sensibilidad de esta sonda en la detección del agente causante del Chancro del tomate.

S. LLAMAS y C. NOVAL. Subdirección General de Sanidad Vegetal. Velázquez, 147. 28002 Madrid.

Palabras clave: Chancro del tomate, sondas de ADN.

INTRODUCCION

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al* (Cmm) es el patógeno causante de la enfermedad conocida como Chancro bacteriano del tomate u Ojo de párajo que fue descrita por primera vez en 1910 en EE.UU. (Smith, 1910). Como consecuencia de la importación de semillas americanas la enfermedad aparece en Dinamarca en 1922 (WEBER, 1922). Actualmente ha sido detectada en las principales áreas tomateras de todo el mundo. En España es a partir del año 1978 cuando el patógeno comienza a localizarse gradualmente en puntos diversos, tanto en cultivos al aire libre como en invernadero (NOVAL, 1990).

El diagnóstico de la enfermedad es difícil. Por una parte los síntomas que pueden manifestar las plantas son variables y dependen de las prácticas culturales o del cultivar afectado; además el patógeno es capaz de encontrarse latente en la planta durante periodos bastante largos (EPP0, 1992).

El empleo de semillas infectadas es la fuente principal de transmisión de la enfer-

medad (EPP0, 1992). Aunque se sabe que esta transmisión ocurre a niveles menores del 1%, este porcentaje de infección en los semilleros puede motivar un 100% de infecciones en los trasplantes (ENDO, 1975, GROGAN y KENDRICK, 1953).

Existen diferentes métodos para la detección de la enfermedad, basados principalmente en tinción de inmunofluorescencia indirecta y en siembras en medios semiselectivos (FATMI y SCHAAD, 1989, GIATITIS *et al.*, 1989, NOVAL, 1991, RAT, 1984, VAN VAERENBERG y CHAVEAU, 1987, VAN VAERENBERG *et al.*, 1993).

Debido a la importancia que presenta la detección temprana del patógeno y a las dificultades que pueden entrañar los métodos precedentes, el Grupo de Expertos en Bacterias de la CE, está llevando a cabo un proyecto en el que se estudia, entre otras técnicas, la hibridación molecular con sondas de ADN.

Esta técnica es ampliamente utilizada en diagnosis de enfermedades humanas y de animales (EDELSTEIN, 1986, ROSEN, 1987, VAN BRUNT y KLAUSNER, 1987) empleán-

dose también desde hace algunos años para la detección de organismos fitopatógenos (SCHAAD *et al.*, 1986). En el caso de Cmm se han realizado diversos estudios que han conducido a la obtención de sondas para este patógeno (JOHANSEN *et al.*, 1989, THOMPSON *et al.*, 1989). Sin embargo, la gran analogía existente entre los genomas de las especies de *Clavibacter michiganensis* (VIDAVER, 1982, VIDAVER y STARR, 1981) hace difícil encontrar sondas específicas. En este trabajo se exponen los resultados que se han obtenido en nuestro laboratorio al estudiar la especificidad y sensibilidad de la sonda MIC1 (desarrollada por el Engineering Group Lyngby, Dinamarca) frente a Cmm y otras bacterias.

MATERIAL Y METODOS

Cultivos y mantenimiento de las bacterias

Se estudiaron 64 microorganismos, entre los que figuran 15 aislados de Cmm, 8 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (Mc Culloch) Davis *et al.*, 1984 (Cmi), 2 aislados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann y Kotthoff) Davis *et al.*, 1984 (Cms), 7 del género *Arthrobacter*, un aislado de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey *et al.*, 1923 (Ecc), un aislado de *Pseudomonas solanacearum* (Smith, 1896) (Ps) y 30 saprófitos, 15 de ellos procedentes de plantas de tomate (ST) y otros 15 de semillas de tomate (SS). En el Cuadro 1 se especifican la identidad y origen de los microorganismos.

Los aislados se multiplicaron a 24-28 °C en YPGA (Extracto de levadura, 5 g; bacto-peptona, 5 g; glucosa monohidrato, 10 g; agar, 15 g; agua destilada, 1 litro).

Sonda

La sonda ensayada MIC1, con un tamaño aproximado de 800 pares de bases (pb), fue

marcada por incorporación de biotina mediante un «nick translation» empleando el kit «BioNick Labelling System» de BRL según el protocolo recomendado por el fabricante.

Preparación de las muestras para la extracción de los ácidos nucleicos

Los aislados, precultivados en YPGA, fueron multiplicados en 50 ml de YPG (Extracto de levadura, 5 g; bacto-peptona, 5 g; glucosa monohidrato, 10 g; agua destilada, 1 l; pH 7.2) de 1 a 4 días sobre un agitador orbital a temperatura ambiente. Previo a la extracción de ácidos nucleicos, 5 ml de cada muestra fueron conservados a -20 °C, y 50 μ l fueron sembrados en placa con YPGA para determinar la concentración de cada cepa (Cuadro 2).

Con las muestras conservadas a -20 °C se prepararon escalas conteniendo 1 ml de las concentraciones 10^8 a 10^1 cel/ml para Cmm y viales con concentración próxima a 10^8 cel/ml en el caso de los restantes microorganismos.

Extracción y purificación de los ácidos nucleicos

La extracción y purificación de los ácidos nucleicos se realizó según el protocolo indicado para Cms en un trabajo precedente (LLAMAS *et al.*, 1993).

Distribución y fijación de las muestras sobre las membranas de nylon

A las suspensiones de ácidos nucleicos se incorporaron 300 μ l de solución desnaturante (7,5% formaldehído, 10 X SSC). Los viales fueron calentados a 95 °C durante 15

Cuadro 1.-Identidad y origen de los aislados

Aislado	Identidad	Hospedante	País
PD-37	Cms	Patata	USA
PD-323	Cms	Patata	USA
PD-239	Cmi	Alfalfa	USA
LMG-3675	Cmi	Alfalfa	-
LMG-3676	Cmi	Alfalfa	-
LMG-7323	Cmi	Alfalfa	USA
7324 _{r1}	Cmi	Alfalfa	USA
7324 _{r2}	Cmi	Alfalfa	USA
LMG-7325t ₁	Cmi	Alfalfa	N. Zelanda
LMG-7325t ₂	Cmi	Alfalfa	N. Zelanda
PD-1386	Cmm	Tomate	Italia
LMG-2891	Cmm	Tomate	Hungría
LMG-3690	Cmm	Tomate	R. Unido
LMG-3694	Cmm	Tomate	Sudáfrica
LMG-5602	Cmm	Tomate	N. Zelanda
LMG-5604	Cmm	Tomate	N. Zelanda
LMG-5610	Cmm	Tomate	Brasil
LMG-5724	Cmm	Tomate	Bulgaria
LMG-7333	Cmm	Tomate	Hungría
RPZBC-1680	Cmm	Tomate (semilla)	Taiwan
RPZBC-1683	Cmm	Tomate (semilla)	Taiwan
RPZBC-1910	Cmm	Tomate	Bélgica
RPZBC-2405	Cmm	Tomate	Bélgica
RPZBC-2408	Cmm	Tomate	Bélgica
RPZBC-3108	Cmm	Tomate	Bélgica
NCIMB-8910	<i>A. pascens</i>	Suelo	-
NCIMB-8912	<i>A. aurescens</i>	-	-
NCIMB-9066	<i>A. ramosus</i>	Suelo	-
NCIMB-9333	<i>A. oxydans</i>	-	-
NCIMB-9499	<i>A. chrysallopoites</i>	Suelo	-
NCIMB-9541	<i>A. histidinolorans</i>	Suelo	-
NCIMB-10627	<i>A. polychromogenes</i>	-	-
PD-1958	Ps	Patata	Colombia
PD-578	Ecc	Patata	Holanda
ST-6, ST-8 a ST-14, ST-17 y ST-19 a ST-24	Desconocida	Tomate	España
SS-1 a SS-15	Desconocida	Tomate (semilla)	España

PD: Culture Collection of Plant Protection Service. Wageningen, The Netherlands.

LMG: Laboratorium Microbiology Gent Culture Collection Rijksuniversiteit, Belgique.

RPZBC: Rijkstation Woor Plantenziekten Collection Belgique.

NCIMB: The National Collection of Industrial and Marine Bacteria. Torry Research Station Aberdeen, Schotland, UK.

Cms: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Cmi: *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*.

Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

A: *Arthrobacter*.

Ps: *Pseudomonas solanacearum*.

Ecc: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

ST: Saprófito de planta de tomate.

SS: Saprófito de semilla de tomate.

Cuadro 2.-Condiciones de la multiplicación bacteriana y concentración obtenida

Cepas	Multiplicación		Concentración Bacteriana (Cel/ml)
	Precultivo en YPGA (días)	Cultivo en YPG (días)	
PD-1386	5	1	9.8×10^8
RPZBC-1680	5	1	4.7×10^9
RPZBC-1683	5	1	1.0×10^9
RPZBC-1910	5	1	4.2×10^9
RPZBC-2405	5	1	7.6×10^8
RPZBC-2408	5	1	5.3×10^8
RPZBC-3108	5	1	7.2×10^8
LMG-2891	5	1	3.6×10^8
LMG-3690	5	1	1.1×10^9
LMG-3694	5	1	4.6×10^9
LMG-5602	5	1	1.3×10^9
LMG-5604	6	1	1.7×10^8
LMG-5610	5	1	4.2×10^9
LMG-5724	5	2	7.8×10^9
LMG-7333	5	1	2.8×10^8
PD-1958	2	1	8.6×10^8
PD-578	1	1	7.5×10^8
ST-6	2	1	7.6×10^8
ST-8	2	2	5.7×10^8
ST-9	5	2	9.2×10^8
ST-10	7	1	9.8×10^9
ST-11	2	1	8.4×10^8
ST-12	6	2	8.6×10^7
ST-13	2	1	9.4×10^8
ST-14	2	1	1.1×10^9
ST-17	6	1	5.8×10^8
ST-19	2	1	4.1×10^8
ST-20	5	2	2.0×10^8
ST-21	5	2	7.6×10^8
ST-22	5	3	8.0×10^9
ST-23	6	3	4.6×10^8
ST-24	6	3	5.4×10^8
SS-1	5	1	6.4×10^8
SS-2	6	2	2.4×10^8
SS-3	5	1	9.4×10^8
SS-4	6	1	1.8×10^8
SS-5	5	2	6.6×10^8
SS-6	6	2	1.4×10^8
SS-7	5	1	2.6×10^8
SS-8	8	2	8.4×10^8
SS-9	4	1	4.5×10^8
SS-10	7	3	6.2×10^8
SS-11	4	1	7.4×10^8
SS-12	6	3	3.7×10^8
SS-13	4	2	4.3×10^8
SS-14	5	1	1.6×10^8
SS-15	6	2	2.8×10^8
PD-37	7	2	4.1×10^9

Continúa

Cuadro 2 (Continuación).—Condiciones de la multiplicación bacteriana y concentración obtenida

Cepas	Multiplicación		Concentración Bacteriana (Cel/ml)
	Precultivo en YPGA (días)	Cultivo en YPG (días)	
PD-323	7	2	1.5×10^9
PD-239	5	2	1.0×10^9
LMG-3675	4	2	8.4×10^8
LMG-3676	1	4	8.6×10^8
LMG-7323	2	2	4.0×10^9
7324 _{r1}	6	3	8.4×10^8
7324 _{r2}	6	3	4.8×10^{11}
LMG-7325 _{i1}	3	2	9.2×10^7
LMG-7325 _{i2}	3	2	2.6×10^{11}
NCIMB-8910	4	2	2.7×10^{11}
NCIMB-8912	5	2	1.5×10^{11}
NCIMB-9066	4	3	3.6×10^9
NCIMB-9333	4	3	1.9×10^9
NCIMB-9499	4	2	7.0×10^8
NCIMB-9541	4	3	6.8×10^{11}
NCIMB-10267	5	3	1.9×10^9

minutos y enfriados en hielo mientras se procedía a su aplicación sobre las membranas de nylon suministradas con el kit de detección. La aplicación de las muestras se realizó mediante el Hybrid Dot Manifold de BRL, conectado a una bomba de vacío y las membranas se sometieron a 80 °C durante 2 horas para permitir la fijación de los ácidos nucleicos a las mismas.

Prehibridación, hibridación y detección

La prehibridación, hibridación y detección fueron realizadas siguiendo el protocolo recomendado para el kit PhotoGene Nucleic Acid Detection System de BRL. Solamente fueron incorporadas algunas modificaciones que favorecían la detección y así, la temperatura de lavado con 0.1 X SSC, conteniendo 1% SDS, fue de 60 °C, el volumen de solución de bloqueo fue de 1 ml/cm² de membrana, el tiempo que estuvieron sumergidas en 1 X tampón final de lavado fue de 90 minutos y la permanencia con el agente de detección en oscuridad a 37 °C de 30 minutos.

RESULTADOS

Se realizaron 4 ensayos cuya planificación y resultados aparecen recogidos en los Cuadros 3, 4, 5 y 6.

Para determinar la sensibilidad de la sonda frente a 15 aislados de Cmm se realizaron los ensayos 1 y 2, empleándose una escala de concentraciones entre 10^8 y 10^1 cel/ml para cada uno de ellos. Se obtuvieron señales positivas con LMG-5602, LMG-5604 y LMG-7333 para concentraciones mayores o iguales a 10^6 cel/ml. Una concentración mínima de 10^7 cel/ml fue necesaria para detectar PD-1386, RPZBC-1680, RPZBC-1683, RPZBC-2405, RPZBC-2408, LMG-2891, LMG-3690, LMG-3694 y LMG-5724, mientras que se requirió una concentración mínima de 10^8 cel/ml para visualizar RPZBC-1910. Con dos de los aislados, RPZBC-3108 y LMG-5610 no se obtuvieron señales positivas.

Los ensayos 3 y 4 se planificaron con objeto de estudiar la especificidad de la sonda frente a 15 ST, 15 SS, 2 Cms, 1 Ps, 1 Ecc, 8 Cmi, 7 *Arthrobacter sp.* y 3 aislados de Cmm. Se obtuvieron señales positivas con

Cuadro 3.–Distribución y resultados del ensayo de sensibilidad n.º 1 con la sonda MIC1

	1 Cmm PD-1386	2 Cmm RPZBC-1680	3 Cmm RPZBC-1683	4 Cmm RPZBC-1910	5 Cmm RPZBC-2405	6 Cmm RPZBC-2408	7 Cmm RPZBC-2891	8 Cmm RPZBC-3108
A	10 ⁸ +	10 ⁸ +	10 ⁸ +	10 ⁸ +?	10 ⁸ +	10 ⁸ +	10 ⁸ +	10 ⁸ -
B	10 ⁷ +	10 ⁷ +	10 ⁷ +	10 ⁷ -	10 ⁷ +	10 ⁷ +	10 ⁷ +	10 ⁷ -
C	10 ⁶ -	10 ⁶ -	10 ⁶ -	10 ⁶ -	10 ⁶ -	10 ⁶ -	10 ⁶ -	10 ⁶ -
D	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -
E	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -
F	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -
G	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -
H	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -

Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

+ : Señal positiva.

- : Señal negativa.

+? : Señal incierta.

Cuadro 4.–Distribución y resultados del ensayo de sensibilidad n.º 2 con la sonda MIC1

	1 Cmm LMG-3690	2 Cmm LMG-3694	3 Cmm LMG-5602	4 Cmm LMG-5604	5 Cmm LMG-5610	6 Cmm LMG-5724	7 Cmm LMG-7333
A	10 ⁸ +?	10 ⁸ +	10 ⁸ +	10 ⁸ +	10 ⁸ -	10 ⁸ +?	10 ⁸ +
B	10 ⁷ +?	10 ⁷ +	10 ⁷ +	10 ⁷ +	10 ⁷ -	10 ⁷ +	10 ⁷ +
C	10 ⁶ -	10 ⁶ -	10 ⁶ +?	10 ⁶ +	10 ⁶ -	10 ⁶ -	10 ⁶ +?
D	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -	10 ⁵ -
E	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -	10 ⁴ -
F	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -	10 ³ -
G	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -	10 ² -
H	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -	10 ¹ -

Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

+ : Señal positiva.

- : Señal negativa.

+? : Señal incierta.

Cuadro 5.-Distribución y resultados del ensayo de especificidad n.º 3 con la sonda MIC1

	1	2	3	4	5	6
A	Cmm LMG-5602 10 ⁸ +	ST-6 10 ⁸ -	ST-13 10 ⁸ -	ST-22 10 ⁸ -	SS-4 10 ⁸ -	SS-10 10 ⁸ -
B	Cmm LMG-5602 10 ⁷ +	ST-8 10 ⁸ -	ST-14 10 ⁸ -	ST-23 10 ⁸ -	SS-5 10 ⁸ +	SS-11 10 ⁸ -
C	Cmm LMG-5602 10 ⁶ +?	ST-9 10 ⁸ -	ST-17 10 ⁸ -	ST-24 10 ⁸ -	SS-6 10 ⁸ -	SS-12 10 ⁸ -
D	Cmm LMG-5604 10 ⁸ +	ST-10 10 ⁸ -	ST-19 10 ⁸ +	SS-1 10 ⁸ -	SS-7 10 ⁸ -	SS-13 10 ⁸ -
E	Cmm LMG-5604 10 ⁷ +	ST-11 10 ⁸ -	ST-20 10 ⁸ -	SS-2 10 ⁸ -	SS-8 10 ⁸ -	SS-14 10 ⁸ -
F	Cmm LMG-5604 10 ⁶ -	ST-12 10 ⁸ +?	ST-21 10 ⁸ -	SS-3 10 ⁸ -	SS-9 10 ⁸ -	SS-15 10 ⁸ -

Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

ST: Saprófito de planta de tomate.

SS: Saprófito de semilla de tomate.

+: Señal positiva.

-: Señal negativa.

+?: Señal incierta.

Cuadro 6.-Distribución y resultados de especificidad n.º 4 con la sonda MIC1

	1	2	3	4
A	Cmm PD-1386 10 ⁸ +	Cmi PD-239 10 ⁸ -	Cmi 7324 _{r1} 10 ⁸ -	<i>A. histidinolorans</i> NCIMB-9541 10 ⁸ -
B	Cmm LMG-5604 10 ⁸ +	Cmi LMG-7323 10 ⁸ -	Cmi 7324 _{r2} 10 ⁸ -	<i>A. chrystallopoites</i> NCIMB-9499 10 ⁸ -
C	Cms PD-323 10 ⁸ -	Cmi LMG-3675 10 ⁸ -	<i>A. oxidans</i> NCIMB-9333 10 ⁸ -	<i>A. polichromogenes</i> NCIMB-10267 10 ⁸ -
D	Cms PD-37 10 ⁸ -	Cmi LMG-3676 10 ⁸ -	<i>A. pascens</i> NCIMB-8910 10 ⁸ -	
E	Ps PD-1958 10 ⁸ -	Cmi LMG-7325 _{r1} 10 ⁸ -	<i>A. aurescens</i> NCIMB-8912 10 ⁸ -	
F	Ecc PD-578 10 ⁸ -	Cmi LMG-7325 _{r2} 10 ⁸ -	<i>A. ramosus</i> NCIMB-9066 10 ⁸ -	

Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.Cms: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.Cmi: *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*.Ps: *Pseudomonas solanacearum*.Ecc: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.A: *Arthrobacter*.

+: Señal positiva.

-: Señal negativa.

los 3 aislados Cmm, pero también con 2 de los saprófitos aislados de planta de tomate (ST-12 y ST-19) y con un saprófito aislado de semilla (SS-5).

DISCUSION

La sonda MIC1 detectó 13 de las 15 cepas de Cmm analizadas, no obteniéndose señales positivas con RPZBC-3108 y LMG-5610. Ensayos posteriores confirmaron que esas dos cepas no eran Cmm.

Cuando la sonda fue probada con los saprófitos de tomate y las restantes cepas se observaron señales positivas con 3 de los saprófitos. Este resultado concuerda con observaciones efectuadas por otros investigadores que encuentran reacciones cruzadas

no sólo con saprófitos aislados de tomate, sino también con determinadas cepas de Cmi (THOMPSON *et al.*, 1989).

Si bien la hibridación de cepas de Cmi con sondas de Cmm no representaría un grave problema al ser patógenos específicos de huéspedes distintos, no ocurre lo mismo en el caso de la hibridación con los saprófitos del tomate, ya que la existencia de estas bacterias es frecuente y podría inducir a error en la detección del patógeno.

Aunque estudios previos con la sonda MIC1 realizados por el Genetic Engineering Group de Lingby, indican que concentraciones de 10^5 cel/ml podrían ser también detectadas, la sensibilidad que parece tener la sonda MIC1 bajo nuestras condiciones de trabajo es 10^7 cel/ml, aunque en algunas ocasiones una concentración de 10^6 cel/ml pudo ser también detectada.

ABSTRACT

LLAMAS, S. y NOVAL, C., 1995: Molecular hybridization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and other bacterias with the probe MIC1. *Bol. San. Veg. Plagas*, **21**(1): 19-27.

Fifteen strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 8 of *C m* subsp. *insidiosus*, 2 of *C m* subsp. *sepedonicus*, 1 *Pseudomona solanacearum*, 1 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 7 of the genus *Arthrobacter* and 30 saprophytes were hybrid with a specific *C m* subsp. *michiganensis* probe MIC1 using Dot-Blot technique in order to determinate the specificity and the sensitivity of that probe, in the detection of tomato Canker bacteria

Key words: Tomato Canker, DNA probe.

REFERENCIAS

- EDELSTEIN, P. H., 1986: Evaluation of the Gen-probe DNA probe for the detection of Legionella in culture. *J. Clin. Microbiol.*, **23**: 481-484.
- ENDO, R., 1975: Biology and control of the bacteria canker disease of tomato. University of California, Davis, Department of Vegetable Crops. *Research Reports in Fresh Market Tomato Research*, n.º 14A.
- EPPO/OEPP, 1992: Quarantine procedure. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Test methods for tomato seeds. *Bull EPPO*, **22**: 219-224.
- FATMI, M. y SCHAAD, N. W., 1989: Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed. In *Detection of Bacteria in Seed and other Planting Material* (eds. Saettler, A. W.; Schaad, N. W. and Roth, D.A.), pp. 45-49. APS Press, St. Paul (US).
- GITATIS, R. D.; BEAVER, R. W. y DHANVANTARI, B. N., 1989: Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato transplants. In *Detection of Bacteria in Seed and other Planting Material* (eds. Saettler, A. W.; Schaad, N. W. and Roth, D.A.), pp. 116-122. APS Press, St. Paul (US).
- GROGAN, R. G. y KENDRICK, J. B., 1953: Seed transmission mode of overwintering and spread of bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology Abstracts*, **43**: 473.
- JOHANSEN, I. E.; RASMUSSEN, O. F. y HEIDE, M., 1989: Specific Identification of *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* by DNA-Hybridization Probes. *Phytopathological*, **79**(10): 1.019-1.023.
- LLAMAS, S.; SEISDEDOS, M. T. y NOVAL, C., 1993: Diagnóstico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *se-*

- pedonicum* mediante hibridación molecular con sondas de DNA no radiactivas. *Bol. San. Veg.*, **19**(1): 69-77.
- NOVAL, C., 1991: Bacterias Coreniformes. In: *Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos*. MAPA, pp. 169-202.
- NOVAL, C., 1990: Bacteriosis en el cultivo del tomate. En III Jornadas de Transferencia tecnológica. *El cultivo del tomate*. Ediciones y Promociones LAV. SL, pp. 34-43.
- RAT, B., 1984: Technique de détection de *Corynebacterium michiganense* dans les semences de tomate. In *report on the First International Workshop on Seed Bacteriology*, pp. 35-37. ISTA Zürich (CH).
- ROSEN, I. G., 1987: DNA probes in infectious disease diagnosis. *Pharm. Technol.*, **11**: 28-34.
- SCHAAD, N. W.; AZAD, H.; PEET, E. C. y PANOPOULOS, N. J., 1986: Cloned phaseolotoxin gene as a hybridization probe for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. (Abstr.) *Phytopathology*, **76**: 846.
- SMITH, E. F., 1910: A new tomato disease of economic importance. *Science* (N.S.) **31**: 794-796 (Abstr.).
- THOMPSON, E.; LEARY, J. V. y CHUN, W. W. C., 1989: Specific Detection of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by a Homologous DNA probe. *Phytopathology*, **79**(3): 311-314.
- VAN BRUNT, J. y KLAUSNER, A., 1987: Pushing probes to market. *Bio Technology*, **5**: 211-221.
- VAN VAERENBERGH, J. y CHAUVEAU, J. F., 1987: Detection of *Corynebacterium michiganense* in tomato seed lots. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **17**: 131-138.
- VAN VAERENBERGH, J.; CHAUVEAU, J. F. y FRANKEN, A. A. J. M., 1993: An indirect immunofluorescence plating assay for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **23** (in preparation).
- VIDAVER, A. K., 1982: The plant pathogenic corynebacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **36**: 495-517.
- VIDAVER, A. K. y STARR, M. P., 1981: *Phytopathogenic coryneform and related bacteria. The Prokaryotes*. Vol. II. M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows and H. G. Schlegel, eds. Spingessr-Verlag, Heidelberg.
- WEBER, A., 1992: Tomatsygdomme (Tomato diseases). Copenhagen. *Rev. Appl. Mycol.*, **2**: 246.

(Aceptado para su publicación: 21 febrero 1994)