

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto  
Politécnico Nacional  
LANGEBIO

Microbioma del Jitomate: determinante en la infección  
por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Tesis que presenta  
Lorena Rodríguez Orduña

Para obtener el título de  
Maestro en Ciencias  
con especialidad en Biotecnología de Plantas

Director de la tesis  
Francisco Barona Gómez

Irapuato, Guanajuato, Diciembre de 2016

# Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca con número 395802.

Al Dr. Francisco Barona Gómez, por ser un excelente asesor y equipo. Paco, gracias por creer en este proyecto y empujar para que hoy sea una realidad.

Al Comité tutorial, Dr. Rubén Rellán Álvarez y Dr. John Paul Délano Frier, porque sus aportaciones hicieron que este trabajo fuera más grande.

Dra. Karina Verdel Aranda por sus valiosas aportaciones en la mayoría de las secciones de este trabajo, por su apoyo técnico y revisión al documento final.

M. C. Hilda Eréndira Ramos Aboites, por su apoyo técnico en este proyecto.

M. C. Christian Eduardo Martínez Guerrero, por su apoyo técnico en este proyecto.

M. C. Nelly Sélem Mujica, por su apoyo técnico en este proyecto.

Dr. Pablo Cruz Morales, por su apoyo técnico en este proyecto.

Dra. Kena Casarrubias, por su apoyo en la sección de caracterización funcional de las cepas de Cmm.

Al Galerón 7, por sus aportaciones técnicas y valiosos comentarios en seminarios y en el día a día.

A todos los productores y personal de invernaderos que nos han abierto sus puertas para el desarrollo de este proyecto.

Familia y amigos, que me dieron su apoyo durante el tiempo en que desarrollé este trabajo.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Evolución de la Diversidad Metabólica, dirigido por el Dr. Francisco Barona Gómez, del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional. Con financiamiento del proyecto.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Rubén Rellán Álvarez

Dr. John Paul Délano Frier

# Índice general

Agradecimientos.....	2
Lista de tablas.....	¡Error! Marcador no definido.
Lista de figuras.....	¡Error! Marcador no definido.
Abreviaturas.....	5
Glosario.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
<b>La biología del jitomate</b> .....	18
<b>Interacción planta-microorganismo</b> .....	18
<b>Microorganismos antagonistas</b> .....	22
Antecedentes.....	27
Métodos.....	34
Análisis de resultados.....	38
<b>Capítulo 1. Cepario de Cmm y de endófitos</b> .....	38
<b>Capítulo 2. Genomas Cmm y endófitos</b> .....	49
<b>Capítulo 3. Análisis de filogenómica y de genómica comparada</b> .....	59
<b>Capítulo 4. Caracterización fenotípica de marcadores moleculares para distinción entre Cmm y endófitos.</b> .....	65
<b>Capítulo 5. Caracterización funcional del microbioma</b> .....	66
Discusión de resultados.....	67
Conclusiones.....	69
Perspectivas.....	70
Referencias.....	71

## Abreviaturas

c.b.p.	Cuanto baste para
°C	Grados Celsius
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
ACT	Artemis Comparison Tool
ADN	Acido desoxirribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de búsqueda de alineamientos)
CA	Campo abierto
Cmi	Clavibacter michiganensis subsp. Insidiosus
Cmm	Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis
Cmn	Clavibacter michiganensis subsp. Nebraskensis
Cms	Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus
Cmt	Clavibacter michiganensis subsp. Tessellarius
col	Colaboradores
Da	Daltons
dNTP	Dideoxinucleótidos
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EUA	Estados Unidos de América
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
GS	Genome sequencer (secuenciador genómico)
h	Horas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografía de líquidos de alta resolución)
ia	Abundancia relativa

IAT	Invernadero de alta tecnología
ICMS	Intact Cell Mass Spectrometry (espectrometría de masas de células)
IFAS	Indirect fluorescent antibody stain (inmunofluorescencia por tinción)
IMT	Invernadero de mediana tecnología
JC	Jukes-Cantor
K2	Kimura 2 parameter (Parámetro Kimura 2)
kb	Kilopares de bases
kDa	kilo Daltons
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
M	Molar
m/z	Relación masa carga
M9	Medio mínimo de cultivo
M9S	Medio mínimo de cultivo suplementado con líquido apoplástico
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (Desorción/ionización láser asistida por matriz- tiempo de vuelo)
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
Mb	Mega pares de bases
Mb PFL2011	Microbacterium sp. PFL2011
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
MLSA	Multilocus Sequence Analysis (análisis multilocus de secuencias)
mM	Milimolar
NAPPO	North American Plant Protection Organization (Organización norteamericana de protección a las plantas)
NBY	Nutrient broth and yeast agar (medio de cultivo de caldo nutritivo y extracto de levadura)
NCBI	National center for biotechnology information (Centro nacional para la información de biotecnología )
NOM	Norma Oficial Mexicana
ORF	Open reading frame (marco de lectura abierto)
PAI	Patogenicity island (Isla de patogenicidad)

pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (Regulador salino de fosfatos)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (electroforesis en campo
PTA-ELISA	Plate trapped enzyme linked immunosorbent assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas con antígeno unido a placa)
RAST	Rapid annotation using subsystem technology (Anotación rápida usando tecnología de subsistemas)
rpm	Revoluciones por minute
SDS	Dodecil sulfato sódico
T92	Tamura 3 parameter (Parámetro Tamura 3)
T92 + I	Tamura 3 parameter + sites evolutionary invariable (Parámetro Tamura 3 + sitios evolutivamente invariables)
TAE	Regulador compuesto por Tris base, ácido acético y EDTA
TBS	Tris buffered saline (Regulador salino de Tris)
TE	Regulador compuesto de tris y EDTA
Tm	Temperatura de fusión
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
UFC	Unidades Formadoras de colonias
UPGMA	Método de agrupamiento por pares no ponderados con media
V/V	Relación volumen-volumen

## Glosario

Agroambiente	Espacio o sitio de cultivo agrícola de características específicas.
Biodiversidad	Diversidad de especies que viven en un sitio y a su variabilidad genética.
Bootstrap	Análisis estadístico donde se hacen repeticiones de posibles formas de un dendrograma, un valor de 80 o mayor es aceptable.
Campo abierto	Campo de cultivo agrícola sin implementos de
Invernadero de alta tecnología	Sitio para cultivos agrícolas con mecanismos de control automatizados.
Invernadero de mediana tecnología	Sitio para cultivos agrícolas con mecanismos de control no automatizados.
Quorum sensing	Regulación de la expresión génica en respuesta a fluctuaciones en la densidad de la población celular.

## Resumen

La bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) perteneciente a la familia *Microbacteriaceae*, es la causante de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano del jitomate. Esta enfermedad tiene gran importancia económica ya que causa pérdidas en la producción de jitomate en todo el mundo. Actualmente este problema tiene un manejo preventivo a través de estrictas prácticas culturales y el uso de semillas certificadas; el diagnóstico aún tiene algunas limitaciones tales como baja sensibilidad y especificidad. Tampoco existe actualmente una estrategia para el control del cáncer bacteriano, y dado que las prácticas culturales no aseguran la ausencia de Cmm en los cultivos de producción de jitomate, esta enfermedad causa grandes pérdidas económicas. Durante los últimos años se han identificado algunos factores de virulencia de Cmm codificados en plásmidos y en el cromosoma; estudios recientes de genómica, transcriptómica y proteómica, han permitido conocer algunos de los eventos moleculares durante la interacción jitomate-Cmm, proporcionando información a nuevos genes que podrían ser útiles para el diagnóstico de Cmm y un posible control de la enfermedad. También se sabe que Cmm tiene una alta variabilidad genotípica y que hay cepas no patogénicas. Con este proyecto se buscó tener conocimiento sobre la naturaleza de Cmm en invernaderos de alta tecnología de la República Mexicana. Durante los últimos 6 años, Langebio en colaboración con empresas mexicanas productoras de jitomate ha realizado investigación en torno a Cmm, y actualmente se cuenta con una colección de más de 500 cepas con variabilidad en su origen geográfico, año de aislamiento, características genotípicas y fenotípicas, variedad de jitomate del cual fueron aisladas. Además se cuenta con una colección de endófitos de jitomate, específicamente asociados al cáncer bacteriano. El presente trabajo describe un proceso de investigación en el que se desarrollaron estrategias de diagnóstico y control de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), mediante la integración de datos genómicos y fenotípicos. Se encontró que el cáncer bacteriano puede ser causado por un comportamiento tipo “anfibionte” de las bacterias que conforman el microbioma del Jitomate: es decir, éstas incluido Cmm pueden actuar manera benéfica o dañina para las plantas según las condiciones. Además se plantea cómo implementar el plan para el enriquecimiento de las bases de datos actuales de modo que los diagnósticos realizados sean cada vez más certeros. Los resultados obtenidos en este proyecto así como la vinculación con los productores de jitomate permitirán en el corto plazo, el desarrollo de estrategias innovadoras, sustentables y con mayor efectividad para el diagnóstico molecular temprano y el control biológico, basadas en el conocimiento del microbioma y sus interacciones. Como perspectiva, se pretende integrar los conocimientos adquiridos en una estrategia de control y una de diagnóstico que el mercado actual demanda, teniendo impacto económico, ambiental y técnico.

## Abstract

The bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) belonging to the family *Microbacteriaceae*, is the cause of the disease known as bacterial cancer of tomato. This disease has great economic importance as it causes losses in the production of tomatoes around the world. Currently this problem has a preventive management through strict cultural practices and the use of certified seeds; the diagnosis still has some limitations such as low sensitivity and specificity. Nor is there a strategy for the control of bacterial cancer at present, and since cultural practices do not ensure the absence of Cmm in tomato production crops, this disease causes great economic losses. During the last few years, some virulence factors have been identified for Cmm codified in plasmids and in the chromosome; recent studies of genomics, transcriptomics and proteomics, have allowed us to know some of the molecular events during the tomato-Cmm interaction, provided information to new genes that could be useful for the diagnosis of Cmm and a possible control of the disease. It is also known that Cmm has a high genotypic variability and that there are non-pathogenic strains. With this project we sought to have knowledge about the nature of Cmm in high tech greenhouses of the Mexican Republic. During the last 6 years, Langebio, in collaboration with Mexican tomato-producing companies, has carried out research on Cmm, and currently has a collection of more than 500 strains with variability in their geographic origin, year of isolation, genotypic and phenotypic characteristics, a variety of tomatoes from which they were isolated. In addition there is a collection of tomato endophytes, specifically associated with bacterial cancer. The present work describes a research process in which strategies of diagnosis and control of the bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), through the integration of genomic and phenotypic data. It was found that bacterial cancer can be caused by an "amphibion" type of bacteria that make up the tomato microbiome: that is, these included Cmm can act as a beneficial or harmful way for plants according to conditions. It also considers how to implement the plan for the enrichment of the current databases so that the diagnoses are made more and more accurate. The results obtained in this project as well as the linkage with the tomato producers will allow, in the short term, the development of innovative, sustainable and more effective strategies for early molecular diagnosis and biological control, based on the knowledge of the microbiome and its Interactions. As a perspective, it is intended to integrate the acquired knowledge into a control strategy and a diagnostic strategy that the current market demands, having economic, environmental and technical impact.

# Introducción

## Descripción del problema

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, es causante de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano del jitomate. Este fitopatógeno, distribuido mundialmente (Figura 1), tiene alta importancia económica por las pérdidas que causa (Eichenlaub & Gartemann 2011). Desde que se reportó por primera vez en Michigan, EUA, en 1910, se han registrado diferentes grados de pérdida: más del 20 % en Ontario, Canadá (Dhanvantari, 1989; Dhanvantari and Brown, 1993), 20-30 % en Francia (Rat et al., 1991), 46 % en Illinois, EUA (Chang et al., 1992c).



Figura 1. Distribución mundial de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*.  
<http://www.plantwise.org/knowledgebank/pwmap.aspx?speciesid=10358&loc=global>

## Importancia económica

México se consolidó en 2014 como el primer exportador de jitomate del mundo, de acuerdo al SIAP durante 2014 la producción anual fue de 2.8 millones de toneladas y en datos del sistema producto las exportaciones fueron de 20 mil mdp. Para mantener la posición privilegiada debemos ser pioneros en el manejo del cáncer bacteriano, el principal patógeno de jitomate en invernadero que puede llegar a causar la pérdida total de la producción (manual de plagas y enfermedades del jitomate CESAVEG).

Mundialmente el jitomate es el segundo vegetal más consumido después de la papa (Foolad 2007). México es el principal proveedor de jitomate a Estados Unidos

de América: en términos de valor monetario con 80 % del total en 2009. Y en términos de volumen con 88 % del total importado (Agrícola el Rosal S.A. de C.V., comunicación personal).

Para el año 2020 se estima que la composición en edad de la población cambiará, bajando el porcentaje de población entre los 20 y 44 años e incrementándose el número de personas de 45 años en adelante. Se espera que este envejecimiento poblacional genere un mayor consumo de frutas y verduras. EUA depende de las importaciones para poder satisfacer la demanda de sus consumidores. En el 2007, en EUA, el consumo *per cápita* de jitomate fresco llegó a las 20.3 libras, siendo así, el cuarto vegetal más popular para consumo en fresco tras la papa, la lechuga y la cebolla (Agrícola el Rosal SA de CV, comunicación personal).

Considerando la importancia que el mercado del jitomate tiene para México en términos económicos, y el riesgo de la infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, es necesario tener herramientas de diagnóstico y control de dicha bacteria, que si bien se ha venido controlando por prácticas culturales, en algunos casos esto no llega a ser suficiente y resulta en grandes pérdidas económicas y en la generación de nuevos focos de infección.

### **El género *Clavibacter***

El género *Clavibacter* pertenece a la familia *Microbacteriaceae*, en la cual están la mayoría de los actinomicetos fitopatógenos, tales como *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Leifsonia* y *Rathayibacter*. El género *Clavibacter* sólo contiene una especie válidamente reconocida, *Clavibacter michiganensis*. Las primeras 5 subespecies que se describieron: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* (*Cmt*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (*Cmi*). *Cmm* es el causante del cáncer bacteriano en el jitomate (*Solanum lycopersicum*) y una de las bacterias patógenas más importantes de este género (Eichenlaub & Gartemann 2011). *Cms* da lugar a la necrosis bacteriana en la papa (*Solanum tuberosum*). El marchitamiento y el retraso en el crecimiento de la alfalfa (*Medicago sativa*) son causados por *Cmi*. Dada la severidad de los daños que causan, *Cmm*, *Cms* y *Cmi*

son consideradas por la Unión Europea como organismos de cuarentena <http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>. Mientras que *Cmn* causa el marchitamiento y el tizón en el maíz (*Zea mays*). En trigo (*Triticum aestivum*) *Cmt* causa pecas y manchas en las hojas. *Cmm* es un bacilo aerobio, no tiene micelio ni genera esporas, forma colonias mucoides y amarillas, por la presencia de exopolisacáridos y carotenoides respectivamente (Eichenlaub & Gartemann 2011).

### Genomas y variabilidad genética de *Cmm*

El primer genoma de *Cmm* fue reportado en el año 2008 (Gartemann et al. 2008), y algunos otros genomas cercanos se han secuenciado también: *Cmi* (Lu, y col., 2015), *Cms* (Bentley et al. 2008), *Cmn* (Tambong et al. 2015), *Cmc* (Oh et al. 2016), CF11 (Du Ying, Yuann Bo 2015), LMG 26808 (Zaluga et al. 2014).

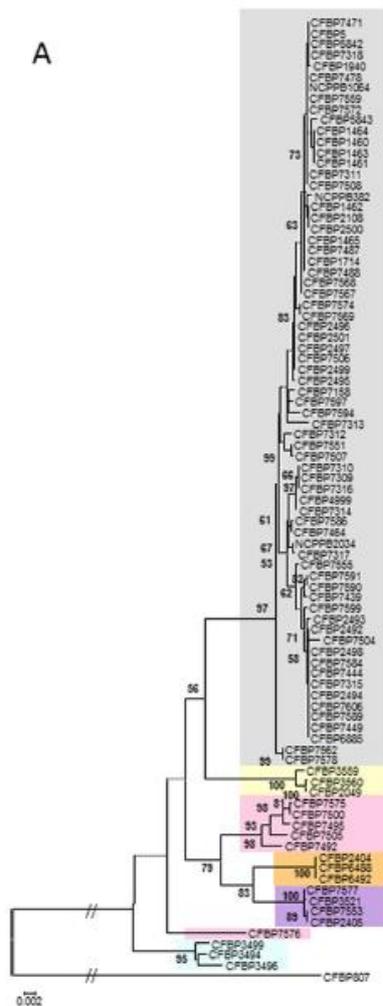


Figura 2. Filogenia basada en el concatenado de genes conservados, donde se diferencian las subespecies *Clavibacter michiganensis*.

Estudios en la cepa de referencia *Cmm* NCPPB382 demostraron que posee dos plásmidos circulares, pCM1 (Jahr et al. 2000) y pCM2 (Meletzus et al. 1993), los cuales tienen un rol importante en la virulencia. El plásmido pCM1 posee el gen *ce/A* que codifica para una endo- $\beta$ - 1,4 glucanasa (Jahr et al. 2000), mientras que el plásmido pCM2 posee el gen *patI* que codifica una serinproteasa (Jahr et al. 2000). Se han identificado además, genes ubicados en el cromosoma como *chpC*, una serin-proteasa y *tomA* que codifica una endo-1,4- $\beta$ -xilanasasa que pueden estar involucrados en la invasión al tejido vegetal y/o en la supresión de las respuestas de defensa (Kaup et al. 2005). Interesantemente *tomA* no se encuentra en las otras subespecies de *Clavibacter michiganensis*, pero si se ha reportado el gen ortólogo en *Streptomyces turgidiscabies* (Bignell et al. 2010) y en *Fusarium oxysporum* (Ito et al. 2004). El gen *tomA* codifica para una proteína denominada tomatinasa, la cual degrada la  $\alpha$ -tomatina, una saponina que produce la planta de jitomate para inhibir el crecimiento bacteriano (Kaup et al. 2005). Por otro lado, el análisis del genoma reveló que la región comprendida entre los genes *chp/tomA* (1.9 kb), está involucrada en la patogenicidad; en esta región hay genes que codifican serinproteasas, reguladores, transportadores y en su mayoría genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos (Gartemann et al. 2008).

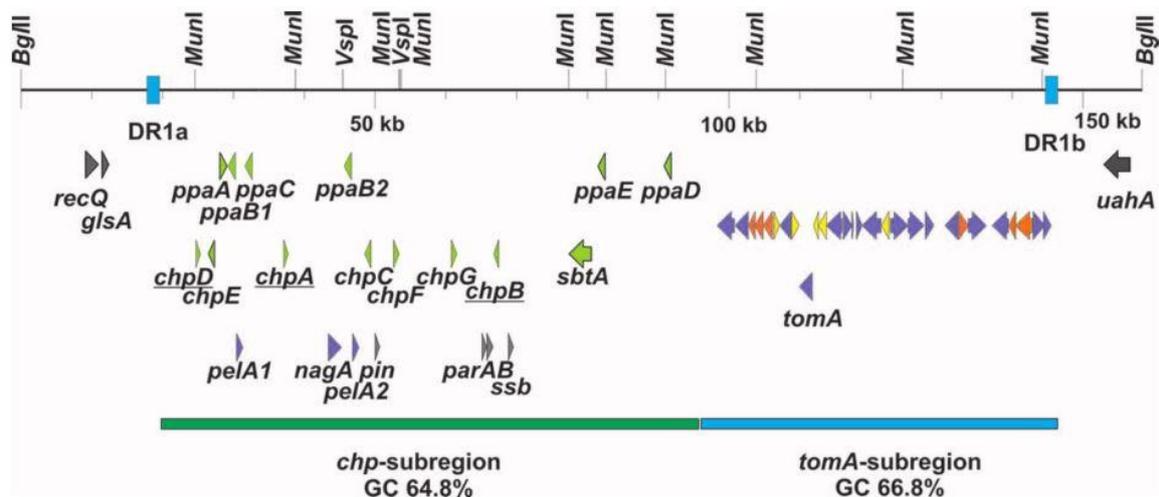


Figura 3. Región de genes de patogenicidad en el genoma de *Cmm*

Recientemente se han hecho estudios de la variabilidad genética de *Cmm* en diversos países como Irán (Nazari et al. 2007), Lituania (Burokienė 2006), Israel

(Kleitman et al. 2008) y las Islas Canarias (De León et. al., 2009). Sin embargo, no se ha encontrado correlación directa entre los haplotipos encontrados y sus características de origen o virulencia, lo cual sugiere la existencia en Cmm de capacidades eficientes de adaptación que le permitirá colonizar nuevos hospederos, tal es el caso del aislamiento de variantes fenotípicas de Cmm en *Capsicum annuum*, que se diferencian fenotípicamente y genotípicamente de las aisladas de jitomate (Yim et al. 2012). En Michigan, el primer lugar donde se reportó la presencia de Cmm, se realizó un estudio de genética de poblaciones tomando en cuenta seis genes de virulencia, los resultados mostraron que las poblaciones de Cmm tienen una estructura poblacional según su origen geográfico, y los autores sugieren una selección positiva y un bajo flujo génico actuando en esas poblaciones (Quesada Ocampo, y col. 2012).

Con el objetivo de encontrar variaciones genómicas asociadas con la virulencia en cepas de *Cms* se realizó un análisis de huella genómica. Se encontró baja variación entre cepas pero un grado de diferenciación entre las cepas virulentas y las avirulentas (Brown et al. 2002). El análisis de genómica comparativa entre *Cmm* y *Cms*, reveló que aunque son subespecies muy cercanas, existe un gran número de genes específicos de cada especie, lo cual probablemente contribuya con su especificidad de hospedero (Bentley et al. 2008). En cuanto a *Cmn*, se analizó la diversidad genética y la estructura poblacional en cepas aisladas entre los años 1969 y 2009, encontrándose baja similitud, y ninguna relación con la patogenicidad. En general no existe correlación entre el origen, historia o morfología de estas cepas, indicando posiblemente una historia reciente de evolución en *Cmn* (Agarkova et al. 2011).

Para conocer la diversidad de cepas no patogénicas, se llevó a cabo un estudio en el que 20 cepas aisladas de semillas y plantas asintomáticas, estas cepas no fueron capaces de producir síntomas en plantas inoculadas, los análisis de secuencias de *gyrB* y *dnaA* mostraron que pertenecen al clado de *Clavibacter michiganensis* pero son distinguibles de Cmm (Zaluga et al. 2013).

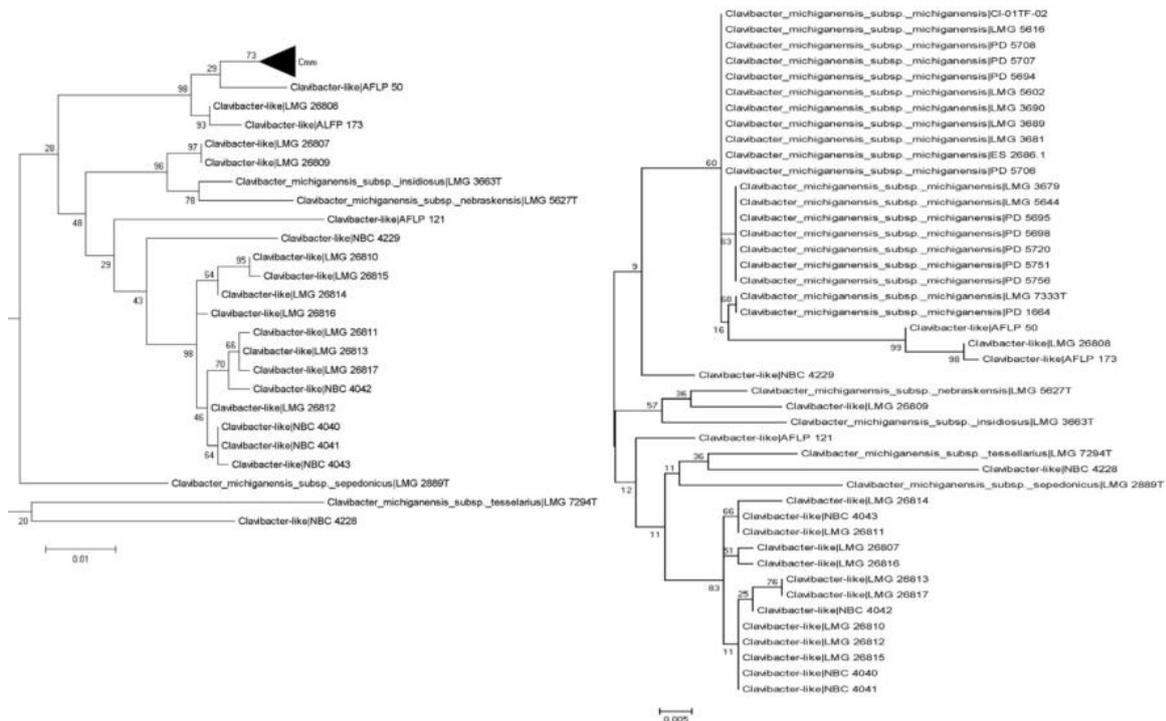


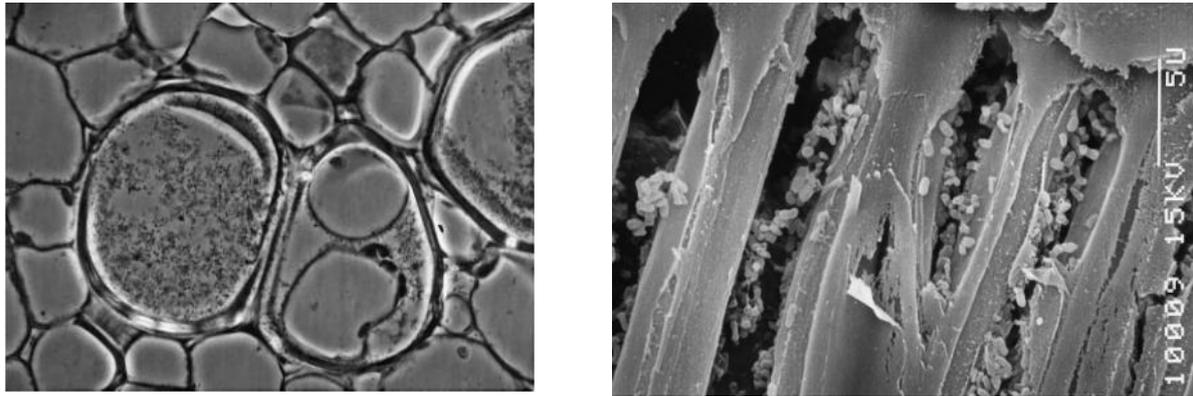
Figura 4. Análisis filogenético de secuencias de *dnaA* (izquierda) y *gyrB* (derecha). Maximum likelihood, 44 cepas, bootstrap 1000 réplicas. *dnaA*, 666 pb y *gyrB* 445 pb.

## Sintomatología

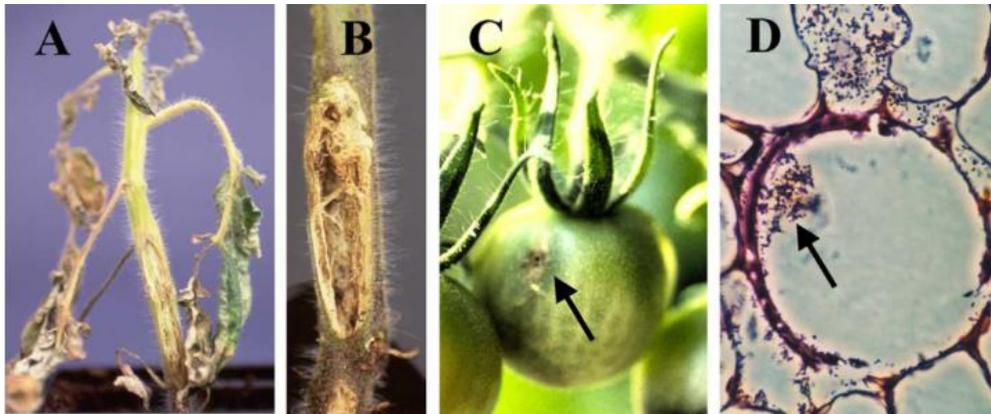
La enfermedad causada por *Cmm* en su interacción con el jitomate, provoca síntomas característicos: costras es los frutos conocidas como ojo de pájaro; en las hojas se presenta flacidez, áreas necróticas, pudrición y manchas amarillas así como marchitez unilateral; en los tallos hay decoloración, mancha amarillas y chancros; también se ve retrasado el crecimiento de la planta y finalmente muere (<http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsID=15338>). *Cmm* es considerado como un organismo biotrófico, al menos en las etapas tempranas de la enfermedad (Eichenlaub & Gartemann 2011), sin embargo puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en el suelo cuando se asocia a restos vegetales, generando un foco de infección latente (Jahr et al. 1999).



Figura 5. Síntomas causados por *Cmm*. A: Flacidez en hojas, B: Marchitez unilateral. C, D, E: Necrosis en tallos.



**Figura 6. A:** corte horizontal del tallo de una planta infectada con Cmm. The xylem vessel in the middle shows two tylosis bulging into the lumen of the vessel. This is a potential difference reaction of the plant to prevent the spreading of the bacteria. Light microscopy x600. **B:** Corte longitudinal del xilema, de una planta de jitomate infectada con Cmm, microscopía electronica.



**Figura 7. Síntomas en plantas de jitomate después de infección con Cmm. A:** Pudrición bacteriana. **B:** Chancro en el tallo. **C:** Ojo de pájaro. **D:** Corte en el xilema visto con microscopía, la pared está parcialmente destruida, se muestran agregados de bacteria. (Gartemann et al. 2003).

La infección en la planta ocurre a través de heridas, aunque las bacterias también pueden penetrar por estomas e hidátodos de las hojas para después establecerse como una infección sistémica en el xilema (Carlton et al. 1998). Después de algunos días, las plantas desarrollan los síntomas característicos del cáncer bacteriano. Durante una infección latente los síntomas no están presentes o pueden ser más ligeros, en estos casos las semillas infectadas resultan la principal forma de propagación de la enfermedad.

### **Mecanismo de infección**

Cmm posee dos plásmidos, pCM y pCM2, CelA que codifica para una celulasa se encuentra en pCM1 y PatI que codifica una serin proteasa se localiza en pCM2. En la cepa no virulenta CMM100 se vio que la inserción de cada uno de estos genes por separado puede convertir a la cepa en virulenta (Gartemann et al. 2003).

### **La biología del jitomate**

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas y es hospedero de más de 200 especies patógenas que pueden causar pérdidas económicas mundialmente, por ello un objetivo del mejoramiento del jitomate ha sido tener cultivos resistentes a patógenos. Para contrarrestar las pérdidas se ha recurrido al uso intensivo de compuestos químicos como pesticidas o fungicidas, sin embargo estos métodos no han sido completamente efectivos, aumentan costos de producción y no todos son aceptados por ley, sumado a que son de riesgo para los trabajadores, los consumidores y el ambiente.

Una alternativa al uso de agroquímicos es contar con cultivares de jitomate resistentes a estrés tanto biótico como abiótico (Bai & Lindhout 2007). Comparado con el rico reservorio de las especies silvestres, los cultivares de jitomate domesticado son genéticamente pobres, se estima que los genomas de cultivares de jitomate contienen menos del 5 % de variación genética. La domesticación ha generado un rango amplio de variación morfológica distinguiéndose de sus ancestros silvestres (Bai & Lindhout 2007).

Recientemente, el genoma del jitomate fue reportado, está formado por 12 cromosomas y fueron predichos 34 727 genes que codifican proteínas. Este hecho es de gran importancia pues será una herramienta para estudios de mejoramiento genético basados en la biodiversidad. (Sato et al. 2012).

### **Interacción planta-microorganismo**

Las plantas son una rica fuente de nutrientes y agua para los microorganismos, y a menudo son infectadas por muchas bacterias patógenas, causando serias consecuencias económicas. Estos patógenos son difundidos por viento, lluvia, insectos o prácticas de cultivo; entran en los tejidos vegetales por heridas u

orificios naturales como los estomas, ocupando los espacios intracelulares (apoplasto) o el xilema. El control de las enfermedades bacterianas es sólo parcialmente efectivo, por lo que se ha hecho investigación que ayude a elucidar aspectos fundamentales de la patogénesis microbiana y la respuesta del hospedero, permitiendo desarrollar métodos de control efectivos y sustentables. Las plantas tienen una compleja pared celular que las bacterias deben superar para obtener agua y nutrientes, atacando a esta barrera con factores de virulencia extracelulares como enzimas que degradan la pared celular.

Las plantas constituyen vastos y diversos nichos para organismos endófitos (microorganismos que no causan daño a su hospedero e incluso pueden proveerle beneficios). En general las bacterias endofíticas tienen densidades de población menores que las bacterias rizosféricas o las bacterias patógenas. No se sabe cómo es que las comunidades de endófitos interactúan dentro de la planta, aunque se ha especulado que los efectos benéficos son la combinación del efecto de sus actividades (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006).

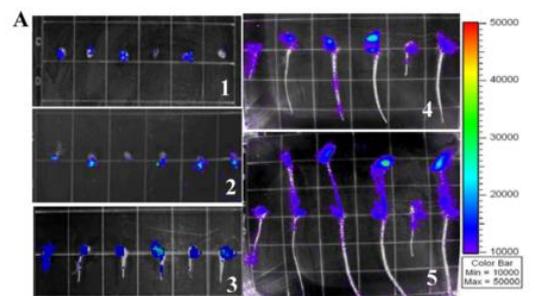
Estudios han determinado que la presencia de diferentes especies endofíticas dependen del genotipo, edad de la planta, del tipo de tejido muestreado y de la temporada del aislamiento. Se ha encontrado también que las poblaciones de especies endofíticas en las plantas dependen de la especie vegetal y de la etapa de desarrollo de la planta hospedera, entre otros factores (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006).

Estudios moleculares de la diversidad bacteriana endofítica han mostrado que hay una gran riqueza de este tipo de especies. Algunos endófitos son transmitidos por semillas y otros tienen mecanismos para colonizar las plantas. Los genes de las plantas expresados en presencia de endófitos proporcionan indicios acerca de los efectos de los endófitos en las plantas (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006).

### **Interacción jitomate-*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Se ha monitoreado la expresión génica de la planta de jitomate durante la enfermedad causada por *Cmm*, encontrándose que se inducen genes relacionados con la defensa, producción de radicales libres de oxígeno, síntesis de hormonas e

inducción de genes involucrados en la síntesis de etileno (una hormona implicada tanto en respuestas de defensa como de susceptibilidad a patógenos). Sin embargo, la contribución del etileno en el desarrollo del cáncer bacteriano aún no es claro (Balaji et al. 2008; Passam et al. 2007). Se conoce poco acerca de la interacción de jitomate-*Cmm*. Al respecto, la construcción de una cepa de *Cmm* bioluminiscente ha permitido conocer sobre el movimiento sistémico de la bacteria desde la semilla a la plántula (Xu et al. 2010). En un estudio reciente, se encontró que la planta genera una respuesta a la interacción produciendo fosfatasa, quinasas, fosfolipasas, enzimas involucradas en el metabolismo de metionina y en la biosíntesis de etileno y peroxidasas, entre otras (Savidor et al. 2012).



**Figura 8. Movimiento sistémico de *Cmm*, visto con luminiscencia.**

En este mismo estudio, se encontraron algunas proteínas de *Cmm* que pueden ser responsables del establecimiento de la enfermedad, específicamente miembros de las familias de serinproteasas como Ppa, Sbt y Chp, junto con xilanasas, pectato liasas y otras hidrolasas, involucradas en degradación de pared celular vegetal para la colonización de tejidos. (Savidor et al. 2012). Al analizar el transcriptoma de *Cmm* durante la interacción con su hospedero, se encontró la inducción de genes que codifican para polisacáridos extracelulares, proteínas de superficie y una posible perforina (CMM\_2382), la cual puede ser un nuevo factor de virulencia (Flügel et al. 2012).

En conjunto, estos estudios proporcionan información adicional referente a qué genes seleccionar para el diagnóstico de *Cmm* y cuáles son los mecanismos moleculares de defensa que se activan en la planta, proporcionando información relevante para el desarrollo de una estrategia de control. Sin embargo, es necesario realizar este tipo de estudios con cepas silvestres de *Cmm* debido a que

sólo se tiene información de la cepa de referencia NCPPB382 (Gartemann et al. 2008).

Se ha visto como una posibilidad la transformación genética de plantas de jitomate para que tengan resistencia a la infección por Cmm, una variedad de jitomate fue transformada insertándole dos genes: Snakin-2 (SN2), un péptido rico en proteínas con espectro antimicrobiano *in vitro* y extensin like protein (ELP), una glicoproteína rica en hidroxiprolina, componente de membrana. Estas líneas mostraron tolerancia y un retardo en la aparición de los síntomas por la infección con Cmm, comparado con las plantas no transformadas (Balaji & Smart 2012).

### **Endófitos**

Algunos endófitos están en la semilla (así aseguran su presencia en las nuevas plantas) y otros tienen mecanismos para colonizar las plantas. Los endófitos promueven el crecimiento de la planta (fijación de nitrógeno o producción de fitohormonas), suprimen patógenos, pueden ayudar a remover contaminantes, solubilizan fósforo, contribuyen con la asimilación de nitrógeno por las plantas. Se ha especulado que el efecto benéfico es el resultado de sus interacciones. En soya por ejemplo, la presencia de endófitos, depende del genotipo de la planta, edad, tipo de tejido, época de muestreo. Endófitos de la papa han mostrado actividad antagonista a hongos patógenos y también inhiben patógenos bacterianos de los géneros *Erwinia* y *Xanthomonas*. Los endófitos pueden expresar sus genes diferencialmente dependiendo de la colonización, estimular el crecimiento, suprimir patógenos o producir diferentes sustancias (Rosenblueth & Martínez-Romero 2006).

Algunos endófitos parecen ser patógenos latentes y la infección puede establecerse bajo ciertas condiciones, puede deberse a la presencia de otros microorganismos interactuando con el endófito. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* puede causar mild mottled stripe en la caña de azúcar pero no en todas las variedades. Además en el caso de patógenos de humanos que se comportan como oportunistas, como el caso de cepas de *Salmonella*.

## Microbioma del jitomate

Ottesen y col., publicaron en el 2012 un estudio acerca de la composición del microbioma del jitomate, en el que se buscaba *Salmonella*, se analizó la composición del microbioma por secciones: raíces, frutos, hojas, flores; del DNA total de cada una de estas partes se amplificaron regiones 16S y 18S para identificar a los microorganismos presentes. Este estudio es de gran importancia ya que nos permite conocer el microbioma nativo de las plantas de jitomate.

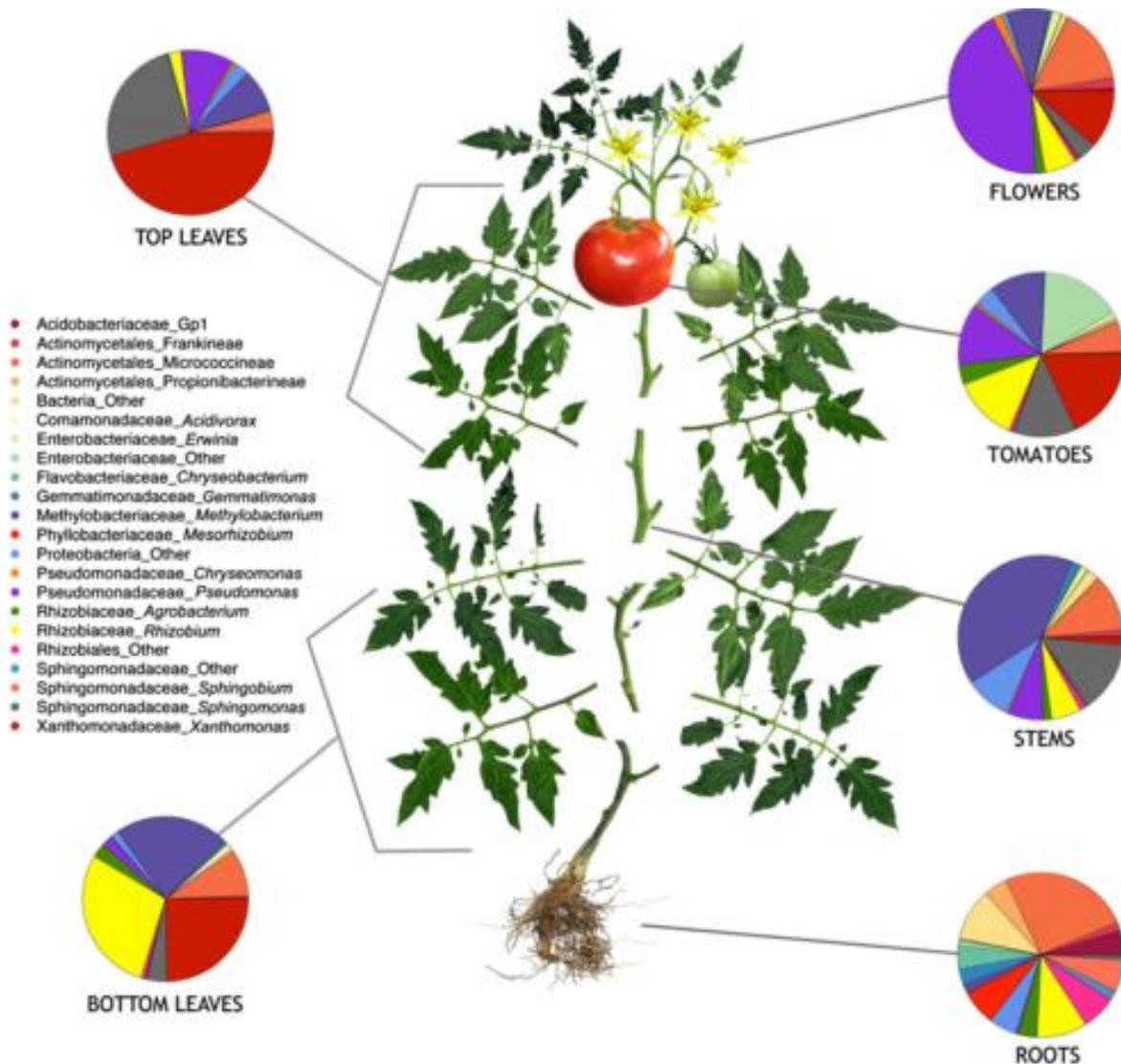


Figura 9. Diversidad bacteriana en raíces, hojas, tallos, frutos y flores de plantas de jitomate, usando 16SrRNA.

## Microorganismos antagonistas

Se ha explorado la capacidad de algunos microorganismos de inhibir el crecimiento de Cmm, (Boudyach et al. 2001), *Bacillus subtilis* (Jung et al. 2014), *Pseudomonas*

sp. (Lanteigne et al. 2012). En nuestra investigación se han aislado microorganismos del microbioma del jitomate como potenciales inhibidores del crecimiento de *Cmm*, presentando como ventaja su capacidad de colonizar la planta. Otra fuente de microorganismos inhibidores del crecimiento de *Cmm* son los aislados de suelo, ya que se ha encontrado que algunos de estos microorganismos tienen la capacidad de inhibir a *Cmm*.

### **Control actual**

Michigan continúa sufriendo pérdidas esporádicamente, lo que puede llegar a costar hasta \$300,000 para un productor en un solo año. La aplicación del hidróxido de cobre, estreptomycin y mancozeb ha demostrado que una aplicación a plántulas, puede reducir la cantidad de pérdidas (Hausbeck et al. 2000).

Para controlar la enfermedad se han usado antibióticos y sales de cobre pero no han sido efectivos, además del daño ambiental que causan. Un método efectivo de prevención es el uso de semillas certificadas, medidas de higiene basadas en estrictas prácticas culturales y la erradicación de las plantas infectadas; de aquí la importancia que existan métodos eficientes y de alta sensibilidad para el diagnóstico temprano de la enfermedad.

Recientemente se encontró que el bacteriófago CMP1 tiene enzimas con propiedades bacteriolíticas específicas para *Cmm*, además de no afectar a otras bacterias del suelo por lo que puede ser una posible herramienta para el biocontrol de *Cmm* (Wittmann et al. 2011).

Actualmente para la prevención y manejo del cáncer bacteriano se recomienda el uso de semillas certificadas y de prácticas culturales desde la producción de plántula como de fruto. Se han utilizado también antibióticos, hidróxido y sulfato de cobre, entre otros, pero no son totalmente efectivos (Hausbeck et al. 2000). Recientemente se ha explorado sobre la capacidad de algunos microorganismos de inhibir el crecimiento de *Cmm* (Jung et al. 2014) (Deng et al. 2015) (Lanteigne et al. 2012).

Un aspecto importante a considerar para el establecimiento de medidas de control y diagnóstico de fitopatógenos, es conocer la epidemiología y diversidad genética del agente etiológico en cuestión, ya que son aspectos que tendrán un impacto directo en la efectividad de dichas estrategias, lo cual es un objetivo del presente trabajo.

### **Diagnóstico**

Es importante generar un método de diagnóstico que distinga cepas de *Cmm* no patogénicas, pues podrían causar falsos positivos y hacer que se descarten lotes de semillas sanas (Yasuhara-Bell & Alvarez 2015).

Uno de los principales problemas es la dificultad para detectar la bacteria en etapas tempranas de la enfermedad y para hacerlo de manera precisa evitando falsos positivos o negativos. Los métodos utilizados incluyen desde pruebas inmunológicas que no tienen la sensibilidad suficiente hasta algunas técnicas moleculares que no poseen la especificidad necesaria (de León et al. 2006; Kokoskova et al. 2010; Cho et al. 2012).

Los métodos convencionales usados para la detección e identificación de *Cmm* incluyen pruebas bioquímicas, ensayos serológicos y perfiles de metabolismo de ácidos grasos. Estos métodos tienen importantes limitaciones, tales como baja sensibilidad y especificidad, además de que son tardados de realizar (Cho et al. 2012). Para la detección de *Cmm* por PCR se han usado oligonucleótidos como CMM-5 y CMM-6 que amplifican una región de *patI*, pero tienen la desventaja de que al ser de una región de plásmido puede dar falsos negativos, dada la movilidad e inestabilidad de los plásmidos (Dreier et. al., 1995).

En un estudio comparativo se mostró la sensibilidad y especificidad de métodos inmunológicos y PCR en el diagnóstico de *Cmm*, mostrando que el límite de detección de los inmunnodiagnósticos es de 106 UFC/mL, mientras que con PCR desde 104 UFC/mL son detectables. Es decir, la PCR es de 10 a 100 veces más sensible que los inmunnodiagnósticos. Además con los inmunnodiagnósticos se obtienen inespecificidades, al dar reacción cruzada con otras subespecies de

*Clavibacter michiganensis*, *Curtobacterium flaccumfaciens* y *Dickeya sp.*, (Kokoskova et al. 2011).

### **Tomatinasa**

Muchos hongos patógenos de jitomate producen enzimas extracelulares, llamadas tomatinasas. Tomatinasa degrada la alfa-tomatina en tomatidina (Td) y Lycotetraosa (Lt), sus roles fisiológicos en la interacción planta patógeno aún son desconocidos. Td y Lt suprimen el -oxidative burst- el cual se piensa que se requiere para las respuestas subsecuentes de defensa en muchas especies de plantas (Ito et al. 2004).

### **Michiganina**

Las moléculas secretadas por bacterias, sean antibióticos o bacteriocinas pueden tener un papel en la competencia, señalización, virulencia y esporulación (Holtsmark et al. 2008). La michiganina A, lantibiótico de tipo B, es una bacteriocina producida por Cmm, recientemente fue reportada su purificación y secuencia y se vio que inhibe el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus*, por lo que puede tener un papel en su control biológico (Holtsmark et al. 2006). Se sabe que los genes que codifican para la michiganina: *clvA*, *clvF* y *clvG* son únicos de Cmm y no en otras subespecies de *Clavibacter* ni en otros géneros de bacterias asociados a plantas (Yasuhara-Bell et al. 2014).

### **Análisis “ómicos” en bacterias**

Para evaluar por completo los sistemas biológicos y sus respuestas a factores ambientales, es necesario conocer la complejidad de las interacciones moleculares que ocurren en la célula, para esto se hacen caracterizaciones fenotípicas y se cuantifica ADN, mRNA, proteínas y metabolitos, así como su interacción. Para lo cual se han desarrollado las llamadas tecnologías “ómicas” como genómica (determinación y mapeo de secuencias de ADN), transcriptómica (nivel de transcripción de ARN), proteómica (medida de la abundancia de proteínas), interactómica (interacción molecular) y metabolómica (abundancia de metabolitos celulares). Pero ninguna de estas tecnologías por sí sola es suficiente para caracterizar la complejidad de los sistemas biológicos (Zhang et al. 2010). El desarrollo y bajo costo de nuevas tecnologías “ómicas” ha proporcionado mucha

información sobre genomas, necesitando de forma paralela del desarrollo de técnicas bioinformáticas para su análisis.

Las nuevas técnicas de secuenciación de ADN son rápidas y de alto rendimiento, tanto que los proyectos de secuenciación que parecían tardar muchos años con el método Sanger (Sanger y col., 1977), ahora pueden realizarse en pocas semanas. Un factor limitante de las nuevas tecnologías es el alto costo para generar secuencias con alto rendimiento, la reducción de errores en la secuenciación es otro factor, así como las lecturas de corta longitud, entre otras (Ansorge, 2009).

La técnica denominada MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight) ha contribuido al entendimiento de la química de las proteínas y la biología celular, identifica proteínas que se extraen de la célula, obteniéndose una huella en forma de espectros, donde se visualizan sus masas. Esta técnica ha sido aplicada recientemente para la caracterización taxonómica de microorganismos, también se ha usado como herramienta de diagnóstico; dentro de sus ventajas está que las muestras pueden ser procesadas sin previa separación por cromatografía o electroforesis, la comparación de los espectros de masas con secuencias genómicas enfatiza la validez de los patrones de picos como marcadores taxonómicos (Welker, 2011).

## Antecedentes

Desde 2010, se comenzó con la construcción del cepario de *Cmm*, haciendo diagnóstico a plantas de jitomate con síntomas de cáncer bacteriano. Las cepas fueron seleccionadas haciendo crecer colonias en el medio semiselectivo CMM1, a partir de tejido vegetal infectado; las colonias con el morfotipo de *Cmm* que amplificaron el gen *tomA* se consideraron como positivas. Durante la conformación del cepario han participado: Dr. José Pablo Lara Ávila, Dra. Karina Verdel Aranda, M.C. Hilda Eréndira Ramos Aboites.



**Figura 10. Construcción del cepario de *Cmm*. A: Plantas de jitomate infectadas. B: Aislamiento de colonias de *Cmm*. C: PCR de genes específicos de *Cmm*.**

Las primeras 20 cepas fueron caracterizadas fenotípicamente, y se secuenciaron 2 genomas, para conocer la diversidad genotípica y fenotípica que ya había sido reportada en colecciones de otros lugares: se han hecho estudios de la variabilidad genética de *Cmm* en diversos países como Irán (Nazari et al. 2007), Lituania (Burokiené 2006), Israel (Kleitman et al. 2008) y las Islas Canarias (De León y col., 2009). Sin embargo, no se ha encontrado correlación directa entre los haplotipos encontrados y sus características de origen o virulencia, lo cual sugiere la existencia en *Cmm* de capacidades eficientes de adaptación que le permitirá colonizar nuevos hospederos, tal es el caso del aislamiento de variantes fenotípicas de *Cmm* en *Capsicum annuum*, que se diferencian fenotípicamente y genotípicamente de las aisladas de jitomate (Yim y col., 2012). En Michigan, el primer lugar donde se reportó la presencia de *Cmm*, se realizó un estudio de genética de poblaciones tomando en cuenta seis genes de virulencia, los resultados mostraron que las poblaciones de *Cmm* tienen una estructura poblacional según su origen geográfico, y los autores sugieren una selección

positiva y un bajo flujo génico actuando en esas poblaciones (Quesada-Ocampo y col., 2011). Es importante tener en cuenta esta diversidad para la correcta selección de marcadores empleados en el diagnóstico molecular.

Con el apoyo del CESAPEG, logramos iniciar una colección con 20 cepas mexicanas de Cmm en un período aproximado de 2 años (2010-2012). En este periodo, se desarrolló una metodología molecular para el diagnóstico por PCR de cáncer bacteriano del jitomate, logrando sustituir para la empresa la prueba inmunológica. El gen utilizado para diagnosticar la presencia de Cmm en esta etapa, fue el que se suponía específico de esta bacteria, *tomA*, que codifica para una endo 1,4- $\beta$ -glicosidasa. Posteriormente, nuestros estudios genómicos demostraron que Cmm no es la única bacteria poseedora de esta secuencia génica, lo que ha dado lugar a una serie de planteamientos que se desarrollan más adelante.

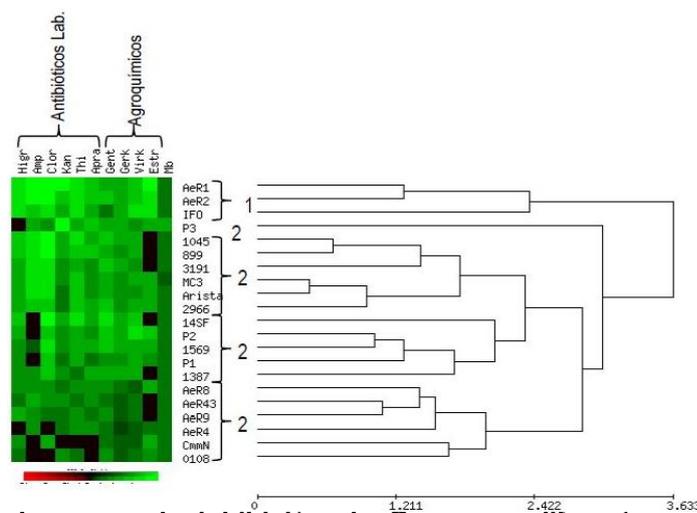
Tabla 1. Cepas aisladas de 2010 a 2011 por el método del medio semiselectivo.

ID	Identidad 16S	Estado	Agro-ambiente	Fecha de aislamiento	Fuente	ppaC	peIA1	ceIA	tomA	chpC	pat1	chpE	cvf - cvG	Grupo de PFGE	Grupo de susceptibilidad	Virulencia	Genoma	Genome sequencing methodology	Job ID RAST Annotation	Variabilidad Jtornate	Proveedor semilla	Medio de aislamiento
Mic1	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Michoacán	IAT	nov-10	EP	+	+	+	+	+	+	+	+	2B	1	SI	SI	MiSeq	151283	Comet	Monsanto	CMV1
Mic2	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Michoacán	IAT	nov-10	EP	+	+	-	+	+	+	+	NE	2B	1	No	SI	454	4563	Clermon	Syngenta	CMV1
Mic4	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Michoacán	IAT	dic-10	EP	+	+	+	+	+	+	+	NE	2B	2D	SI	SI	454	175715	Clermon	Syngenta	CMV1
Mic8	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Michoacán	IAT	ene-11	EP	+	+	+	+	+	+	+	+	2B	2D	SI	SI	MiSeq	175716	Clermon	Syngenta	CMV1
Mic9	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Michoacán	IAT	feb-11	EP	+	+	+	+	+	+	+	+	1B	2D	SI	SI	MiSeq	175717	Clermon	Syngenta	CMV1
Mic43	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Michoacán	IAT	mayo 2011	EP	+	+	+	+	+	+	+	+	1B	2D	SI	NE	NE	NE	Comet	Monsanto	CMV1
899	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Gto	IMT	ND	CESAVEG	+	+	+	+	+	-	+	+	1A	2B	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
1045	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Gto	IMT	ND	CESAVEG	+	+	+	+	+	+	+	+	1A	2B	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
2966	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Gto	IMT	ND	CESAVEG	+	+	+	+	-	+	+	+	2B	2B	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
145F	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Gto	IMT	ND	EP	+	+	+	+	+	+	+	+	2A	2C	NE	NE	NE	NE	ND	ND	CMV1
IFO	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	SLP	IMT	ND	IP/CYT	+	+	+	+	+	+	+	+	2B	1	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
Arista	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	SLP	CA	ND	IP/CYT	+	+	+	+	+	+	+	NE	2B	2B	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
1387	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Querétaro	IMT	ND	CESAVEG	+	+	+	+	+	+	+	+	2B	2C	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
1569	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Chiapas	IMT	ND	CESAVEG	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	2C	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
Cnmn	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Coahuila	CA	ND	EP	+	+	+	+	+	-	+	NE	ND	2D	NE	NE	NE	NE	ND	ND	CMV1
2191	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	Michoacán	IMT	ND	CESAVEG	+	+	+	+	+	+	+	NE	1B	2B	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
0108	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	ND	IMT	ND	CESAVEG	+	+	+	+	+	+	+	+	2B	2D	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
P1	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	ND	CA	ND	INIFAP	+	+	+	+	+	+	+	+	2A	2C	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
P2	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	ND	CA	ND	INIFAP	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	2C	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
P3	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	ND	CA	ND	INIFAP	+	+	+	+	+	+	+	NE	2A	2A	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
MC3	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	ND	CA	ND	INIFAP	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	2B	NE	NE	NE	NE	ND	ND	ND
PEL2011	Microbacterium	Gto	IAT	2011	EP	-	-	-	+	-	-	-	NE	ND	ND	NE	SI	454	NE	ND	ND	CMV1

Partiendo de las secuencias completas del gen 16S rRNA, se realizó una reconstrucción filogenética que mostró alta variabilidad genética entre las cepas; esto fue congruente con un análisis de electroforesis de campo pulsado (PFGE), el que reveló una diversidad del 83% a nivel de cromosoma, concluyéndose que existía en potencia una alta dinámica genómica como respuesta a procesos de adaptación a condiciones de invernadero en México.

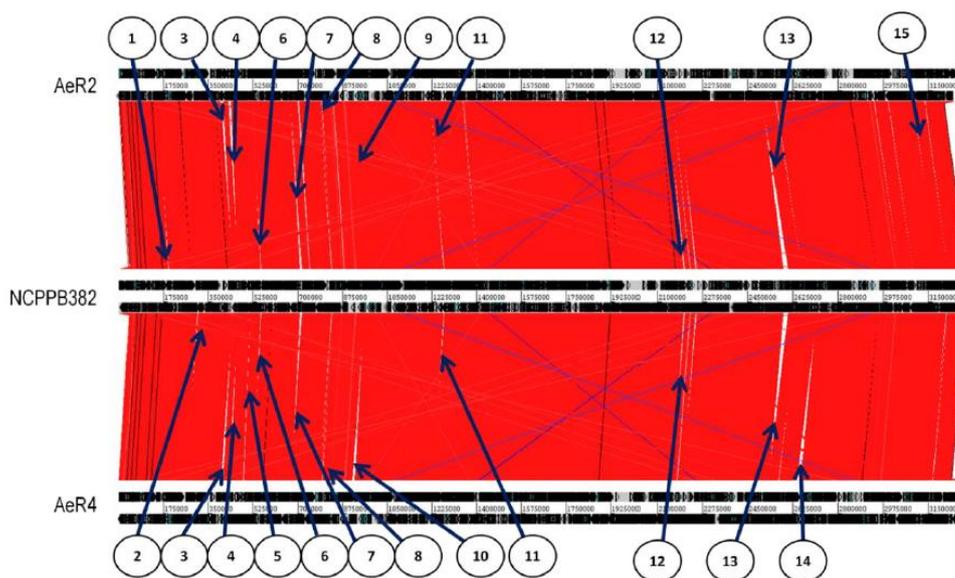
Por otro lado, se evaluó el grado de resistencia y susceptibilidad a antibióticos y productos agroquímicos de las 20 cepas aisladas. Los antibióticos analizados fueron la Higromicina B, Cloranfenicol, Apramicina, Kanamicina, Ampicilina y Tioestrepton; además de la Gentamicina y Estreptomicina, y los desinfectantes agroquímicos VirkonS y Gerklin, éstos de uso comercial.

Estos estudios demostraron que las cepas analizadas poseen diferente grado de respuesta a antibióticos y agroquímicos, destacándose la resistencia en algunos casos a antibióticos que pertenecen a la familia de los aminoglucósidos (por ejemplo, apramicina y gentamicina), los cuales son usados en condiciones de producción. Se confirmó, sin embargo, que VirkonS y Gerklin tuvieron el mismo efecto de inhibición en todas las cepas, por lo que se recomendó el uso de éstos en los procesos de desinfección de maquinaria, herramientas y estructuras, así como limitar el uso de antibióticos comerciales pertenecientes a los aminoglucósidos (Figura 11).



**Figura 11. Dendrograma de inhibición de Cmm por diferentes agentes. El color negro significa resistencia y las tonalidades de verde son más claras cuando la inhibición es mayor, la escala es la distancia euclidiana. Horizontalmente se observa la variación entre cepas y verticalmente las diferencias entre agentes de inhibición.**

Al analizar el grado de virulencia de seis aislados de Cmm en cultivares de jitomate de tres cultivares distintos, inoculando plántulas de cada cultivar de aproximadamente 30 días de edad, en condiciones semi-controladas de laboratorio, se evaluó el daño producido hasta los 20 días post-infección (dpi). Un cultivar mostró síntomas al día siguiente de la infección, lo cual sugiere un grado de susceptibilidad mayor que el de los otros dos. El índice de virulencia de cada cepa proporciona información acerca del daño en el tejido vegetal que produce cada cepa en un determinado lapso de tiempo, lo cual se podría traducir al estadio de la infección. Algo muy interesante es que una de las cepas resultó más agresiva solo en uno de los cultivares, y fue la menos agresiva en los otros dos. Esto sugiere la existencia de factores de virulencia en las cepas mexicanas que no han sido reportados en la cepa de referencia Cmm NCPPB382 y/o elementos de regulación génica cuya actividad biológica pueda ser diferente en cada cultivar. Se seleccionaron dos cepas de Cmm para secuenciar sus genomas, encontrando que en comparación con la cepa NCPPB382 presentan una alta variabilidad a nivel de genoma, figura 12.



**Figura 12. Comparativa genómica, que revela algunas regiones diferenciales entre cepas de Cmm. Los números indican la región que se describe en la tabla.**

Durante el análisis de cepas de un invernadero se encontró que había cepas con las características morfológicas de Cmm, y tenían el gen *tomA*, amplificado por PCR, pero una vez secuenciado su genoma se vio que se trataba de otros

géneros, estas resultaron de importancia dada su abundancia en los tejidos de las plantas enfermas, sus características morfológicas y la presencia del gen *tomA*, que hasta ahora no se había encontrado en cepas cercanas a Cmm, solamente en *Streptomyces scabies* (Seipke & Loria 2008).

Se continuó con el aislamiento de Cmm de plantas de jitomate con cáncer bacteriano, con el medio semiselectivo CMM1, tabla 2.

**Tabla 2. Cepas aisladas en este proyecto, de plantas de plantas enfermas, de invernaderos de alta tecnología.**

ID	Identidad 16S	Estado	Fecha de aislamiento	clvF - clvG	Genoma	Genome sequencing methodology	Job ID RAST Annotation
Mic79	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	ago-13	NE	NE	NE	
Mic80B	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	ago-13	NE	NE	NE	
Mic84B	Curtobacterium citreum_100	Michoacán	nov-13	NE	si	MiSeq	301131
Mic85C	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic86A	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	+	NE	NE	
Mic86B	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic87A	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	+	NE	NE	
Mic87B	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	+	NE	NE	
Mic87C	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic87D	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic87E	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic87F	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic87G	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	+	NE	NE	
Mic91A	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic91B	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic91C	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic93B	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	si	MiSeq	175718
Mic94	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic95	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic96A	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
MicB	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic97A	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	+	NE	NE	
Mic97B	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic99A	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic99B	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	NE	NE	NE	
Mic100A	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	+	NE	NE	
Mic100B	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	nov-13	+	NE	NE	
Mic103	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	dic-13	NE	NE	NE	
Mic106A	Micrococcus luteus strain N1	Michoacán	mar-14	NE	NE	NE	300756
Mic106C	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	mar-14	NE	NE	NE	
Mic106D	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	mar-14	NE	NE	NE	
Mic106E	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	mar-14	NE	NE	NE	
Mic106F	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	mar-14	+	NE	NE	
Mic106G	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	mar-14	NE	NE	NE	
Mic106I	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	mar-14	NE	NE	NE	
Mic106L	Clavibacter michiganensis s1	Michoacán	mar-14	+	NE	NE	

## Hipótesis

El cáncer bacteriano del Jitomate, causado por Cmm, está mediado por otras bacterias que también se comportan como anfibiontes.

## Objetivo general

Explorar el microbioma de plantas de jitomate asintomáticas y con cáncer bacteriano, para elucidar estrategias de diagnóstico y control de Cmm.

## Objetivos particulares

- Seleccionar muestras de semillas, plantas enfermas, y plantas asintomáticas y aislar sus endófitos.
- Secuenciar 16S de cepas seleccionadas.
- Hacer análisis genómicos de cepas seleccionadas de Cmm y de otras bacterias del microbioma del jitomate.

## Métodos

### **Formato de solicitud de diagnóstico**

Se elaboró un formato para que los productores soliciten el diagnóstico, en el que se incluyen los siguientes datos: fecha de toma de la muestra, fecha de envío, parte vegetal enviada, variedad de jitomate, síntomas observados, edad de la planta, localización de la planta en el invernadero, del solicitante: nombre, correo electrónico, teléfono.

### **Diagnóstico y aislamiento de Cmm**

Una vez que se recibió la planta se observaron los síntomas en hojas, tallos y frutos. Se colocan trozos de menos de un centímetro sobre una caja Petri con medio de cultivo CMM1 (Kaneshiro et al. 2006), incluyendo las zonas con síntomas y las que no los presentan. El medio CMM1 contiene sacarosa como fuente de carbono, cloruro de amonio y casaminoácidos como fuente de nitrógeno, cloruro de litio, ácido nalidíxico y sulfato de polimixina que inhiben el crecimiento de microorganismos Gram negativos, y cicloheximida que inhibe el crecimiento de hongos, de modo que este medio resulta muy útil, ya que reduce el espectro de bacterias u hongos que pudieran estar presentes en la planta y potencialmente crecer en el medio de cultivo y pudieran llegar a inhibir el crecimiento de *Cmm*. Se incubó durante 48 a 72 horas a 28 °C, pasado ese tiempo se podrán observar colonias con el morfotipo de *Cmm*: amarillas, mucoides, lisas, redondas; en este punto se pueden realizar tinciones de Gram (en un portaobjetos se coloca una asada de bacterias, se fijan con calor y se procede a realizar la tinción: teniendo el portaobjetos de manera horizontal se agregan unas gotas de solución de cristal violeta y después de un minuto se lava con agua, se agregan unas gotas de solución de yodo y se lava con agua después de un minuto, con el frotis inclinado se lava con una solución alcohol-acetona hasta que no se vean hilos de color, se agrega safranina y después de un minuto se lava con agua, una vez que se ha secado la muestra está lista para observarse al microscopio); y las que resulten Gram positivas se aíslan en una nueva caja con medio de cultivo LB, y se hizo PCR de colonia para *tomA* y *clvF*, o algún otro gen específico de *Cmm*. Cada cepa aislada identificada como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se conservó a -80 °C haciendo una mezcla de 500 µL de un cultivo bacteriano y 500

µL de glicerol que se congela con nitrógeno líquido e inmediatamente se almacena en un ultracongelador. Para confirmar la identidad de la cepa, se puede hacer PCR para el gen 16S rRNA y secuenciar.

### **Extracción de DNA de plantas**

Se seleccionó una muestra de tejido vegetal (aprox 0.1 g), se congeló en nitrógeno líquido y se molió con la ayuda de un pistilo de plástico en el tubo, se agregaron 300 µL de Plant DNA ZOL ® y se continuó moliendo, se agregaron 300 µL de cloroformo, y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos, se separó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo, se agregaron 100 µL de etanol absoluto y se centrifugó a 5 000 rpm durante 4 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 5 000 rpm durante 4 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de agua.

### **Extracción de DNA de bacterias**

Se preparó buffer de extracción: Tris 50 mM, pH 8, EDTA 50 mM, SDS 3%. Se resuspendió en 500 µl de amortiguador de lisis calentado previamente a 65 °C y se continuó triturando. Se incubó a 65 °C durante al menos 40 minutos. Se adicionaron 500 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, se separó la fase acuosa (superior) y se pasó a otro tubo. Se adicionaron 100 µl de acetato de sodio 3M y se mezcló por inversión. Se adicionó un mililitro de etanol absoluto y se incubó en hielo 25 min. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min, se eliminó el etanol y la pastilla se lavó con 400µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min, se eliminó el etanol y se secó a 37 °C. Se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O milliQ y se almacenó a -20 °C (Alves y col., 2001).

### **PCR**

Con el ADN obtenido se hizo PCR para amplificar un fragmento de 219 pb del gen *tomA* (Gene ID 5175749), en la mezcla de reacción se incluyó buffer MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1X, MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 3 mM, dNTP a concentración final de 0.2 mM, 0.13 µL de oligonucleótidos F y R 10 µM, 1 unidad

de Taq polimerasa, 2  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de ADN y la cantidad de agua suficiente para completar 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción. En un termociclador se realizó la desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de tres segmentos: 94 °C por 30 segundos, hibridación a 57 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C durante un minuto, la polimerización final se hizo a 72 °C por 5 min. Para visualizar los fragmentos amplificados se realizó un gel de electroforesis con agarosa en TAE 1X al 1.5 % que fue teñido con GelRed. Además, para verificar la confiabilidad de este análisis, se amplificó por PCR el gen 25S rARN (GenBank EU161982.1) del jitomate, siendo el control de calidad de la extracción. Si la reacción para el gen 25S y para *tomA* es positiva en ambos casos, indica que la muestra es positiva para *Cmm*. Si la reacción es positiva para 25S, pero no para *tomA* indica que la muestra es negativa para *Cmm*, si la reacción es negativa en ambos casos, el resultado no es confiable porque indicaría que el ADN extraído no es de buena calidad, probablemente debido a la presencia de inhibidores de la reacción. Además para cada gen deben hacerse los respectivos controles positivos y negativos. En el caso del gen 16S rARN en la mezcla de reacción se incluyó buffer  $\text{MgCl}_2$  a una concentración final de 1X,  $\text{MgCl}_2$  a una concentración final de 3 mM, dNTP a concentración final de 0.2 mM, 0.13  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos F y R 10  $\mu\text{M}$ , 1 unidad de Taq polimerasa, 2  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de ADN, 2.5  $\mu\text{L}$  de DMSO y la cantidad de agua suficiente para completar 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción. En un termociclador se realizó la desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de tres segmentos: 94 °C por 45 segundos, hibridación a 55 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C durante un minuto y medio, la polimerización final se hizo a 72 °C por 5 min. Para visualizar los fragmentos amplificados se hizo un gel de electroforesis con agarosa en TAE 1X al 1 % que fue teñido con bromuro de etidio. Posteriormente los fragmentos amplificados fueron secuenciados con Sanger, confirmando la identidad de las cepas aisladas al realizar un análisis de BLASTn con las secuencias obtenidas.

### **Secuenciación, ensamblado y anotación genómica**

El ADN genómico de cepas seleccionadas, fue secuenciado con la tecnología MiSeq. Las lecturas obtenidas se ensamblaron *de novo* con el programa Velvet, los contigs generados se ordenaron con el programa r2cat (Husemann & Stoye 2010),

tomando como referencia el genoma de *Cmm* NCPPB382. La predicción y anotación de genes se realizó en el servidor RAST.

### **Ensayos de virulencia**

Para conocer el grado de virulencia de cepas de *Cmm* aisladas de invernaderos de alta tecnología, en dos diferentes cultivares de jitomate, se utilizaron plantas de jitomate que fueron infectadas con cepas de *Cmm*. Para ello se obtuvieron cultivos de estas cepas en medio líquido LB durante 48 h a 30 °C. Se ajustó la absorbancia de cada una medida a 600 nm con amortiguador salino de fosfatos (PBS), a 0.2. El PBS se utilizó en lugar del medio de cultivo como diluyente del cultivo bacteriano para evitar la infección de las plantas por otros microorganismos. Se utilizaron 6 plantas para cada cepa. A cada planta se le inyectaron 100 µL (aprox.  $6 \times 10^7$  UFC) con ayuda de una jeringa de insulina, haciendo heridas en los tallos e inyectando la suspensión de bacterias. Se midió el daño en los siguientes 36 días después de la infección, a intervalos de dos o tres días de acuerdo a la siguiente escala de daño: 0, no hay daño; 1, una hoja afectada; 2, dos a cuatro hojas afectadas; 3, más de cuatro hojas afectadas; 4, una o más ramas completas afectadas; 5, daño generalizado (más de la mitad de la planta). NOTA: Las hojas afectadas pueden estar en diferentes o en la misma rama.

### **Identificación de endófitos.**

Para el aislamiento de endófitos se utilizaron 7 plantas enfermas y 9 asintomáticas, en total se aislaron 264 endófitos de los cuales 136 tuvieron el morfotipo de *Cmm*, y para estas se realizó PCR de los genes *clvF* y *tomA*, 20 de ellas resultaron positivas, 4 de ellas provenían de plantas asintomáticas y fueron seleccionadas dos cepas para secuenciar sus genomas.

# Análisis de resultados

## Capítulo 1. Cepario de Cmm y de endófitos

De manera constante se amplía el cepario, aislando cepas de plantas con síntomas de cáncer bacteriano, en el medio semiselectivo CMM1. La siguiente tabla muestra los aislados del periodo de abril de 2015 a de 2016.

**Tabla 3. Cepas aisladas de plantas con cáncer bacteriano, de invernaderos de ala tecnología.**

ID	Identidad 16S	Estado	Fecha de aislamiento	ppaC	tomA	clvF - clvG	Genoma	Genome sequencing methodology	Job ID RAST Annotation
N23A	Microbacterium sp. 141-3_99%	NL	abr-15	-	-	NE	Si	MiSeq	294413
N23B	Curtobacterium citreum strain S5-280_99%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23C	Curtobacterium citreum strain S5-280_99%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23D	Curtobacterium citreum strain S5-280_99%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23E	Curtobacterium citreum strain S5-280_99%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23F	Curtobacterium citreum strain S5-280_100%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23G	Curtobacterium citreum strain S5-280_100%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23H	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	NL	abr-15	+	+	+	Si	MiSeq	294414
N23I	Curtobacterium citreum strain S5-280_100%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23J	Curtobacterium citreum strain S5-280_99%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23K	Curtobacterium citreum strain S5-280_99%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23L	Curtobacterium citreum strain S5-280_99%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23M	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	NL	abr-15	+	+	+	NE	NE	
N23O	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	NL	abr-15	NE	NE	NE	NE	NE	
N23P	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	NL	abr-15	+	+	NE	NE	NE	
N23Q	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	NL	abr-15	NE	NE	NE	NE	NE	
N23R	Curtobacterium citreum strain S5-280_100%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
N23S	Curtobacterium citreum strain S5-280_100%	NL	abr-15	-	-	NE	NE	NE	
Mic122C	Curtobacterium flaccumfaciens strain KAR62_99%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic122D	Curtobacterium flaccumfaciens strain KAR62_100%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic122E	Curtobacterium flaccumfaciens strain KAR62_100%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic122F	Curtobacterium flaccumfaciens strain KAR62_16S_100%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic122G	Curtobacterium flaccumfaciens strain KAR62_100%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic123A	Microbacterium trichothecenolyticum strain N3G-5_10C	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic123B	Microbacterium trichothecenolyticum strain N3G-5_10C	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic123E	Microbacterium sp. FXJ8.202_99%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic123F	Microbacterium sp. FXJ8.202_99%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic124A	Microbacterium esteraromaticum strain BA1109_99%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic124C	Curtobacterium citreum strain S2-120_100%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic125A	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	Michoacan	jul-15	NE	NE	+	NE	NE	
Mic125C	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	Michoacan	jul-15	NE	NE	+	NE	NE	
Mic125D	Microbacterium sp. FXJ8.202_99%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic125E	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	Michoacan	jul-15	NE	NE	+	NE	NE	
Mic125F	Microbacterium sp. FXJ8.202_99%	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic125G	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic125H	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain I	Michoacan	jul-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic127A	NE	Michoacan	sep-15	NE	-	NE	NE	NE	
Mic127B	NE	Michoacan	sep-15	NE	-	NE	NE	NE	
Mic127C	NE	Michoacan	sep-15	NE	-	NE	NE	NE	
Mic127D	NE	Michoacan	sep-15	NE	+	NE	NE	NE	
Mic127E	NE	Michoacan	sep-15	NE	+	NE	NE	NE	
Mic128A	Curtobacterium_luteum_strain_S8-742	Michoacan	oct-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic128B	Curtobacterium_luteum_strain_S8742	Michoacan	oct-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic128C	NE	Michoacan	oct-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic128D	Curtobacterium_sp.HBUM178879	Michoacan	oct-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic128D	NE	Michoacan	oct-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic128F	NE	Michoacan	oct-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic129A	NE	Michoacan	nov-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic129B	NE	Michoacan	nov-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic129C	NE	Michoacan	nov-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic129D	NE	Michoacan	nov-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic129E	NE	Michoacan	nov-15	NE	NE	NE	NE	NE	
Mic129F	NE	Michoacan	nov-15	NE	NE	NE	NE	NE	
QB1A	NE	Querétaro	abr-16	NE	+	+	NE	NE	
QB1B	NE	Querétaro	abr-16	NE	+	+	NE	NE	
QB1C	NE	Querétaro	abr-16	NE	+	+	NE	NE	
Mic139A	NE	Michoacan	jun-16	NE	+	+	NE	NE	
Mic139B	NE	Michoacan	jun-16	NE	+	+	NE	NE	
Mic139C	NE	Michoacan	jun-16	NE	+	+	NE	NE	
Mic143	NE	Michoacan	ago-16	NE	+	+	NE	NE	

## Evento del invernadero N

Fueron colectadas de un invernadero de alta tecnología, 28 muestras de plantas con síntomas de cáncer bacteriano. El análisis microbiológico reveló 40 cepas distintas sospechosas de tratarse de Cmm, y bacterias relacionadas, mediante su crecimiento en medio de cultivo semi-selectivo, y en la mayoría de los casos la amplificación de alguno de los cinco genes de patogenicidad conocidos para Cmm, y usados en este estudio. En total, se realizaron 308 pruebas de PCR con oligonucleótidos específicos para dichos genes, diseñados usando secuencias de Cmm disponibles. De las 19 cepas aisladas, se han confirmado 17 como positivas para contener genes patogénicos característicos de Cmm. Algunas de las 40 cepas aisladas fueron caracterizadas a nivel de género y especie mediante la secuenciación de aproximadamente 1 Kbp del marcador molecular 16s rRNA, demostrándose que 2 de las cepas analizadas al momento son Cmm y 9 son especies pertenecientes a géneros cercanos también conocidas por ser fitopatogénicas. Se secuenciaron 3 genomas de cepas semi-aisladas y confirmadas por PCR (presencia el gen *tomA*) utilizando la técnica de Secuenciación por Síntesis (SBS) con el sistema MiSeq de Illumina.

Para cada una de las muestras se usaron 2 medios de cultivo semi-selectivos (CMM1 y BCT) para el aislamiento de Cmm. Las colonias obtenidas, las cuales mostraron características visibles y al microscopio, (así como tinción positiva para Gram) propias de Cmm, fueron aisladas (de 1 a 6 para cada muestra), y almacenadas para su estudio posterior. El resto del material fue descartado. En total, se aislaron 40 cepas, provenientes de las 28 muestras; es decir, para algunos aislados / muestras se cuenta con más de una cepa capaz de dar lugar a una unidad formadora de colonia.

Para la identificación de las cepas aisladas, se purificó DNA genómico de cultivos líquidos de cada microorganismo, y dicho DNA se empleó para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes de Cmm específicamente relacionados con la patogenicidad de este microorganismo. Los cinco genes seleccionados son *tomA*, *ppaC*, *ppaH*, *pelA1* y *celA*, y los oligos utilizados fueron previamente diseñados usando secuencias disponibles en las bases de datos

públicas, y confirmados con las secuencias disponibles en nuestro laboratorio a la fecha del análisis.

Para cada aislado se amplificaron al menos 2 de los genes de patogenicidad seleccionados, y se consideraron positivas aquellas muestras en las que al menos uno de los genes se pudo amplificar. De aquellas cepas consideradas positivas bajo el parámetro anterior se amplificó y secuenció el gen 16S rRNA para su análisis taxonómico. Para este análisis también se echó mano de las secuencias genómicas generadas por nosotros, durante este análisis como en otros proyectos.

Las secuencias tanto de genes específicos como genómicas fueron analizadas mediante herramientas bioinformáticas, incluyendo reconstrucciones filogenéticas, alineamientos múltiples de secuencia, desciframiento de secuencias genómicas (ensamblaje), y genómica comparada con énfasis en genes funcionales asociados a la patogenicidad y el metabolismo.

Derivado de este análisis hemos determinado que a pesar de la identificación positiva por PCR, específicamente del gen *tomA*, el diagnóstico demuestra que no en todos los casos se trata de Cmm. Debido a que durante nuestros esfuerzos para el aislamiento del agente causal de la infección, se han aislado microorganismos con características similares a las de Cmm y estos son abundantes y prevalentes en todas las muestras en nuestras condiciones de aislamiento, es probable que una bacteria relacionada taxonómicamente a Cmm (Microbacterias y/o Micrococaceas) sean también responsable de la infección.

Tabla 4. Cepas aisladas de plantas con cáncer bacteriano, de invernaderos de ala tecnología, en septiembre de 2014.

ID	Identidad 16S	Estado	ppaC	ppaH	tomA	clvF - clvG	Genoma	Genome sequencing methodology	Job ID RAST Annotation	Planta sana o enferma
N0	Microbacterium sp. 33_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
NO slow1	Microbacterium sp. 33_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
NO slow2	Microbacterium sp. 33_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
NO slow5	Microbacterium sp. 33_100%	NL	NE	NE	+	NE	si	MiSeq		Enferma
NO fast1	Microbacterium sp. HBUM178903	NL	NE	NE	+	NE	si	MiSeq		Enferma
Nfast 143	Microbacterium sp. 33_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
NA1A	Microbacterium schleiferi strain ZJY-902_99%	NL	NE	NE	+	NE	si	MiSeq		NA
NA1B	Microbacteriumsp.CO128_99%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA1C	Microbacterium sp. FXJ8.035D_99%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA1D	Microbacterium schleiferi strain 2PR54-18_99%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA1F	Microbacterium oxydans strain MNSH2-PHGII-1_99	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA2A	Microbacterium thalassium strain JQZLG-1_99%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA2B	Microbacterium paraoxydans strain PJM2_100%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA3A	Microbacterium sp. RRC_26_98%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA3B	Microbacterium sp. NC165_100%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA3C	Microbacterium sp. NCCP-569_100%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA3D	Pantoea dispersa strain TBRh9	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA3E	Microbacterium sp. 141-3_99%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA4A	Pantoea_dispersa_strainTBRh9	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA4B	Microbacterium sp. 141-3_100%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA4C	Microbacterium sp. 141-3	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
NA4D	Microbacterium sp. CT 6-04_99%	NL	NE	NE	+	NE	NE	NE		NA
N1A	Microbacterium sp. HBUM178903	NL	+	-	NE	NE	NE	NE		Enferma
N4A	Microbacterium imperiale strain LH-Y2_100%	NL	-	+	NE	NE	NE	NE		Enferma
N5A	Curtopacterium citreum_100%	NL	-	+	NE	NE	NE	NE	294399	Enferma
N9A	Pseudoclavibacter sp. JSM 2175001_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE	294403	Enferma
N9D	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis st	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE	301134	Enferma
N10A	Microbacterium sp. 37_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N10B	Pseudoclavibacter sp. HP10L_100%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N11B	Plantibacter sp. SR 5-10_100%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE	294409	Enferma
N11C	Microbacterium sp. 37_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE	294410	Enferma
N15B	Sanguibacter sp. b222	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE	294411	Enferma
N16B	Microbacterium testaceum strain 38A_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N16D	Microbacterium sp. 37_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N18B	Microbacterium sp. Vr21_100%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N20A	Microbacterium sp. Ld14_100%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N20B	Frigoribacterium sp. PDD-24b-20_100%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE	294412	Enferma
N22A	Curtopacterium sp. SE30_99%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N22B	Pseudoclavibacter sp. HP10L_100%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N22C	Microbacterium schleiferi strain NSH14_100%	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
N22D	Curtopacterium sp. SE30_Flavobacterium sp. I10A-(	NL	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
GNB	Microbacterium sp. CT 6-04_99%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
GNC	Microbacterium sp. G1Dc3_99%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
GND	Bacillus sp. 3HH-8_98%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G4G	Microbacterium sp. UIWRF0250_100%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G6A	Leifsonia sp. 8_1Ka_98%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	294415	Sana
G8H	Microbacterium oleivorans strain Ransu 1_100%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G11A	Microbacterium oleivorans strain BJC15-A40_99%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G11B	Microbacterium oleivorans strain BJC15-A40_100%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G11C	Microbacterium oxydans strain MNSH2-PHGII-1_10	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G13A	Microbacterium paraoxydans strain PJM2_100%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G13D	Microbacterium oleivorans strain Ransu 1_99%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G13C	Microbacterium sp. CC2D_99%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G14B	Pantoea dispersa strain TBRh9_100%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
G15A	Microbacterium sp. CT 6-04_99%	Gto	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Sana
Mic111	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis st	Mich	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
Mic112	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis st	Mich	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
Mic113	Microbacterium sp. CC2D_99%	Mich	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
Mic114	Microbacterium sp. MDT1-31-1_99%	Mich	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
Mic116A	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis st	Mich	NE	NE	NE	+	NE	NE		Enferma
Mic118C	Microbacterium sp. CBU032H_99%	Mich	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
Mic119A	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis st	Mich	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
Mic119B	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis st	Mich	NE	NE	NE	NE	NE	NE		Enferma
Mic119C	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis st	Mich	NE	NE	NE	+	NE	NE		Enferma
Mic119D	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis st	Mich	NE	NE	NE	+	NE	NE		Enferma

Se consideró importante la presencia de cepas cercanas taxonómicamente a Cmm, y que forman parte del microbioma del jitomate, por su posible comportamiento como anfibiontes. Un anfibionte es un organismo que puede tener una relación patogénica o simbiótica con otro organismo dependiendo del contexto (Cho & Blaser 2012).

#### **Evento 4 invernaderos**

Fueron visitados 4 invernaderos: MB, Q, Z, A. En cada uno, se tomaron 4 plantas de la misma variedad de jitomate: 2 asintomáticas y dos enfermas. Teniendo un total de 16 plantas. De estas se aislaron en un medio de cultivo semi-selectivo para Cmm, 93 cepas, con el morfotipo buscado, se les extrajo DNA y se les hizo PCR para dos genes marcadores. De las 17 cepas que dieron reacción positiva para ambos genes, se seleccionaron 11 para secuenciar su genoma mediante la plataforma de Illumina MiSeq, y las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante métodos filogenéticos y de genómica comparativa.

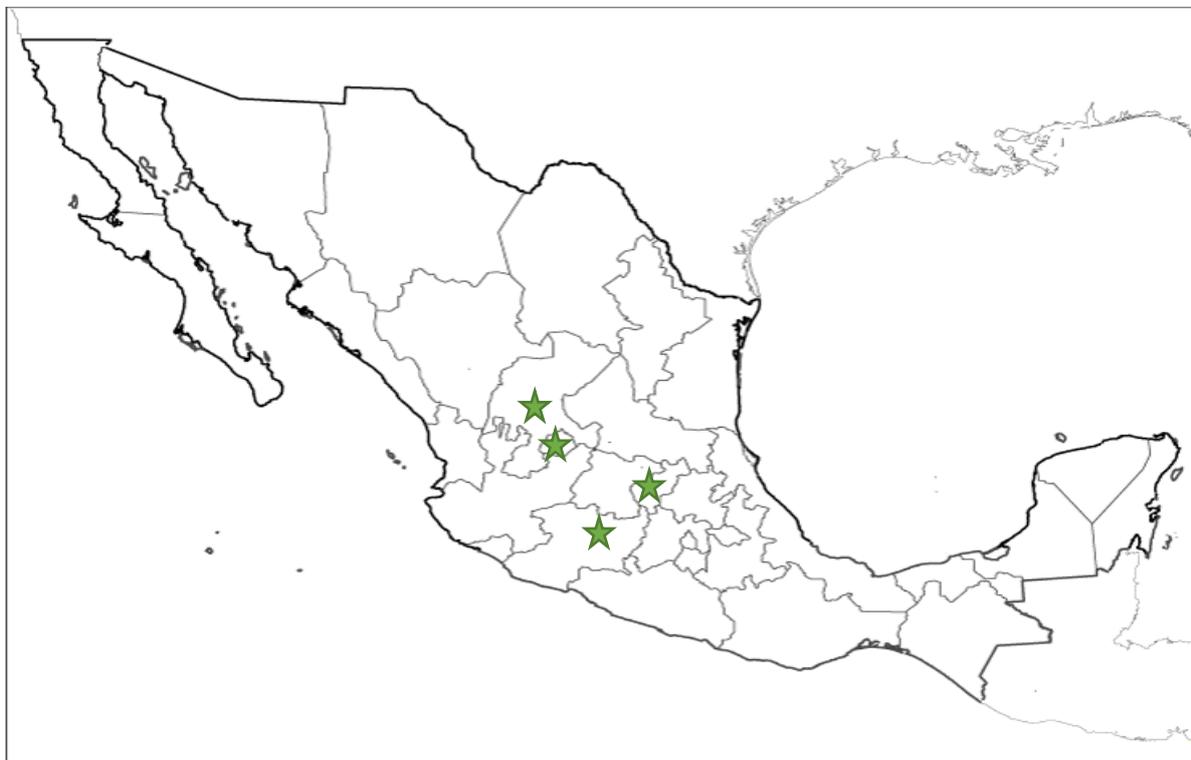


Figura 13. Ubicación de los invernaderos

**Tabla 5. Cepas aisladas de plantas con cáncer bacteriano, de invernaderos de alta tecnología, en diciembre de 2015.**

ID	Estado	Agro-ambiente	tomA	clvF - clvG	Genoma	Genome		Planta sana o enferma
						sequencing methodology	Job ID RAST Annotation	
Mic130A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic130B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic130C	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic130D	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic130E	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic130F	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic130G	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic130I	Michoacan	IAT	+	+	si	MiSeq	326020	Enferma
Mic131A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic131B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic131C	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic131E	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic132A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic132B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic132C	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic132E	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic132F	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic132G	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic132H	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic132I	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133C	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133D	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133F	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133G	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133H	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133I	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Mic133J	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Z1A	Zacatecas	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Z1B	Zacatecas	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Z1C	Zacatecas	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Z2A	Zacatecas	IAT	+	+	NE	MiSeq	326344	Enferma
Z2B	Zacatecas	IAT	+	+	NE	MiSeq	326022	Enferma
Z2C	Zacatecas	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Z3A	Zacatecas	IAT	-	-	NE	NE		Sana
Z3B	Zacatecas	IAT	-	-	NE	NE		Sana
Z3D	Zacatecas	IAT	+	+	NE	NE		Sana
Q1A	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Sana
Q1B	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Sana
Q2A	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Q2B	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Q2C	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Q2D	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Q3A	Querétaro	IAT	+	+	NE	NE	326740	Sana
Q3B	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Sana
Q3D	Querétaro	IAT	+	+	NE	MiSeq	326741	Sana
Q4A	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
Q4B	Querétaro	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
A1A	guascaliente	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
A1B	guascaliente	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
A2A	guascaliente	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
A3A	guascaliente	IAT	+	+	NE	MiSeq		Enferma
A3A	guascaliente	IAT	-	-	NE	NE	326023	Enferma
A3B	guascaliente	IAT	+	+	NE	MiSeq	326024	Enferma
A3B	guascaliente	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
A3C	guascaliente	IAT	+	+	NE	MiSeq	326025	Enferma
A3C	guascaliente	IAT	+	+	NE	MiSeq	326027	Enferma
A3D	guascaliente	IAT	+	+	NE	MiSeq	326030	Enferma
A4A	guascaliente	IAT	-	-	NE	NE		Sana
A4C	guascaliente	IAT	-	-	NE	NE		Sana
A4D	guascaliente	IAT	-	-	NE	NE		Sana
MB1A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1C	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1D	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1E	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1F	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1G	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1G	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1H	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB1I	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB2A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Sana
MB2B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Sana
MB2C	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Sana
MB3A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB3B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB3C	Michoacan	IAT	+	+	NE	MiSeq	326032	Enferma
MB3D	Michoacan	IAT	+	+	NE	NE		Enferma
MB3E	Michoacan	IAT	+	+	NE	MiSeq	326742	Enferma
MB3F	Michoacan	IAT	+	+	NE	MiSeq	326035	Enferma
MB4A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Sana
MB4A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Sana
MB4B	Michoacan	IAT	+	+	NE	NE	326037	Sana
MB4B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Sana
MB5A	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB5B	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB5C	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma
MB5D	Michoacan	IAT	-	-	NE	NE		Enferma

### **Aislamiento de endófitos.**

Se seleccionaron plantas de dos diferentes variedades de jitomate. De cada una de las plantas usadas para el aislamiento de endófitos se extrajo DNA genómico. En el tiempo 1 se tomaron 2 plantas de la variedad M (M1 y M2) y 2 de la variedad K (K1 y K2) y se aislaron sus endófitos; enseguida se infectaron con Cmm las plantas M2 y K2, una semana después, en el tiempo 2, se aislaron endófitos de M2 y K2, llamándose ahora M4 y K4 respectivamente. También se aislaron endófitos de M1 y K1, ahora M3 y K3 respectivamente. Además se incluyó un tercer tiempo en el que se aislaron endófitos de dos plantas infectadas con Cmm: K5 y M5. También se hizo este tipo de aislamiento para una planta proveniente de invernadero, E1.

Igualmente, se realizó el aislamiento para las plantas del evento 4 invernaderos. Las siguientes tablas muestran las cepas aisladas por el método de endófitos.



**Figura 14. A: Plantas de las cuales fueron aislados los endófitos. B: Síntomas característicos del cáncer bacteriano.**

**Tabla 6. Endófitos de plantas de jitomate enfermas y asintomáticas.**

ID	Identidad 16S	Estado	Fecha de aislamiento o	Planta sana o enferma	Fecha de infección	Medio de aislamiento	Morfotipo	ID	Identidad 16S	Estado	Fecha de aislamiento o	Planta sana o enferma	Fecha de infección	Medio de aislamiento	Morfotipo
E111	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	CMM1	amarillo claro	K454	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	M9	amarillo claro
E112	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	CMM1	amarillo	K511	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	CMM1	amarillo
E113	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	CMM1	amarillo	K512	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	CMM1	amarillo
E114	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	CMM1	amarillo claro	K513	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	CMM1	amarillo
E115	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	CMM1	amarillo	K521	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	BCT	like Cmm
E116	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	CMM1	amarillo	K522	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	BCT	like Cmm
E121	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	BCT	amarillo	K523	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	BCT	like Cmm
E122	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	BCT	amarillo	K531	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	D1	blanco
E123	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	BCT	amarillo	K541	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	ISP5	blanco
E131	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	D1	amarillo	K542	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	ISP5	transparente
E132	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	D1	blanca	K543	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	ISP5	like Cmm
E133	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	D1	blanca	K551	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	M9	blanco
E134	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	D1	amarillo	K552	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	M9	blanco
E141	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	ISP5	blanca	K553	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	M9	blanco
E142	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	ISP5	amarillo	K554	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	M9	blanco
E143	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	ISP5	amarillo	M111	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
E144	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	ISP5	blanca	M112	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
E145	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	ISP5	amarillo claro	M113	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
E151	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	M9	amarillo claro	M114	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	blanco
E152	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	M9	amarillo claro	M121	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	blanco
E153	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	M9	blanca	M122	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	blanco
E154	NE	Gto	02-oct	Enferma	ND	M9	amarillo claro	M123	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	blanco
K111	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M124	Microbacterium sp. MCCC	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	blanco
K112	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M131	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente
K113	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M132	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente
K114	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	blanco	M133	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente
K115	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M141	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	transparente
K116	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M142	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
K117	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M143	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
K118	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M144	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	transparente
K121	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	amarillo	M151	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K122	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	blanco	M152	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K123	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	amarillo	M153	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K131	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente/nada	M154	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K132	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	amarillo	M155	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K133	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	amarillo	M156	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K134	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	blanco	M211	Microbacterium sp. MCCC	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K141	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	blanco	M212	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K142	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	blanco	M213	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K143	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	blanco	M214	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo claro
K144	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	blanco	M221	Microbacterium sp. MCCC	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	like Cmm
K151	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco	M222	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	like Cmm
K152	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco	M223	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	like Cmm
K153	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco	M224	Microbacterium sp. MCCC	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	like Cmm
K211	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M231	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente
K212	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo claro	M232	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente
K213	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	blanco	M233	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente
K214	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo claro	M234	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente
K215	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M235	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente
K216	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M241	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
K217	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	CMM1	blanco	M242	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
K221	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	blanco	M243	Uncultured Acinetobacter	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
K222	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	blanco	M244	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
K223	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	BCT	blanco	M251	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K231	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	amarillo	M252	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K232	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	amarillo	M253	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K233	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	amarillo	M254	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K234	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	blanco	M256	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco
K235	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	amarillo	M311	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K236	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	blanco	M312	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K237	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	D1	transparente	M313	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K241	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro	M314	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K242	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro	M315	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K243	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro	M316	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	CMM1	like Cmm
K244	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro	M321	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	BCT	amarillo claro
K251	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco	M331	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	D1	blanco
K252	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco	M332	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	D1	blanco
K253	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco	M351	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	M9	blanco
K254	NE	Gto	15-sep	Sana	NA	M9	blanco	M352	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	M9	blanco
K312	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	CMM1	amarillo	M353	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	M9	transparente
K313	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	CMM1	naranja	M354	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	M9	transparente
K321	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	BCT	amarillo claro	M411	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo claro
K331	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	D1	amarillo claro	M412	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo claro
K332	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	D1	amarillo claro	M413	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo claro
K341	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro	M414	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo claro
K342	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro	M421	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	BCT	naranja
K343	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	ISP5	amarillo claro	M422	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	BCT	amarillo claro
K351	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	M9	blanco	M423	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	BCT	like Cmm
K352	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	M9	blanco	M431	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	D1	amarillo claro
K353	NE	Gto	21-sep	Sana	NA	M9	blanco	M432	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	D1	blanco
K411	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo	M433	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	D1	amarillo claro
K412	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo	M434	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	D1	amarillo claro
K413	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo	M435	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	D1	transparente
K414	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo	M441	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	ISP5	amarillo claro
K415	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo	M442	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	ISP5	amarillo claro
K416	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo claro	M443	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	ISP5	amarillo claro
K417	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	transparente	M451	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	M9	blanco
K418	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	CMM1	amarillo	M452	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	M9	blanco
K421	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	BCT	blanco	M453	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	M9	blanco
K423	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	BCT	blanco	M454	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	M9	amarillo claro
K424	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	BCT	amarillo	M511	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	CMM1	like Cmm
K431	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	D1	transparente	M512	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	CMM1	like Cmm
K432	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	D1	transparente	M513	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	CMM1	like Cmm
K433	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	D1	transparente	M514	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	CMM1	like Cmm
K434	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	ISP5	transparente	M521	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	BCT	like Cmm
K441	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	ISP5	blanco	M522	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	BCT	like Cmm
K442	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	ISP5	blanco	M523	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	BCT	like Cmm
K443	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	ISP5	blanco	M531	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	D1	blanco
K451	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	M9	amarillo claro	M532	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	D1	blanco
K452	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	M9	amarillo claro	M533	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	D1	blanco
K453	NE	Gto	23-sep	Enferma	15-sep	M9	amarillo claro	M534	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	D1	blanco
								M541	NE	Gto	02-oct	Enferma	21-sep	ISP5	amarillo claro
								M542</							

**Tabla 7. Endófitos de plantas del evento 4 invernaderos.**

ID	Identidad 16S	Estado	Fecha de aislamiento	Planta sana o enferma	Fecha de infección	Medio de aislamiento	Morfotipo
C152 (C15X)	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	M9	
C151	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	M9	
C112	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	CMM1	
C113	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	CMM1	
C111	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	CMM1	
C241	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	ISP5	
C244	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	ISP5	
C243	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	ISP5	
C213	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	CMM1	
C214 (C21X)	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	CMM1	
C212	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	CMM1	
C211	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	CMM1	
M631	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	D1	
M633	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	D1	
M634	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	D1	
M643	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	ISP5	
M614	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	CMM1	
M613	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	CMM1	
M653	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	M9	
M642	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	ISP5	
M612	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	CMM1	
M611	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	CMM1	
M641	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	ISP5	
M661	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	D3	
M651	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	M9	
M652	NE	Queretaro	04-nov	Sana	NA	M9	
M712	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	CMM1	
M751	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	M9	
M741	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	ISP5	
M743	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	ISP5	
M711	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	CMM1	
M713	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	CMM1	
M753 (M75X)	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	M9	
M742	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	ISP5	
M752	NE	Queretaro	04-nov	Enferma	NA	M9	
B164	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	D3	amarillo
B145	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	ISP5	
B152	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	M9	like Cmm
B162	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	D3	amarillo
B163	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	D3	amarillo
B144	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
B113	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	CMM1	like Cmm
B111	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	CMM1	like Cmm
B143	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
B161	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	D3	amarillo
B141	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
B142	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	ISP5	amarillo claro
B114	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	CMM1	like Cmm
B151	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	M9	like Cmm
B112	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	CMM1	naranja
B115	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	CMM1	like Cmm
B153	NE	Michoacan	15-dic	Sana	NA	M9	like Cmm

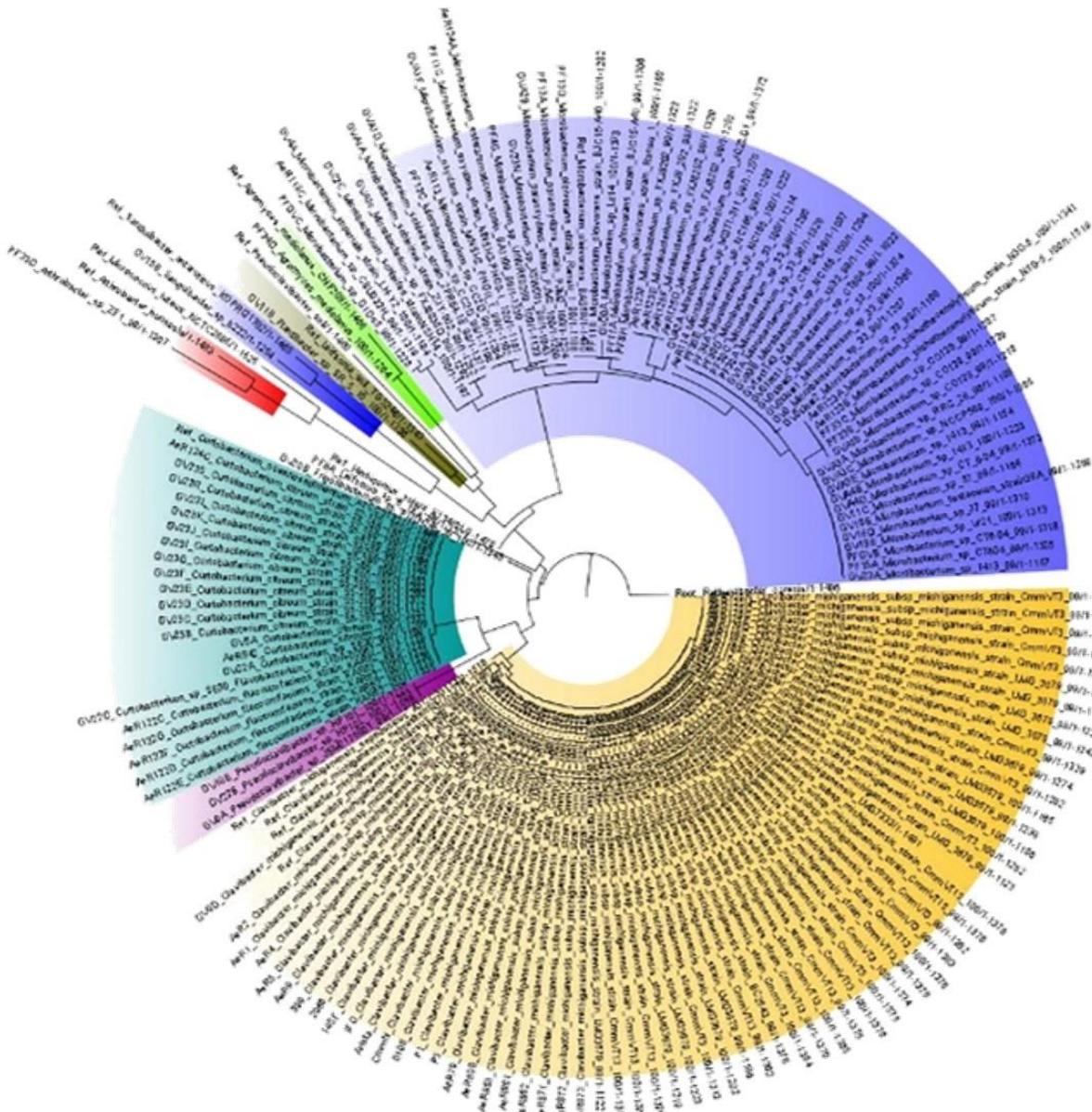


Figura 15. Filogenia de 16S, de la colección de cepas aisladas de plantas de jitomate.

### Aislados de endófitos de plántulas de jitomate

Con el objetivo de conocer qué bacterias se encuentran presentes en la semilla, sin que el sustrato tenga influencia, se crecieron plántulas a partir de semillas de 4 variedades distintas, en medio MS. Para cada variedad se utilizaron 9 semillas (3 en cada frasco) que fueron desinfectadas, y se crecieron durante dos semanas con fotoperiodo. Una vez que se tuvieron las plántulas, se aislaron sus endófitos en 5 medios de cultivo para tener la mayor cantidad posible de colonias, CMM1, BCT, D1, ISP5, M9, D3, CMM1sa, MH.

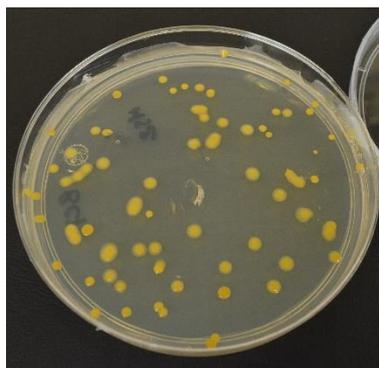
Se logaron obtener 7 colonias: M852, M841, S141, P171, W131, M842, P121.



**Figura 16. Aislamiento de endófitos de plántulas de jitomate**

### **Aislados de endófitos de semillas de jitomate**

De semillas de sólo una variedad de jitomate se extrajo DNA, se colocó 1 g de semillas en buffer de extracción y se incubó a 4 °C por 14 horas, luego se maceró y el sobrenadante se colocó en medio CMM1 y BCT. Se incubó por 3 días y se aislaron las colonias. Se seleccionaron 5 colonias (MSeed1 a MSeed5) y se identificaron por secuenciación del gen 16S rRNA, resultando ser *Curtobacterium* sp.



**Figura 17. Colonias de *Curtobacterium* sp. en medio semiselectivo.**

## Capítulo 2. Genomas Cmm y endófitos

Para secuenciar los genomas, se seleccionaron las cepas por su virulencia, cobertura geográfica, temporalidad o variedad de jitomate de la que fueron aisladas.

### Evento del invernadero N

Se secuenciaron los genomas de tres de los aislados obtenidos, seleccionados por ser morfológicamente similares a *Clavibacter*, poseer *tomA* y provenir de esfuerzos de aislamiento tempranos (primeros tres días) de tejido infectado. Las secuencias obtenidas, después de ser tratadas, proveyeron de ensamblajes genómicos con la suficiente profundidad (22X a 48X), en un número de contigs razonable (259 a 532) para llevar a cabo análisis más detallados. En todos los casos se encontraron más de un organismo, muy cercanos entre ellos (todos pertenecientes a la familia Micrococacceae), lo que si bien proveyó indicios del tipo de infección, dificultó el análisis de las secuencias.

**Tabla 8. Resultados de la secuenciación genómica de 3 semi-aislados**

Cepa	Pureza (Basada en % de GC)	Tamaño del ensamble	Contenido de GC	N's totales	Contigs totales	Profundidad
<b>NFAST</b>	Una señal &	5882188	0.71520533	123727	259	48.734
<b>NSLOW</b>	Doble señal *	2546322	0.7258627	232744	238	30.79
<b>NAGUA</b>	Una señal &	3563820	0.70487226	443317	532	22.607

\* Después de filtrar por GC; & Los genomas no se pudieron separar por GC, aunque se encontró evidencia de diversidad genética de más de un organismo muy cercano a Micrococacceae.

### Análisis taxonómicos

Se elaboraron tres árboles filogenéticos para realizar la identificación taxonómica de las cepas cuyo genoma fue secuenciado (NAGua, NFAst y NABove). El primer árbol consistió en secuencias del 16S rRNA; posteriormente se realizó un segundo árbol con secuencias de *rpoB*, y finalmente, al no obtenerse suficiente resolución con éstos, se realizó un tercer estudio concatenando los genes *rpoB*, *gyrB*, *ppk*, *dnaK*, *recA* y *atpD* de acuerdo a la metodología de Jacques y col., 2012.

Los análisis taxonómicos de los aislados NAGua, NFAst y NABove confirmaron que éstos no son *Cmm*, sino que pertenecen a otros géneros bacterianos. Así mismo,

que sus genomas contienen diversidad genética proveniente de más de un organismo. NFast es un aislado de dos genomas de los géneros *Micrococcus* y *Microbacterium*, mientras que en NAgua sólo se detectaron marcadores del género *Microbacterium*, y en NAbove del género *Micrococcus*, claramente de dos especies distintas en ambos casos. Esto se soporta por el tamaño de los genomas que se encontraron antes del depurado de los genomas (Tabla 9), en particular en NAgua. Todos estos géneros están estrechamente relacionados a *Clavibacter* y pertenecen al suborden *Micrococccineae*, el cual incluye otras actinobacterias patógenas de plantas, por ejemplo, *Leifsonia* (muy cercano a *Herbiconiux*, también identificado como N11b) y *Curtobacterium*.

Para la construcción del árbol de 16S se consideraron además de NAgua, NFast y NAbove, las secuencias N9 (Cmm), N11 y N16 provenientes de aislados de este proyecto. Se utilizaron también las secuencias históricas Mic1, Mic2, Mic4, Mic8, Mic9, Mic43, Mic93, Mic112, Mic119, provenientes de otros invernaderos de alta tecnología en México; y finalmente secuencias de la base datos, pública (NCBI) del género *Clavibacter*, así como de otros organismos cercanos a NFast y NAgua detectados mediante el uso de BLAST.

A

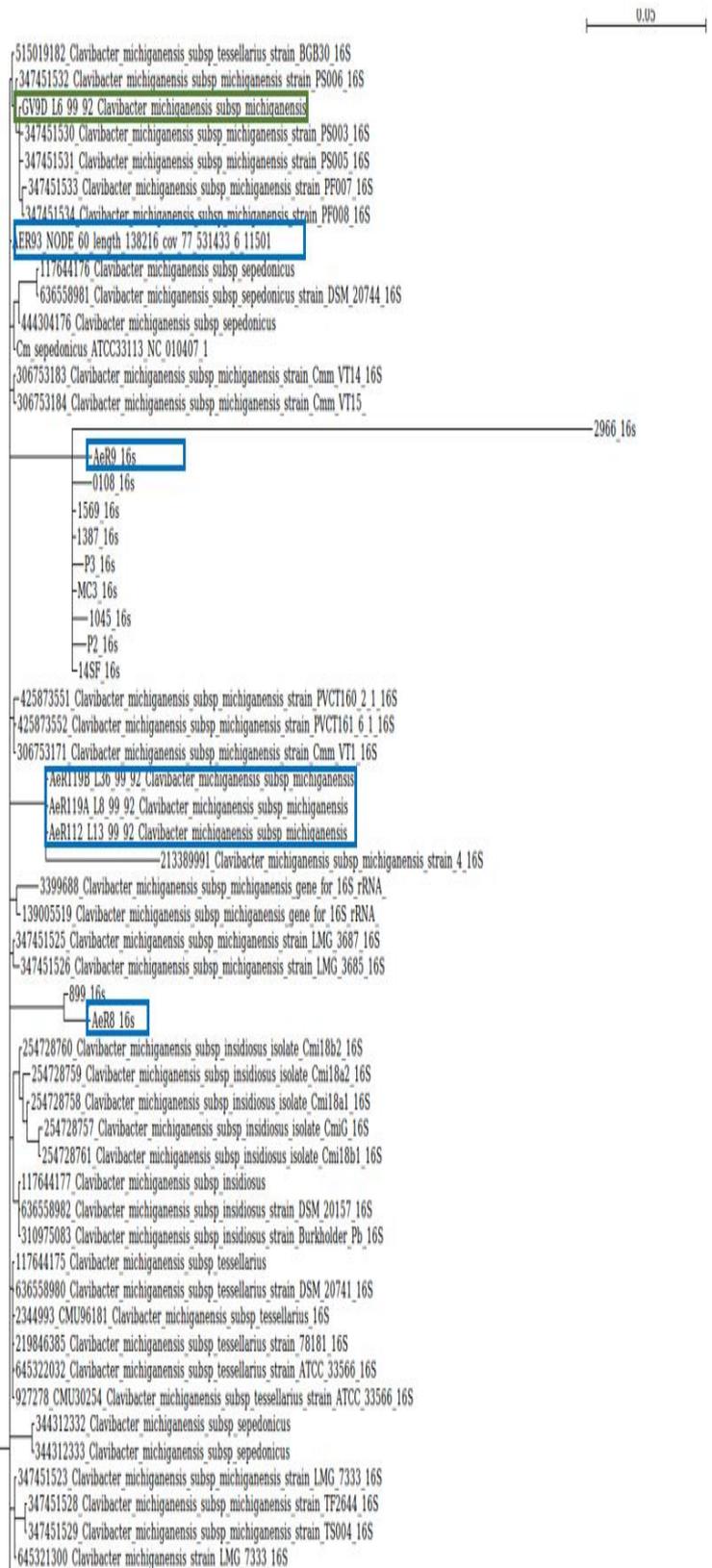


Figura 17. Árbol de 16s de secuencias de *Clavibacter michiganensis* y organismos cercanos (Continúa)

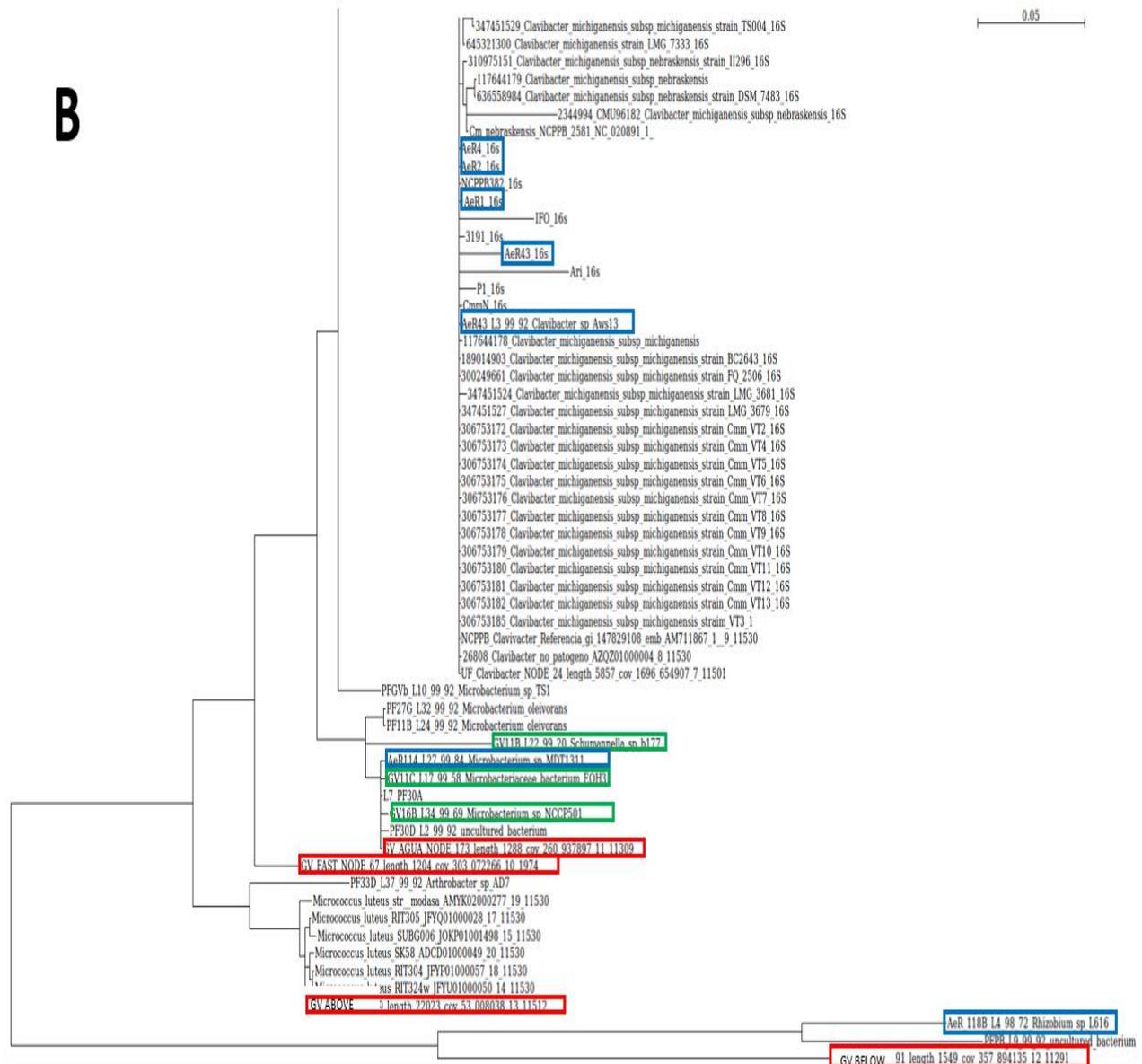
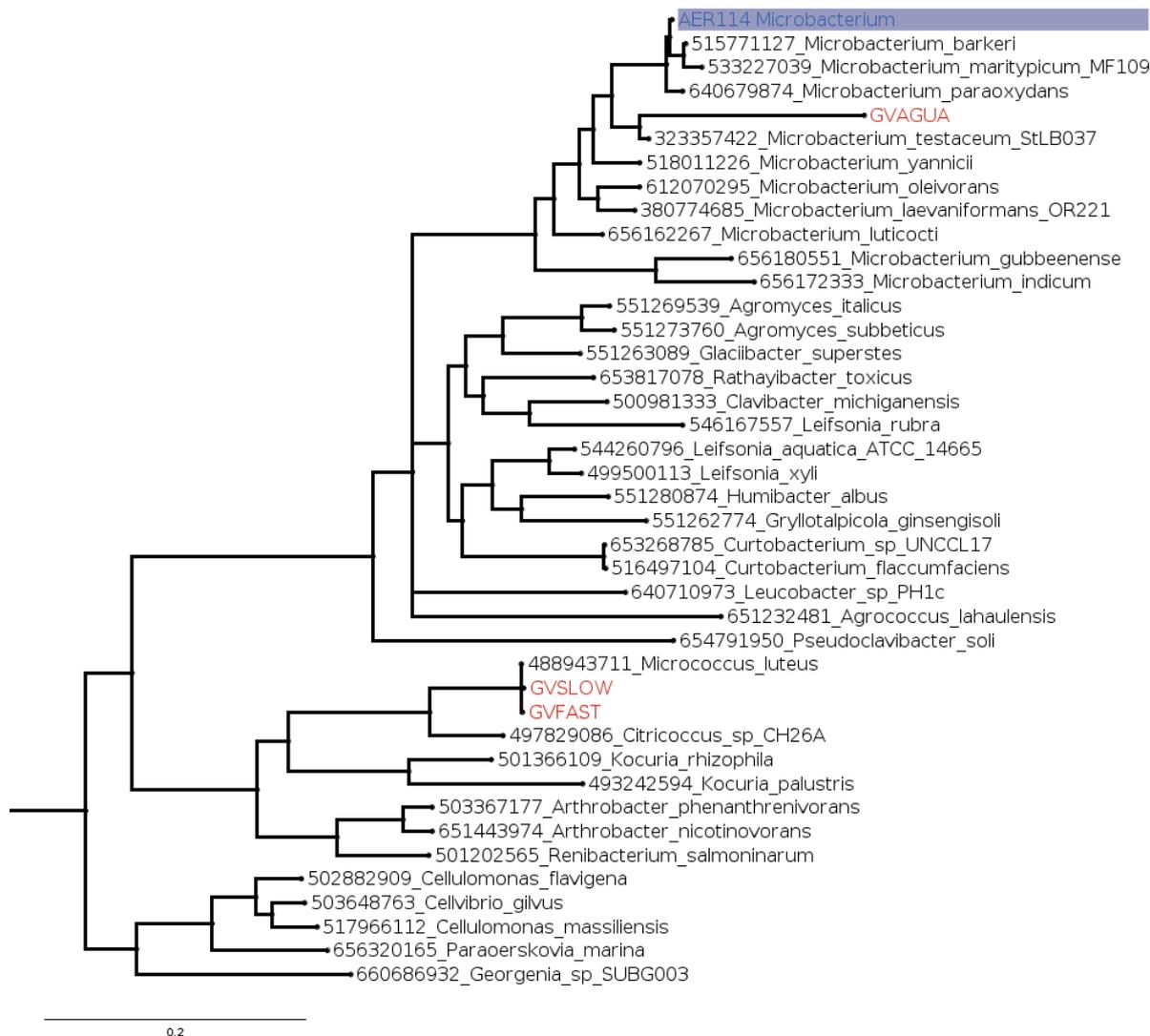


Figura 18. Árbol filogenético de secuencias de 16S. En rojo están marcados los aislados correspondientes a cepas de N con genoma secuenciado, en verde se encuentran cepas de N sin genoma secuenciado y en azul cepas históricas Mic. A) En esta figura se observa que el aislado N9 se agrupa con secuencias de *Clavibacter michiganensis michiganensis*. B) Las cepas provenientes de N: NAgua, N11B, N11C y N16B se agrupan cerca de cepas de *Microbacterium*. En el mismo cluster observamos la secuencia Mic114, un aislado histórico del género *Microbacterium*. NFast queda sin agruparse, y se ubica entre los clusters de *Microbacterium* y *Micrococcus*. La cepa NAbove se coloca cerca de secuencias de *Micrococcus luteus*.

Al ser *Clavibacter* un género con alta identidad de secuencia en 16S, a pesar de proporcionar un panorama general de la ubicación de las cepas, este árbol no alcanza a resolver totalmente las relaciones taxonómicas de estas cepas. Por ello, para ubicar con mayor precisión los aislados con genoma disponible se realizó el árbol, a nivel de nucleótidos, del gen *rpoB*. Estas secuencias fueron editadas para poder incluir las secuencias correspondientes de los genomas NAbove y NAgua. En dicho árbol se incluyen las cepas históricas de *Cmm* Mic1, Mic2, Mic4, Mic8, Mic9, Mic93, la de *Microbacterium* Mic114, el *Cmm* no patógeno 26808 reportado por Zaluga et al, el *Cmm* de referencia NCPPB382, así como también secuencias de *Microbacterium* y *Micrococcus* de genomas disponibles en la base de datos pública de NCBI.

Como puede observarse en la Figura, falta resolución a la región del árbol donde se agrupan los *Cmm*. Si se quisiera resolver esta sección del árbol, se puede realizar un análisis basado en el estudio de Jacques y col., 2012, donde usando un concatenado de marcadores moleculares adecuados para genética de poblaciones, específicamente ***rpoB*, *gyrB*, *recA*, *dnaK*, *ppK* y *atpD***, se logró la identificación eficiente de nuevos aislados a un nivel de género y especie. Este enfoque de concatenado de marcadores incluso permitió identificar cepas de *Cmm* no patogénicas, las cuales se agrupan en clados diferentes a las cinco subespecies de *Clavibacter michiganensis* conocidas por su patogenicidad. Cada subespecie es patógena de una planta diferente: *nebraskensis* afecta al maíz, *tesselarius* al trigo, *insidiosus* a la alfalfa, *sepedonicus* a la papa, y *michiganensis* al jitomate.



**Figura 19. Árbol filogenético construido usando el marcador *rpoB* de secuencias genómicas disponibles en la base de datos NCBI. Este árbol demuestra que la filiación taxonómica de los aislados NAbove y NFast (marcadas en rojo) es la familia de las *Micrococcaceae*, específicamente *Micrococcus luteus*, mientras que NAGUA pertenece a la familia *Microbacteriaceae* y se agrupa con diversos *Microbacterium* (también en rojo), entre ellos el aislado histórico Mic114 (recuadro azul).**

**Tabla 8. Cepas históricas utilizadas en el análisis taxonómico.**

ID	Clasificación taxonómica	Procedencia
Mic1, Mic2, Mic4, Mic8, Mic9, Mic93	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	Colección Langebio
UF	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	Universidad de Florida
Mic114	<i>Microbacterium</i>	Colección Langebio
NCPBP	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	NCBI
26808	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>	NCBI, [2]
RIT305, RIT324, SUBG006, NCTC2665, modasa	<i>Micrococcus Luteus</i>	NCBI
StLB037	<i>Microbacterium testaceum</i>	NCBI
PF11, PF27	<i>Microbacterium</i>	Colección Langebio

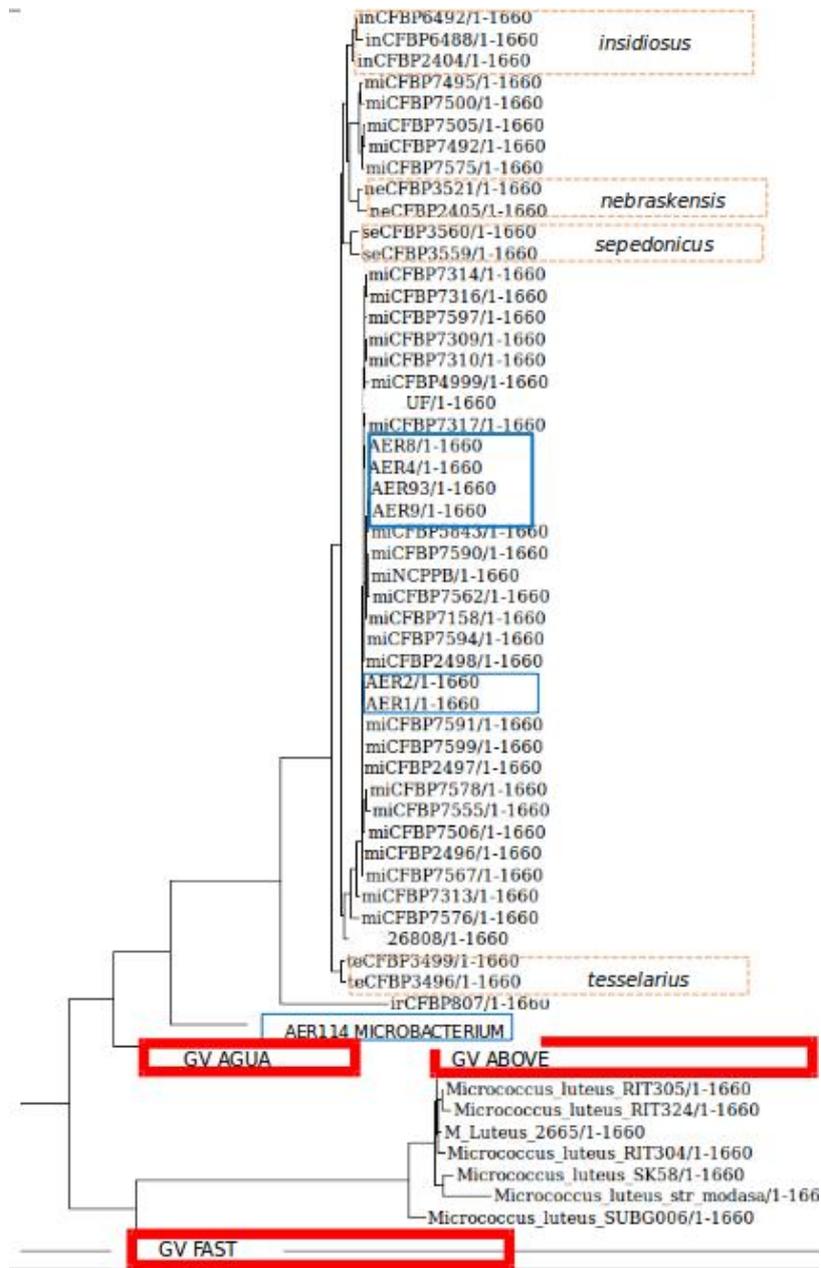


Figura 20. Análisis taxonómico de los aislados cuyo genoma fue secuenciado. Se muestra un árbol concatenado de los marcadores genéticos *rpoB*, *recA*, *dnaK*, y *atpD*. Las subespecies de *Clavibacter michiganensis* se han ubicado en recuadros punteados con su respectivo identificador. En recuadros rojos se muestran los aislados de las cepas NAGUA, NFAST y NABOVE provenientes de N, nuevamente estas cepas se agrupan con *Micrococcus* y *Microbacterium* respectivamente.

#### Evento 4 invernaderos

El análisis microbiológico reveló **93 cepas** con morfotipo característico de Cmm, y bacterias relacionadas, mediante su crecimiento en medio de cultivo semi-

selectivo. En total, se realizaron **186 pruebas de PCR** con oligonucleótidos (primers) específicos para un par de genes (*tomA* y *clvF*), diseñados usando secuencias de Cmm disponibles. Se confirmaron 17 cepas de Cmm. Se secuenciaron **11 genomas de esas 17 cepas** confirmadas por la presencia de los genes *tomA* y *clvF*, dicha secuenciación se realizó utilizando la técnica de secuenciación por síntesis (SBS) con el sistema MiSeq de Illumina.

Para cada una de las muestras se usó el medio de cultivo semi-selectivo (CMM1) para el aislamiento de Cmm. Las colonias obtenidas, las cuales mostraron características visibles propias de Cmm, fueron aisladas (de 1 a 6 para cada muestra), y almacenadas para su estudio posterior. En total, se aislaron 93 cepas, provenientes de las 16 muestras; es decir, para algunos aislados / muestras se cuenta con más de una cepa capaz de dar lugar a una unidad formadora de colonia.

Para la identificación de las cepas aisladas, se purificó DNA genómico de cultivos líquidos de cada microorganismo, y dicho DNA se empleó para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes de Cmm específicamente relacionados con la patogenicidad de este microorganismo. Los dos genes seleccionados son ***tomA*, *clvF***, y los oligos utilizados fueron previamente diseñados usando secuencias disponibles en las bases de datos públicas, y confirmados con las secuencias disponibles en nuestro laboratorio a la fecha del análisis. Para cada aislado se amplificaron 2 genes de patogenicidad seleccionados, y se consideraron positivas aquellas muestras en las que los dos genes se pudieron amplificar.

Las secuencias tanto de genes específicos como genómicas fueron analizadas mediante herramientas bioinformáticas, incluyendo reconstrucciones filogenéticas, alineamientos múltiples de secuencia, desciframiento de secuencias genómicas (ensamblaje), y genómica comparativa con énfasis en genes funcionales asociados a la patogenicidad y el metabolismo.

**Tabla 9. Aislados de Cmm, con presencia de los genes *tomA* y *clvF* por PCR**

ID cepa	Invernadero	“Estatus” de
---------	-------------	--------------

		<b>la planta</b>
Q3D	Q	Enferma
Z2A	Z	Enferma
Z2B	Z	Enferma
MB3C	MB	Enferma
MB3E	MB	Enferma
MB3F	MB	Enferma
A3A	A	Enferma
A3B	A	Enferma
A3C	A	Enferma
A3C2	A	Enferma
A3D	A	Enferma

### **Análisis taxonómicos**

Los *reads* de los genomas fueron ensamblados con el software Velvet, y anotados en el servidor RAST. En la tabla 2 se muestran los datos para cada uno de los genomas.

**Tabla 10. Resultados de la secuenciación genómica de 11 aislados**

<b>Cepa</b>	<b>Pureza (Basada en % de GC)</b>	<b>Tamaño del ensamble</b>	<b>Contenido de GC</b>	<b>Contigs totales</b>
Q3D	Una señal	3127677	73	603
Z2A	Una señal	3469296	73	211
Z2B	Una señal	3946091	73	1347
MB3C	Una señal	3493327	73	358
MB3E	Una señal	3253953	73	506
MB3F	Una señal	3602344	73	392
A3A	Una señal	3674205	73	1080
A3B	Una señal	3775389	73	1085
A3C	Una señal	3478495	73	118
A3C2	Una señal	3806614	73	1047
A3D	Una señal	3397620	73	178

Además de estas cepas, se incluyeron los genomas de otras cepas previamente secuenciados en nuestro laboratorio así como las reportadas en la literatura para dar contexto a los análisis filogenéticos. Tabla 19.

**Tabla 11. Cepas históricas utilizadas en el análisis taxonómico**

Cepa	Clasificación taxonómica	Procedencia
Mic1, Mic2, Mic4, Mic8, Mic9, Mic93, Mic130I, N23H	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Colección Langebio
UF	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Universidad de Florida
NCPB382	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	NCBI
26808	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	NCBI

Además de las cepas de Cmm, fueron secuenciadas bacterias de otros géneros, cercanas taxonómicamente, y asociadas al cáncer bacteriano del jitomate. A continuación se enlistan las cepas seleccionadas

**Tabla 12. Genomas de endófitos**

ID	Num contigs	Tamaño (bp)
1 Acinetobacter sp Q3A	881	9025456
2 Curtobacterium sp MB4B	335	3416245
3 Curtobacterium sp Mic842ab	1011	3376232
4 Micrococcus sp Mic1061	318	2427968
5 Arthrobacter sp G33D	261	4466115
6 Leifsonia sp G6A	141	2747169
7 Microbacterium sp N23A	667	7506999
8 Frigoribacterium sp N20B	122	3415600
9 Sanguibacter sp N15B	149	3913774
10 Microbacterium sp N11C	171	2740659
11 Herbiconiux sp N11B	258	3461970
12 Pseudoclavibacter sp N9A	202	3405699
13 Curtobacterium sp N5A	91	3392826
14 Micrococcus sp NFast	418	5912389
15 Microbacterium sp Nagua	6931	7265669
16 Microbacterium sp PFL	118	3714177

## Capítulo 3. Análisis de filogenómica y de genómica comparada

### Análisis de Genómica Comparada

Los genomas fueron analizados con énfasis en los genes de patogenicidad conocidos en Cmm, confirmándose la presencia de ortólogos de *tomA* en NAgua y NFast que comparten alta identidad en secuencia con los de Cmm (80% en aminoácidos y 74 % en nucleótidos). Esta observación es consistente con la determinación inicial de estas cepas como Cmm por PCR. No se detectaron en estos aislados otros ortólogos asociados a patogenicidad en Cmm (Tabla 4). Sin embargo, sí se encontró la ruta metabólica a la que pertenece *tomA*, misma que está formada por genes asociados a la utilización de xylan. El gen *tomA* es una hidrolasa que pertenece a la ruta de utilización de xylosa. La incorporación de esta ruta metabólica, atípica en el genoma de *Micrococcus*, puede interpretarse como evidencia circunstancial de asociación entre la planta y los aislados NAgua y NFast; queda por determinar si esta asociación es detrimento para la planta, es decir, el nivel de patogenicidad de estos aislados.

En este sentido, análisis preliminares usando plantas provistas por el proveedor de N, y un protocolo de infección previamente estandarizado en el Langabio, así como las cepas NAgua, NFast y Mic2 como control positiva, sugieren cierto nivel de patogenicidad similar entre Cmm y las cepas N secuenciadas. Sin embargo, este resultado se debe de tomar con cautela dado que el análisis se hizo únicamente en dos plántulas por tratamiento, y requiere ser confirmado mediante un experimento en invernadero a mayor escala que permita hacer análisis estadísticos.

Al realizar genómica comparativa utilizando el programa RAST, (Tabla 10) se observó también que *Micrococcus*, el género más parecido a NFast, no tiene ningún gen de esta ruta, y que en cambio la ruta de Xylosa está casi completa en *Clavibacter*. Además, los genomas NFast y NAgua a diferencia de los *Clavibacter* poseen la enzima *AxeA*, esta enzima está presente también en el género *Microbacterium*, que es el más afin a NAgua.

**Tabla 13. Ruta de utilización de xylosa. Uno de los genes de patogenicidad *tomA* está comprendido en la ruta de xilosa. En esta tabla se observa el perfil de ocurrencia de esta ruta en distintas familias bacterianas. En gris claro *Micrococcus luteus*; en verde, NFast y NAgua, en gris oscuro distintos *Clavibacter michiganensis*, y finalmente en azul *Microbacterium*. Como se observa *Micrococcus* carece totalmente de todas las enzimas de la ruta. El gen de patogenicidad *tomA* está presente en los genomas NAgua y NFast así como en *Clavibacter*. El gen *AxeA* es común a *Microbacterium* y NFast, NAgua.**

Organismo	¿Activo?	XylA	XylB	R	Xyl_T	Xyn_T	tomA	XL	KSAD	AxeA
MI SK58	no									
MI RIT304	no									
MI RIT324w	no									
MI SUBG006	no									
MI NCTC 2665	no									
MI str. modasa	no									
MI RIT305	no									
GV FAST	yes	+	+	+		+	+			+
GVAGUA	yes	+		+		+	+			+
LMG 26808	yes	+	+	+		+	+		+	
AER1	yes	+	+			+	+		+	
AER2	yes	+	+			+	+		+	
AER4	yes	+	+	+		+	+		+	
AER8	yes	+	+	+		+	+		+	
AER9	yes	+	+	+		+	+		+	
AER93	yes	+	+	+		+	+		+	
NCPPB 382	yes	+	+	+		+	+		+	
UF	yes	+	+	+		+	+		+	
M PFL	yes	+	+	+		+	+			+
Mp 77MFT	yes	+	+	+	+		+		+	+
Mp L14	yes		+	+		+			+	+
Mt StLB037	yes	+	+			+	+			+
Mp DH1b	yes		+	+		+				
M URHA0036	yes		+	+		+				

## Core genome

Con los genomas de las tablas 2 y 3, se calculó el *core genome*, figura. En el que se encontró que el *core* está formado por 1397 genes, mientras que el resto son variables. Cada genoma está representado por un óvalo, y el número en cada uno indica los genes variables para cada genoma. Este resultado sugiere que estas cepas tienen un pangenoma abierto, lo cual no es propio de las bacterias patógenas.

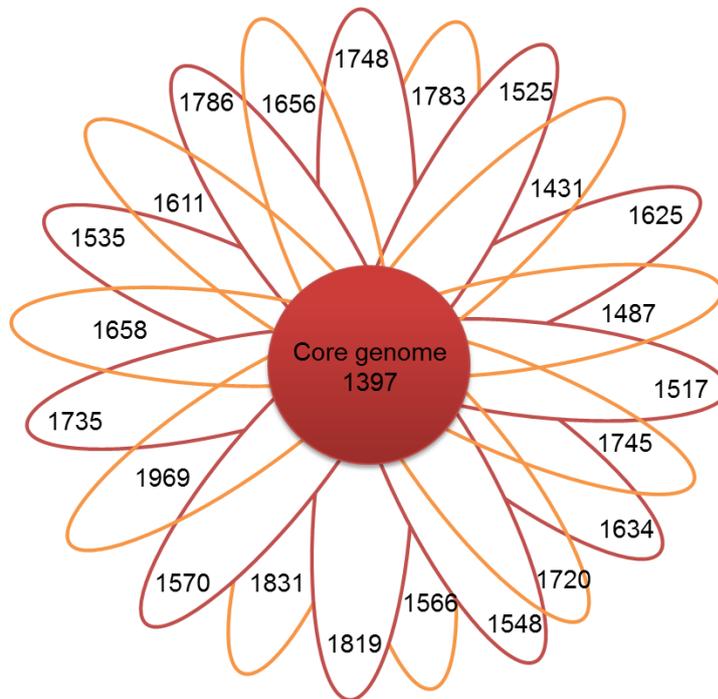


Figura 20. Core genome de genomas de Cmm

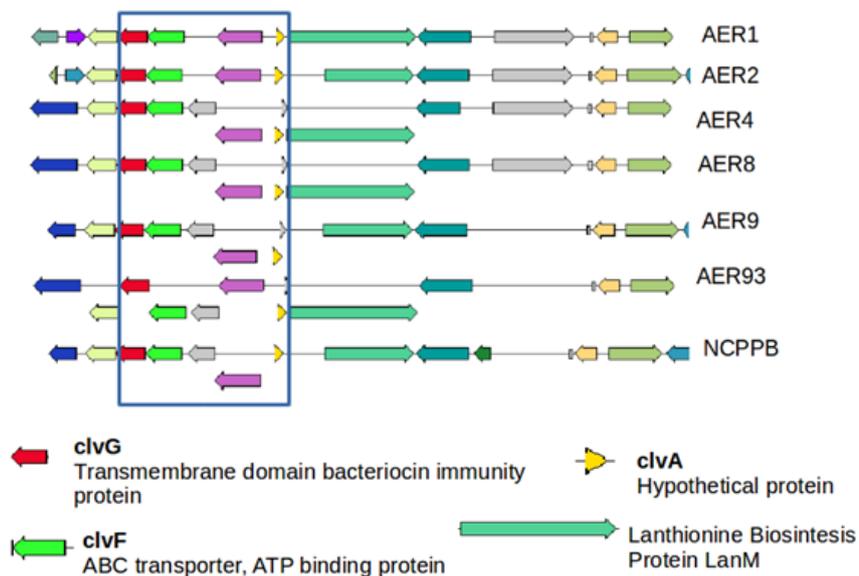


Figura 21. Cluster *clv*, los genes *clvA* y *clvG* son exclusivos de las cepas de *Clavibacter*, comparadas con otros géneros aislados de plantas enfermas.

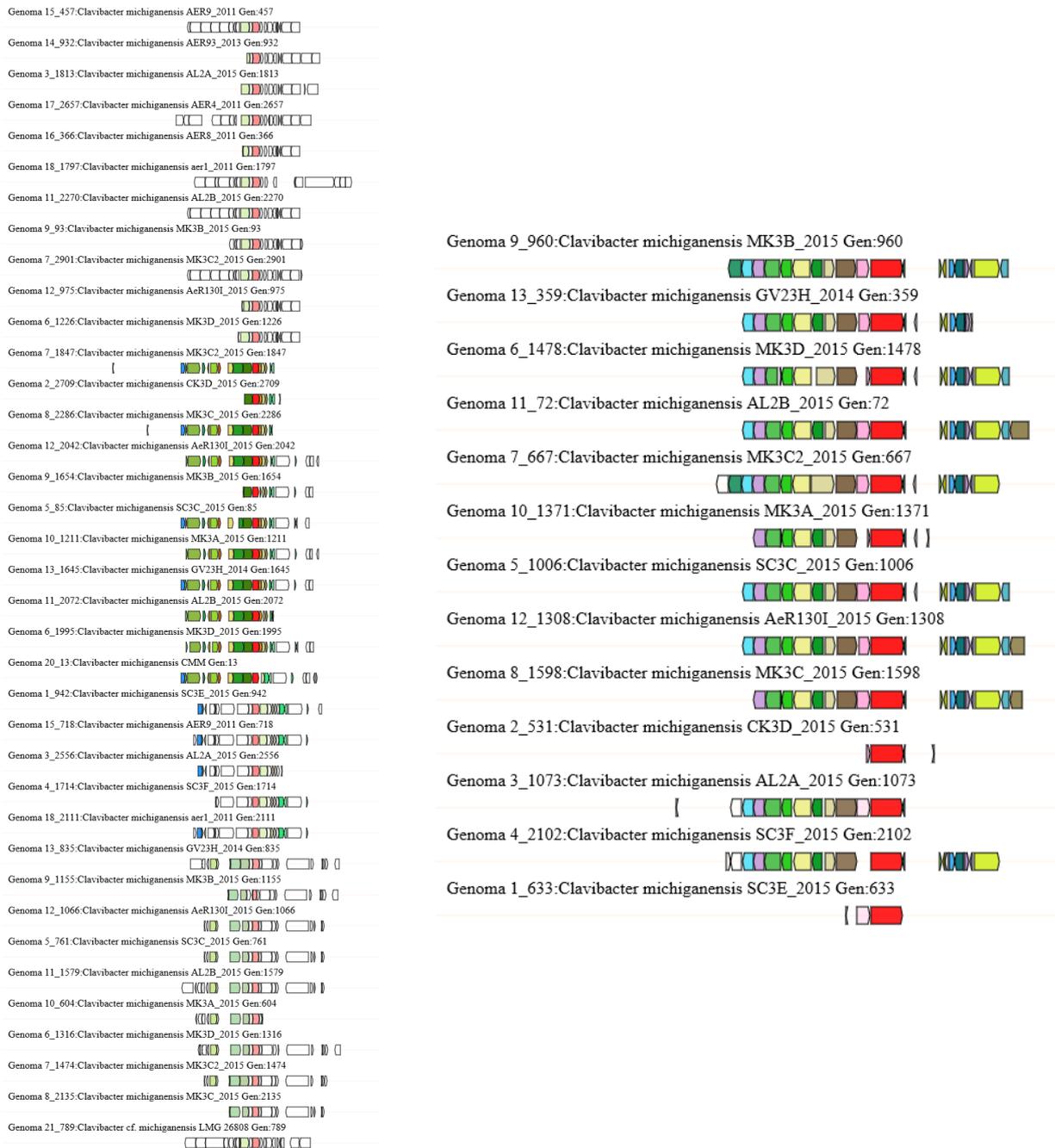
Con el *core*, se construyó una filogenia, figura, en la que se observa la agrupación de las cepas 2015, las cuales tienen en común el origen de la semilla.

Se analizaron los genes que son únicos de las cepas de 2015, encontrando que hay 22. De estos genes se buscó el contexto genómico, es decir los genes vecinos,

figura. Algunos de estos, se encuentran agrupados y los hay tanto de cromosoma como de origen plasmídico.

**Tabla 14. Genes únicos de las cepas del evento 4 invernaderos**

Gen	Función
1570	HypotheticalProtein
1571	HypotheticalProtein
65	HypotheticalProtein
1071	RelaxaseTrwCConjugalTransferProteinTraADNAPrimaseConjugative
1072	TwoComponentSystemResponseRegulator
1089	ChromosomePlasmidPartitioningProteinParA
1090	HypotheticalProtein
1302	HypotheticalProtein
1303	Lipase
1304	HypotheticalProtein
1305	HypotheticalProtein
1306	HypotheticalProtein
1308	TypeIRestrictionModificationSystemRestrictionSubunitR
1310	TypeIRestrictionModificationSystemDNAMethyltransferaseSubunitM
1440	HypotheticalProtein
2001	VeryShortPatchMismatchRepairEndonucleaseGTSpecific
2031	HypotheticalProtein
2039	HypotheticalProtein
2042	PutativeSecretedProtein
2048	HypotheticalProteinPutativeTranscriptionalRegulatorArsRFamily
2050	FIG00512013HypotheticalProtein
2051	HypotheticalProteinPutativePartitioningProtein



**Figura 22. Contexto genómico de dos ejemplos de genes únicos de las cepas 2015**

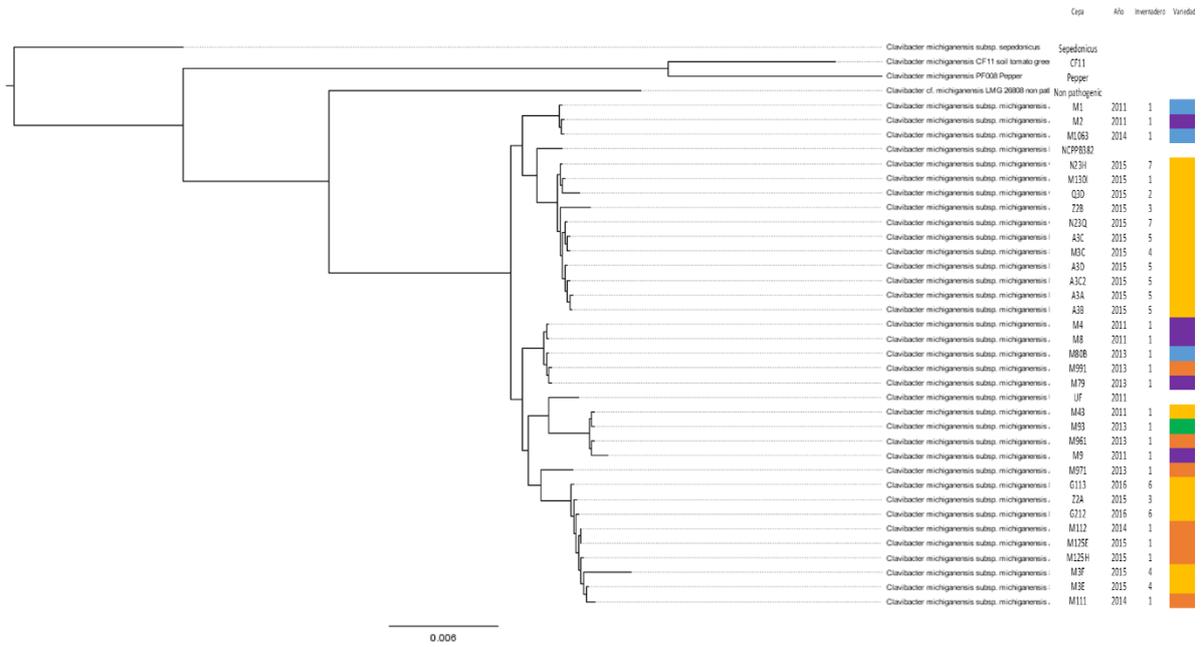


Figura 23. Árbol filogenómico de cepas de Cmm.

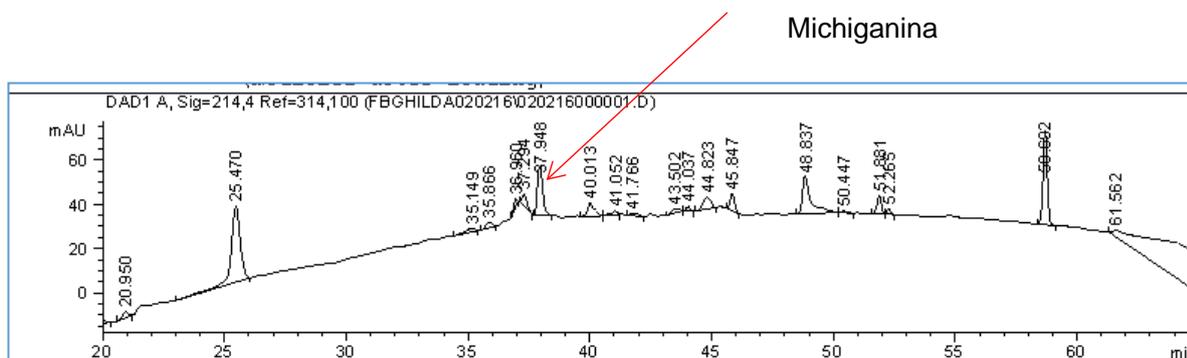
## Capítulo 4. Caracterización fenotípica de marcadores moleculares para distinción entre Cmm y endófitos.

### Genes que codifican para la michiganina, como marcadores moleculares

Se realizó un escrutinio mediante amplificación por PCR del gen *clvF* de todas las cepas de la colección que han sido identificadas por el gen 16S, encontrando que solo las cepas de Cmm, a diferencia de las de otros géneros, poseen este gen; por lo que podemos inferir que este es un buen marcador molecular para identificación de Cmm.

### Purificación de michiganina

Se purificó la bacteriocina michiganina, de un cultivo de Cmm, mediante HPLC, además se detectó por la técnica de MALDI TOF.



## Capítulo 5. Caracterización funcional del microbioma

Para conocer el comportamiento de tres tipos de plantas: WT variedad Castlemart, Prosistemina: sobreexpresante bajo el promotor constitutivo 35S de prosistemina y SPR2: mutante afectada en la ruta de los octadecanoides; se infectaron plantas de 4 semanas de edad, y fueron monitoreadas durante un mes para seguir el proceso de infección, sorprendentemente ninguna de las plantas mostró los síntomas del cáncer bacteriano, así que al cabo de un mes se aisló Cmm de cada una de las plantas inoculadas en medio de cultivo CMM1, y se encontró que si hubo colonización con Cmm. De manera paralela se desarrolló este experimento por la Dra. Kena Casarrubias, solo que a diferencia de este, las plantas se mantuvieron en condiciones de temperatura constantes y en ese caso si se encontraron plantas con síntomas de cáncer bacteriano.



Figura 23. A: plantas de jitomate: WT, Prosistemina, SPR2. B: colonias de Cmm, aisladas de plantas asintomáticas.

Tabla 15. Cepas aisladas de plantas infectadas con Cmm

ID	Invernadero	Fecha de aislamiento	toma	Fecha de infección	Variedad Jitomate
PS35SA	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Prosistemina: Sobreexpresante bajo el promotor constitutivo 35S de prosistemina
PS35SB	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Prosistemina: Sobreexpresante bajo el promotor constitutivo 35S de prosistemina
PS35SC	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Prosistemina: Sobreexpresante bajo el promotor constitutivo 35S de prosistemina
SPRR2A	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	SPR2: mutante afectada en la ruta de octadecanoides
SPRR2B	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	SPR2: mutante afectada en la ruta de octadecanoides
SPRR2C	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	SPR2: mutante afectada en la ruta de octadecanoides
SPRR2D	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	SPR2: mutante afectada en la ruta de octadecanoides
SPRR2E	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	SPR2: mutante afectada en la ruta de octadecanoides
SPRR2F	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	SPR2: mutante afectada en la ruta de octadecanoides
SPRR2G	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	SPR2: mutante afectada en la ruta de octadecanoides
WTA	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Castlemart
WTB	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Castlemart
WTC	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Castlemart
WTD	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Castlemart
WTE	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Castlemart
WTF	Lab JDF	08-ene	Positivo	09-dic	Castlemart

## Discusión de resultados

Es importante realizar diagnóstico molecular de alta precisión en plantas y frutos que serán utilizados para producción de semillas, ya que aunque las plantas no muestren síntomas la infección puede estar presente en la semilla de manera latente.

### **Datos genómicos de cepas mexicanas**

Se han secuenciado 23 genomas de Cmm, que son parte de un cepario que ha sido construido de invernaderos mexicanos con presencia de cáncer bacteriano y ha sido caracterizado fenotípicamente. Esta base de datos da el valor a la propuesta debido a que permite hacer correlaciones genotipo-fenotipo y proveer de diagnósticos especializados que además de saber si hay presencia de Cmm se pueda conocer la virulencia de la cepa. Es importante enriquecer esta base de datos, ya que mientras más información se tenga de genomas y su relación con el cultivar del cual fue aislado y otros datos fenotípicos se podrán hacer correlaciones más acertadas, además debe tomarse en cuenta que Cmm presenta una gran variabilidad genotípica y estos cambios pueden estar asociados a la localización geográfica, virulencia, cultivar del que fue aislado.

Los resultados de secuenciación arrojaron datos por demás interesantes, ya que no todas las cepas seleccionadas por el método de diagnóstico basado en *tomA* fueron Cmm. Se aislaron además microorganismos con características similares y relacionados taxonómicamente a este patógeno (microbacterias y micrococáceas). De hecho, en los genomas de algunas de estas cepas (N), se encuentra el gen *tomA*, concluyéndose que su amplificación es insatisfactorio para fines de diagnóstico. A partir de este momento agregamos al diagnóstico la amplificación de los genes *clvA*, *clvG* y *clvF*, recientemente confirmados por nuestros análisis de genómica comparativa como característicos y específicos para Cmm. Estos genes han sido anteriormente reportados como los responsables de la síntesis de una bacteriocina (antibiótico peptídico de espectro taxonómicamente limitado) llamado michiganina o clavacidina.

Las cepas aisladas de plantas enfermas en el proyecto 4 invernaderos, en 2015, se distinguen filogenéticamente de otras cepas de Cmm. Las cepas se distinguen filogenéticamente de las que tienen diferente origen de la semilla. Las cepas aisladas de plantas enfermas, de los 4 invernaderos, en 2015, presentan genes únicos, es decir que no se comparten con otras cepas históricas del laboratorio. Estas firmas a nivel del genoma, así como el origen común de las semillas sugieren que Cmm se adapta rápidamente a su nicho específico, en este caso la variedad de la planta y a la población bacteriana con la que comparte éste espacio físico. Bajo esta observación se hipotetiza que Cmm no es un patógeno común y por tanto debe ser estudiado en base a los resultados que arrojan éste tipo de análisis genómicos.

## Conclusiones

1. Cmm puede colonizar plantas de jitomate sin causar síntomas de cáncer bacteriano, puede deberse a que se trata de cepas no patogénicas de Cmm o al microbioma que tiene como contexto.
2. El cluster *c/v*, es exclusivo de las cepas de Cmm, comparado con bacterias de otros géneros aislados de plantas de jitomate.
3. Mediante genómica comparativa se encontró que las cepas se agrupan de acuerdo al origen de la semilla o bien de la variedad de jitomate y no así del año de aislamiento o del invernadero del que provengan.
4. En un análisis de genómica con 20 cepas de Cmm, se pudo ver que presenta un pangenoma abierto, es decir menos de la mitad de sus genes forman el core o son compartidos por todos los genomas.

## Perspectivas

1. Aislar endófitos de una muestra seleccionada de plantas de jitomate en invernadero, que sean asintomáticas, y se haga un muestreo cada mes durante su ciclo de producción para observar el cambio en su microbioma.
2. Secuenciar por la técnica de iTags, 16S del DNA total de las plantas de las que fueron extraídos los endófitos.
3. Explorar si en el microbioma del jitomate se pueden encontrar microorganismos antagonistas de Cmm.

## Referencias

- Agarkova, I. V, Lambrecht, P. a & Vidaver, a K., 2011. Genetic diversity and population structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. *Canadian journal of microbiology*, 57(5), pp.366–374.
- Bai, Y. & Lindhout, P., 2007. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, 100(5), pp.1085–1094.
- Balaji, V. et al., 2008. Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant physiology*, 146(4), pp.1797–1809.
- Balaji, V. & Smart, C.D., 2012. Over-expression of snakin-2 and extensin-like protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Transgenic Research*, 21(1), pp.23–37.
- Bentley, S.D. et al., 2008. Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* suggests recent niche adaptation. *Journal of Bacteriology*, 190(6), pp.2150–2160.
- Bignell, D.R.D. et al., 2010. What does it take to be a plant pathogen: Genomic insights from *Streptomyces* species. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 98(2), pp.179–194.
- Boudyach, E.H. et al., 2001. Selection of Antagonistic Bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Evaluation of Their Efficiency Against Bacterial Canker of Tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 11(October 2015), pp.141–149. Available at:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583150020029817>.
- Brown, S.E., Knudson, D.L. & Ishimaru, C. a., 2002. Linear plasmid in the genome of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Journal of Bacteriology*, 184(10), pp.2841–2844.
- Burokienė, D., 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Agronomy Research*, 4, pp.151–154.
- Carlton, W.M., Braun, E.J. & Gleason, M.L., 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes. *Phytopathology*, 88(6), pp.525–529.

- Chang RJ, Ries SM, Pataky JK, 1992c. Reductions in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. *Plant Disease*, 76(8):805-809.
- Cho, I. & Blaser, M.J., 2012. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature reviews. Genetics*, 13(4), pp.260–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3418802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 9, 2014].
- Cho, M.S. et al., 2012. A quantitative and direct PCR assay for the subspecies-specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* based on a ferredoxin reductase gene. *Journal of Microbiology*, 50(3), pp.496–501.
- Deng, P. et al., 2015. Complete genome of *Pseudomonas chlororaphis* strain UFB2, a soil bacterium with antibacterial activity against bacterial canker pathogen of tomato. *Standards in Genomic Sciences*, pp.1–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s40793-015-0106-x>.
- Dhanvantari BN, 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11(4):400-408
- Dhanvantari BN, 1993. Seed-borne infection in tomato bacterial canker. *Proceedings of the 9th Annual Tomato Disease Workshop*, 33-36.
- Dreier, J., Bempohl, a & Eichenlaub, R., 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 85, pp.462–468. Available at: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19952307511.html>.
- Eichenlaub, R. & Gartemann, K.-H., 2011. The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens. *Annual review of phytopathology*, 49, pp.445–464.
- Flügel, M. et al., 2012. Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *Journal of Biotechnology*, 160(1–2), pp.42–54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.01.023>.
- Foolad, M.R., 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2007.
- Gartemann, K.H. et al., 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106, pp.179–191.
- Gartemann, K.H. et al., 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(6), pp.2138–2149.
- Hausbeck, M.K. et al., 2000. Effect of Bactericides on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomatoes in the Greenhouse and on Disease Development and Crop Yield in the Field. *Phytopathology*, 90(1), pp.38–44.
- Holtsmark, I. et al., 2006. Purification, characterization, and gene sequence of michiganin A, an actagardine-like lantibiotic produced by the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), pp.5814–5821.
- Holtsmark, I., Eijsink, V.G.H. & Brurberg, M.B., 2008. Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS microbiology letters*, 280, pp.1–7.
- Husemann, P. & Stoye, J., 2010. r2cat : synteny plots and comparative assembly. , 26(4), pp.570–571.
- Ito, S.I. et al., 2004. Tomatidine and lycotetraose, hydrolysis products of ??-tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase, suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS Letters*, 571(1–3), pp.31–34.
- Jahr, H. et al., 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental microbiology*, 1(2), pp.113–118.
- Jahr, H. et al., 2000. The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 13(7), pp.703–714.
- Jung, W.J. et al., 2014. Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 77, pp.13–16. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401014001600>.
- Kaneshiro, W.S., Mizumoto, C.Y. & Alvarez, A.M., 2006. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal of Plant Pathology*, 116(1), pp.45–56.
- Kaup, O. et al., 2005. Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382.

- Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 18(10), pp.1090–1098.
- Kleitman, F. et al., 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), pp.463–475.
- Kokoskova, B., Mraz, I. & Fousek, J., 2010. Comparison of Specificity and Sensitivity of Immunochemical and Molecular Techniques for Determination of. *Sciences-New York*, 55(3), pp.239–244.
- Kokoskova, B., Pouvova, D. & Pavela, R., 2011. EFFECTIVENESS OF PLANT ESSENTIAL OILS AGAINST ERWINIA AMYLOVORA , PSEUDOMONAS SYRINGAE pv . SYRINGAE AND ASSOCIATED SAPROPHYTIC BACTERIA ON / IN HOST PLANTS. , 93, pp.133–139.
- Lanteigne, C. et al., 2012. Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. *Phytopathology*, 102(10), pp.967–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713078>.
- De León, L. et al., 2009. Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathology*, 58(5), pp.862–871.
- de León, L., Siverio, F. & Rodríguez, a., 2006. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *Journal of Microbiological Methods*, 67(1), pp.141–149.
- Lu, Y. et al., 2015. Complete Genome Sequence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* R1-1 using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. , 22(3), pp.11–22.
- Meletzus, D. et al., 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Journal of Bacteriology*, 175(7), pp.2131–2136.
- Nazari, F. et al., 2007. An investigation on strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in north and north west of Iran. *Journal of Phytopathology*, 155(9), pp.563–569.
- Oh, E.-J. et al., 2016. *Clavibacter michiganensis* subsp . *capsici* subsp . nov . , causing bacterial canker disease in pepper.
- Passam, H.C. et al., 2007. A review of recent research on tomato nutrition, breeding and post-harvest technology with reference to fruit quality. *The*

- European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1 (1), pp.1–21.
- Quesada Ocampo, L.M., Landers, N. A., Lebeis, A.C., 2012. Genetic Structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in Michigan Commercial Tomato Fields. *The American Phytopathological Society*, 96(6).
- Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 19(8), pp.827–837.
- Sato, S. et al., 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), pp.635–641.
- Savidor, A. et al., 2012. The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* - tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *Journal of Proteome Research*, 11(2), pp.736–750.
- Seipke, R.F. & Loria, R., 2008. *Streptomyces scabies* 87-22 possesses a functional tomatinase. *Journal of Bacteriology*, 190(23), pp.7684–7692.
- Tambong, J.T. et al., 2015. Draft Genome Sequence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* Strain DOAB 397, Isolated from an Infected Field Corn Plant in Manitoba, Canada. *Genome announcements*, 3(4). Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4498123&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 27, 2015].
- Wittmann, J. et al., 2011. Genomic and molecular analysis of phage CMP1 from *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis*. , 1(1), pp.6–14.
- Xu, X. et al., 2010. Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), pp.3978–3988.
- Yasuhara-Bell, J. & Alvarez, A.M., 2015. Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3).
- Yasuhara-Bell, J., Marrero, G. & Alvarez, A.M., 2014. Genes *clvA*, *clvF* and *clvG* are unique to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and highly conserved. *European Journal of Plant Pathology*, 140(4), pp.655–664. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10658-014-0495-5>.
- Yim, K.O. et al., 2012. Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter*

michiganensis subsp. michiganensis isolated from *Capsicum annuum*.

*European Journal of Plant Pathology*, 133(3), pp.559–575.

Du Ying, Yuann Bo, Z.Y., 2015. Draft Genome Sequence of the Cellulolytic bacterium *Clavibacter* sp. CF11, a strain producing cold-active Cellulase. , 1(1), pp.4–5.

Zaluga, J. et al., 2013. Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), pp.426–435. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.005>.

Załuga, J. et al., 2014. Comparative genome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Clavibacter* strains reveals adaptations to their lifestyle. *BMC genomics*, 15(1), p.392. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4059874&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Zhang, W., Li, F. & Nie, L., 2010. Integrating multiple “omics” analysis for microbial biology: Application and methodologies. *Microbiology*, 156(2), pp.287–301.

Rat B, Poissonnier J, Gosique MJ, Burgaud A, 1991. Le point sur chancre bacterien. *Fruit et Legume*, 86:38-40.